(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6702858号
(P6702858)
(45)発行日　令和2年6月3日(2020.6.3)　(24)登録日　令和2年5月11日(2020.5.11)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/09	110
C12N 15/864	(2006.01)	C12N	15/864	100Z
C12N 15/86	(2006.01)	C12N	15/86	Z
C12N 15/55	(2006.01)	C12N	15/55	ZNA
A61K 35/76	(2015.01)	A61K	35/76	

請求項の数 19　(全 373 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-521453(P2016-521453)
(86)(22)出願日　平成26年6月11日(2014.6.11)
(65)公表番号　特表2016-521995(P2016-521995A)
(43)公表日　平成28年7月28日(2016.7.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/041809
(87)国際公開番号　WO2014/204729
(87)国際公開日　平成26年12月24日(2014.12.24)
審査請求日　平成29年6月8日(2017.6.8)
(31)優先権主張番号　61/979,879
(32)優先日　平成26年4月15日(2014.4.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　61/871,301
(32)優先日　平成25年8月28日(2013.8.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　515236259
ザ・ブロード・インスティテュート・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・メイン・ストリート・４１５
(73)特許権者　596060697
マサチューセッツ　インスティテュート　オブ　テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９ケンブリッジ，マサチューセッツ・アヴェニュー・７７

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ウイルス成分を使用して障害および疾患をターゲティングするためのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系および組成物の送達、使用および治療上の適用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系をコードする１つ以上のウイルスベクターを含む、生物のインビボでの脳細胞の改変における使用のための組成物であって、該ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系はＣａｓ９、脳細胞で発現した標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列及びｔｒａｃｒ配列を含み、前記Ｃａｓ９が黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９である、組成物。
【請求項２】
遺伝子産物の発現が脳においてＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系により変化し、それにより表現型の変化が生じる、請求項１に記載の使用のための組成物。
【請求項３】
前記使用は生物において前記組成物を脳細胞へ送達することを含み、前記Ｃａｓ９は少なくとも一の核局在化配列を含む、請求項１又は２に記載の使用のための組成物。
【請求項４】
脳で発現した標的配列の欠陥によって引き起こされる病態を治療又は阻害するための、請求項１から３の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項５】
前記使用は生物の脳細胞中に導入することを含み、
１つ以上のウイルスベクターは、
（ａ）ガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列及びｔｒａｃｒ配列をコードするポリヌクレオ

チド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、及び
（ｂ）少なくとも一の核局在化配列を含むＣａｓ９をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント
を含み、成分（ａ）および（ｂ）は、同じまたは異なるベクター上にある、請求項１から４の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項６】
前記組成物は、
（ａ）5'から3'に、ガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列及びｔｒａｃｒ配列を含むポリヌクレオチド配列、及び
（ｂ）Ｃａｓ９及び少なくとも一の核局在化配列をコードするポリヌクレオチド配列
を含み、
ｔｒａｃｒメイト配列はｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズすることができ、ガイド配列は、標的配列に対する、Ｃａ９を含むＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向することができ、Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチド配列はＤＮＡ又はＲＮＡである、請求項１から４の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項７】
前記組成物が、
（ａ）ガイド配列及びｔｒａｃｒメイト配列を含むポリヌクレオチド配列、
（ｂ）Ｃａｓ９及び少なくとも一の核局在化配列をコードするポリヌクレオチド配列、及び
（ｃ）ｔｒａｃｒ配列を含むポリヌクレオチド配列
を含み、
ｔｒａｃｒメイト配列はｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズすることができ、ガイド配列は、標的配列に対する、Ｃａ９を含むＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向することができ、Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチド配列はＤＮＡ又はＲＮＡである、請求項１から４の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項８】
２つ以上の神経遺伝子産物の発現が変化する、請求項１から７の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項９】
ガイド配列がｔｒａｃｒメイト配列及びｔｒａｃｒ配列に融合されている、請求項１から８の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１０】
Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチド配列は生物での発現用にコドン最適化されている、請求項１から９の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１１】
生物が哺乳類である、請求項１から１０の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１２】
1つ以上のウイルスベクターがＡＡＶ又はレンチウイルスベクターであり、好ましくはＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９又はそれらの組み合わせである、請求項１から１１の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１３】
（ａ）及び（ｂ）が同じウイルスベクター上にある、請求項５に記載の使用のための組成物。
【請求項１４】
前記ウイルスベクターがＡＡＶベクターである、請求項１３に記載の使用のための組成物。
【請求項１５】
前記ウイルスベクターが定位注入によって送達される、請求項１から１４の何れか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項１６】
Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチド配列は脳特異的プロモーターに作動可能に結合している、請求項１から１５の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１７】
Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチド配列は、ＣａｍｋＩＩ、パルブアルブミン、ｖＧＡＴ、ＤＲ１、ＤＲ２、ＧＦＡＰ及びＡｒｃからなる群から選択されるプロモーターに作動可能に結合している、請求項１から１６の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１８】
脳細胞はニューロン細胞である、請求項１から１７の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【請求項１９】
前記使用は脳細胞の一つ以上の欠陥遺伝子型の修正である、請求項１から１８の何れか一項に記載の使用のための組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
２０１３年６月１７日に出願された米国仮特許出願第６１／８３６，１２３号明細書、２０１３年７月１７日に出願された同第６１／８４７，５３７号明細書、２０１３年８月５日に出願された同第６１／８６２，３５５号明細書、２０１３年８月２８日に出願された同第６１／８７１，３０１号明細書、２０１３年１２月１２日に出願された同第６１／９１５，２２５号明細書、２０１４年４月１５日に出願された同第６１／９７９，８７９号明細書、および２０１３年１２月１２日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書からの優先権が主張され、ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書に関しては、米国の目的上、この出願はまた一部継続出願であり；かつ米国の法律に基づき許容され得るとおり、本明細書に相当する米国の出願または国内段階移行時の出願が、ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書およびＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７号明細書が優先権を主張する出願に関して優先権をさらに主張し得るとともに、主張し得る。
【０００２】
上記の出願、ならびにそれらの出願においてまたはそれらの審査中に引用される全ての文献（「出願引用文献」）およびその出願引用文献において引用または参照される全ての文献、ならびに本明細書において引用または参照される全ての文献（「本明細書引用文献」）、および本明細書引用文献において引用または参照される全ての文献は、本明細書においてまたは本明細書に参照により組み込まれる任意の文献において挙げられる任意の製品に関する任意の製造業者の指示書、説明書、製品仕様書、および製品シートと一緒に、参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施において用いることができる。より具体的には、全ての参照文献は、それぞれの個々の文献が個別具体的に参照により組み込まれることが示されるような程度で参照により組み込まれる。
【０００３】
本発明は、一般に、クラスター化等間隔短鎖回分リピート（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔ）（ＣＲＩＳＰＲ）およびその成分に関する配列ターゲティング、例えば、ゲノム摂動または遺伝子編集を含む遺伝子発現の制御に使用される系、方法および組成物の送達、エンジニアリング、最適化および治療適用に関する。詳細には、本発明は、ウイルスベクター送達、ウイルスベクター送達による遺伝子療法、ならびに遺伝子機能の理解およびウイルスベクター送達によるモデルの作成に関する態様に関する。
【０００４】
連邦政府により資金提供された研究に関する記述
本発明は、米国国立衛生研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈ

ｅａｌｔｈ）により助成されたＮＩＨパイオニアアワード（１ＤＰ１ＭＨ１００７０６）のもと政府支援によりなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【０００５】

ゲノムシーケンシング技術および分析法の近年の進歩により、多様な範囲の生物学的機能および疾患に関連する遺伝因子を分類およびマッピングする技能が顕著に加速されている。正確なゲノムターゲティング技術は、個々の遺伝子エレメントの選択的摂動を可能とすることにより因果的遺伝子変異の体系的なリバースエンジニアリングを可能とするため、ならびに合成生物学、バイオテクノロジーおよび医薬用途を進歩させるために必要とされる。ゲノム編集技術、例えば、デザイナー亜鉛フィンガー、転写アクチベーター様エフェクター（ＴＡＬＥ）、またはホーミングメガヌクレアーゼがターゲティングされるゲノム摂動の産生に利用可能であるが、安価で、設定が容易で、スケーラブルで、真核ゲノム内の複数位置をターゲティングしやすい新たなゲノムエンジニアリング技術が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００６】

本発明は、ウイルス成分を使用して疾患および障害に対処するための、ゲノム摂動または遺伝子もしくはゲノムの遺伝子編集などの配列ターゲティング用ツールとしてのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系の開発および適用に関する。

【０００７】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は特異的配列をターゲティングするためにカスタム化タンパク質の生成を要求しないが、単一Ｃａｓ酵素を短鎖ＲＮＡ分子によりプログラミングして特異的ＤＮＡ標的を認識させることができる。ゲノムシーケンシング技術および分析法のレパートリーへのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の付加により方法論が顕著に簡易化され、多様な範囲の生物学的機能および疾患に関連する遺伝因子を分類およびマッピングする技能が加速される。有害効果を有さずにゲノム編集にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を有効に利用するため、特許請求される本発明の態様であるそれらのゲノムエンジニアリングツールのエンジニアリング、最適化および細胞型／組織／臓器特異的送達の態様を理解することが重要である。

【０００８】

幅広い適用性を有する核酸配列（ｎｕｃｌｅｉｃ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）ターゲティングのための代替的かつロバストな系および技術が差し迫って必要とされている。本発明の態様はこの必要性に応え、かつ関連する利点をもたらす。例示的なＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体形成するＣＲＩＳＰＲ酵素を含む。ガイド配列はｔｒａｃｒメイト配列に結合し、次にはｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする。

【０００９】

第１の態様において、本発明は、目的のゲノム遺伝子座における標的配列の操作によって生物または非ヒト生物を改変する方法を提供し、この方法は、
組成物を発現させるためその組成物を作動可能にコードする１つ以上のウイルスベクターを含み得るウイルスベクター系を含み得る天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達するステップを含み、組成物は、
（Ａ）天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物であって、
Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ＲＮＡポリヌクレオチド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメントであって、ポリヌクレオチド配列が、
（Ａ）真核細胞における標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、
（ｂ）ｔｒａｃｒメイト配列、および
（ｃ）ｔｒａｃｒ配列
を含み得る、第１の調節エレメント、および

ＩＩ．場合により少なくとも１つ以上の核局在化配列を含み得る、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント、
［（Ａ）、（ｂ）および（ｃ）は５’から３’配向で配置されており、
成分ＩおよびＩＩは系の同じまたは異なるベクター上にあり、
転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、および
ＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含み得る１つ以上のベクターを含み得るベクター系を含み得る組成物、または
（Ｂ）天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物であって、
Ｉ．第１の調節エレメントであって、
（Ａ）真核細胞における標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、および
（ｂ）少なくとも１つ以上のｔｒａｃｒメイト配列
に作動可能に結合している第１の調節エレメント、
ＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント、および
ＩＩＩ．ｔｒａｃｒ配列に作動可能に結合している第３の調節エレメント
［成分Ｉ、ＩＩおよびＩＩＩは系の同じまたは異なるベクター上にあり、
転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、および
ＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含み得る１つ以上のベクターを含み得るベクター系を含み得る組成物
を含み得る。

【００１０】

一態様において、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の１つ以上のエレメントの使用方法を提供する。本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的ポリヌクレオチドを改変する有効な手段を提供する。本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、種々の組織および臓器における多種多様な細胞型の標的ポリヌクレオチドを改変（例えば、欠失、挿入、転座、不活性化、活性化）することを含め、幅広い有用性を有する。そのため本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、例えば、遺伝子またはゲノム編集、遺伝子治療、創薬、薬物スクリーニング、疾患診断、および予後における広範な適用性を有する。インビボ、インビトロおよびエキソビボ使用が想定される。

【００１１】

本発明の態様は、野生型Ｃａｓ９酵素より長さが短い、最適活性のガイドＲＮＡを有するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系におけるターゲティング特異性が向上したＣａｓ９酵素およびそれをコードする核酸分子、およびキメラＣａｓ９酵素、ならびにＣａｓ９酵素の標的特異性を向上させる方法またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を設計する方法であって、最適活性を有するガイドＲＮＡを設計または調製しおよび／または野生型Ｃａｓ９よりサイズが小さいまたは長さが短いＣａｓ９酵素を選択または調製すること（これにより、それをコードする核酸の送達ベクターへのパッケージングが、野生型Ｃａｓ９と比べて送達ベクターにおけるそのコーディングが少ないためより前進する）、および／またはキメラＣａｓ９酵素を生成することを含み得る方法に関する。

【００１２】

また、医薬における本配列、ベクター、酵素または系の使用も提供される。また、遺伝子またはゲノム編集におけるその使用も提供される。これは、インビボか、それともエキソビボかに関わらず、分裂終了細胞の組織または細胞に関する。

【００１３】

本発明のさらなる態様において、Ｃａｓ９酵素は１つ以上の突然変異を含んでもよく、機能ドメインとの融合を伴うまたは伴わない汎用ＤＮＡ結合タンパク質として用いられ得る。突然変異は人為的に導入された突然変異であってもよく、または機能獲得型もしくは機能喪失型突然変異であってもよい。突然変異としては、限定はされないが、それぞれＲｕｖＣおよびＨＮＨ触媒ドメインにある触媒ドメイン（Ｄ１０およびＨ８４０）の一方の突然変異を挙げることができる。さらなる突然変異が特徴付けられている。本発明の一態様では、転写活性化ドメインはＶＰ６４であり得る。本発明の他の態様では、転写リプレッサードメインはＫＲＡＢまたはＳＩＤ４Ｘであり得る。本発明の他の態様は、限定はされないが、転写アクチベーター、リプレッサー、リコンビナーゼ、トランスポザーゼ、ヒストンリモデラー、デメチラーゼ、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ、クリプトクロム、光誘導性／制御性ドメインまたは化学誘導性／制御性ドメインを含むドメインに融合した変異Ｃａｓ９酵素に関する。

【００１４】

さらなる実施形態において、本発明は、突然変異体ｔｒａｃｒＲＮＡおよび細胞中におけるこれらのＲＮＡのパフォーマンスを増強させるダイレクトリピート配列または突然変異体キメラガイド配列を作成する方法を提供する。本発明の態様はまた、前記配列の選択も提供する。

【００１５】

本発明の態様はまた、ＣＲＩＳＰＲ複合体の成分のクローニングおよび送達を単純化する方法も提供する。本発明の好ましい実施形態では、好適なプロモーター、例えばＵ６プロモーターがＤＮＡオリゴと共に増幅され、ガイドＲＮＡに付加される。次に得られたＰＣＲ産物を細胞に形質移入することにより、ガイドＲＮＡの発現がドライブされ得る。本発明の態様はまた、インビトロで転写されるか、または合成会社に発注して直接形質移入されるガイドＲＮＡにも関する。

【００１６】

一態様において、本発明は、より高活性のポリメラーゼを使用することにより活性を向上させる方法を提供する。好ましい実施形態において、Ｔ７プロモーターの制御下にあるガイドＲＮＡの発現は、細胞中のＴ７ポリメラーゼの発現によってドライブされる。有利な実施形態において、細胞は真核細胞である。好ましい実施形態において真核細胞はヒト細胞である。より好ましい実施形態においてヒト細胞は患者特異的細胞である。

【００１７】

一態様において、本発明は、Ｃａｓ酵素の毒性を低下させる方法を提供する。特定の態様において、Ｃａｓ酵素は、本明細書に記載されるとおりの任意のＣａｓ９、例えば任意の天然に存在する細菌性Ｃａｓ９ならびに任意のキメラ、突然変異体、ホモログまたはオルソログである。好ましい実施形態において、Ｃａｓ９はｍＲＮＡの形態で細胞に送達される。これにより酵素の一過性発現が可能となり、それにより毒性が低下する。別の好ましい実施形態において、本発明はまた、誘導性プロモーターの制御下でＣａｓ９を発現させる方法、およびそこで使用される構築物も提供する。

【００１８】

別の態様において、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のインビボ適用を改良する方法を提供する。好ましい実施形態において、Ｃａｓ酵素は野生型Ｃａｓ９か、または任意の天然に存在する細菌性Ｃａｓ９ならびに任意のキメラ、突然変異体、ホモログもしくはオルソログを含む本明細書に記載される改変型のうちのいずれかである。本発明の有利な態様は、送達用ウイルスベクターへのパッケージングが容易なＣａｓ９ホモログの選択を提供する。Ｃａｓ９オルソログは、典型的には３～４個のＲｕｖＣドメインおよびＨＮＨドメインの一般的構成を共有する。最も５’側のＲｕｖＣドメインが非相補鎖を開裂し、ＨＮＨドメインが相補鎖を開裂する。表記は全てガイド配列を参照する。

【００１９】

５’ＲｕｖＣドメインの触媒残基は、目的のＣａｓ９を他のＣａｓ９オルソログ（化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座、Ｓ．サーモフィルス

（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座１、Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座３、およびフランシセラ・ノビシダ（Ｆｒａｎｃｉｓｃｉｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ）ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座由来）と相同性比較することによって同定され、保存されたＡｓｐ残基（Ｄ１０）をアラニンに突然変異させることにより、Ｃａｓ９が相補鎖ニッキング酵素に変換される。同様に、ＨＮＨドメインの保存されたＨｉｓおよびＡｓｎ残基をアラニンに突然変異させることにより、Ｃａｓ９が非相補鎖ニッキング酵素に変換される。一部の実施形態では、二組の突然変異を両方共作製され、Ｃａｓ９が非開裂酵素に変換され得る。

【００２０】

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素はＩ型またはＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ酵素、好ましくはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ酵素である。このＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ酵素は任意のＣａｓ酵素であってよい。好ましいＣａｓ酵素は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系の複数のヌクレアーゼドメインを有する最大のヌクレアーゼと相同性を共有する一般的な酵素クラスを指し得るとおりＣａｓ９と同定され得る。最も好ましくは、Ｃａｓ９酵素はｓｐＣａｓ９またはｓａＣａｓ９由来であり、またはそれから誘導される。誘導されるとは、本出願人らは、その誘導された酵素が野生型酵素と高度な配列相同性を有するという意味では主に野生型酵素をベースとするが、しかしそれは本明細書に記載されるとおり何らかの形で突然変異している（改変されている）ものであることを意味する。

【００２１】

用語ＣａｓおよびＣＲＩＳＰＲ酵素は、特に明らかでない限り、本明細書では概して同義的に使用されることが理解されるであろう。上述のとおり、本明細書で使用される残基の付番の多くは化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座由来のＣａｓ９酵素を参照する。しかしながら、本発明がＳｐＣａｓ９、ＳａＣａｓ９、Ｓｔ１Ｃａｓ９などの他の微生物種由来のさらに多くのＣａｓ９を含むことは理解されるであろう。さらなる例が本明細書に提供される。当業者は、関連性のあるアミノ酸配列の比較により、ＳｐＣａｓ９以外のＣａｓ９酵素における適切な対応する残基を決定することができるであろう。従って、ＳｐＣａｓ９付番を使用して特定のアミノ酸置換が参照される場合に、それが他のＣａｓ９酵素を参照しないよう意図するものであることが文脈上明らかになる場合を除き、本開示は、他のＣａｓ９酵素における対応する改変を包含するよう意図される。ＳｐＣａｓまたはＳｐＣａｓ９が特にこのましいＣａｓ酵素である。

【００２２】

この場合にはヒトに最適化された（すなわちヒトでの発現に最適化されている）コドン最適化配列の例が本明細書に提供される（ＳａＣａｓ９ヒトコドン最適化配列を参照のこと）。これが好ましいが、他の例が可能であることが理解されるであろうとともに、宿主種に対するコドン最適化は公知である。

【００２３】

さらなる実施形態において、本発明は、キメラＣａｓ９タンパク質を作成することによりＣａｓ９の機能を増強する方法を提供する。キメラＣａｓ９タンパク質であるキメラＣａｓ９は、２つ以上の天然に存在するＣａｓ９由来の断片を含有する新規Ｃａｓ９であってもよい。これらの方法は、あるＣａｓ９ホモログのＮ末端断片を別のＣａｓ９ホモログのＣ末端断片と融合することを含み得る。これらの方法はまた、キメラＣａｓ９タンパク質が示す新規特性の選択も可能にする。

【００２４】

本方法において、生物が動物または植物である場合、改変はエキソビボまたはインビトロ、例えば細胞培養物で、場合によってはインビボではなく行われ得ることは理解されるであろう。他の実施形態では、改変はインビボで行われ得る。

【００２５】

一態様において、本発明は、

Ａ）－Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ＲＮＡポリヌクレオチド配列、場合によりキメラＲＮ

Ａ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列であって、
（ａ）真核細胞中の標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、
（ｂ）ｔｒａｃｒメイト配列、および
（ｃ）ｔｒａｃｒ配列
を含み得るポリヌクレオチド配列、および
ＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列
［（ａ）、（ｂ）および（ｃ）は、５’から３’配向で配置されており、
転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、および
ＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、かつＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡである］、
または
（Ｂ）Ｉ．ポリヌクレオチドであって、
（ａ）真核細胞中の標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、および
（ｂ）少なくとも１つ以上のｔｒａｃｒメイト配列
を含み得るポリヌクレオチド、
ＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列、および
ＩＩＩ．ｔｒａｃｒ配列を含み得るポリヌクレオチド配列
［転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、および
ＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、およびＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡである］
を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達することを含む目的ゲノム遺伝子座における標的配列の操作により生物または非ヒト生物を改変する方法を提供する。

【００２６】
本明細書に提供される態様の一部または全部に適用可能な一部の実施形態では、上記第２の選択肢（Ｂ）が好ましい。しかしながら、第１の選択肢（Ａ）が特に好ましい。これは、２つの選択肢のＣＲＩＳＰＲ手法を特徴とする本発明の全ての態様に当てはまる。

【００２７】
本出願は、器官それ自体であるか、それともその中の組織または単に１つ以上の標的細胞であるかに関わらず、ウイルスベクター送達に関することが理解されるであろう。標的細胞は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の送達に関して選択されるものである。例えば、肝臓への送達の場合、かかる標的細胞はヘパトサイト、好ましくは初代ヘパトサイトであり得る。標的細胞は、脊椎動物内、患者（ＣＲＩＳＰＲ指向遺伝子療法を必要としている動物という意味で）またはモデル生物のいずれかの中に含まれていてもよく、または細胞培養物、オルガノイド、もしくは例えばヘパトサイトを足場に播種して成長させる「オンチップ肝臓」のような他のエキソビボ組織にあってもよい。非移植器官から採取されたヘパトサイトもまた、有用な標的細胞である。３Ｄプリント技術の開発が生物学に適用されることに伴い、プリントされた組織が手の届く範囲にあり、オルガノイドの作成のためこのようにしてプリントされるかまたはチップ上にある肝細胞または組織もまたターゲティングされ得ることが完全に実現可能である。本明細書におけるヘパトサイトの考察は、他の肝細胞および実に一般に他の細胞型、例えば脳細胞または腎細胞（本明細書に例が提供される）にも等しく適用され得る。

【００２８】

従って、本ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系が送達されている肝細胞、例えばヘパトサイトを含み得るモデル生物が提供される。同様に、本ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系が送達されている２つ以上の肝細胞、例えばヘパトサイトのエキソビボ集合もまた提供される。かかる集合には、肝臓器官、肝臓オルガノイド、足場に増殖する肝細胞（「オンチップ肝臓」）が含まれ得る。この場合もまた、当然ながら脳（ｂｒａｎ）または腎臓などの非肝臓代替物が想定されるが、肝臓が好ましく、それがここに例として提供される。かかるモデルまたは集合の作成方法もまた提供される。

【００２９】

詳細には、かかる標的細胞はＣａｓ酵素を発現し得るか、またはそれの発現能を有するポリヌクレオチドを含み得る。本明細書で考察するとおり、これには、ノックダウンを含めた遺伝子摂動を通じて遺伝子機能を調べるための既製のモデルが提供されるという利点がある。これは特に、肝臓の病態、例えばアミロイドーシスおよび本明細書に列挙される他の病態、ならびに肥満症などのより広義の病態を研究する際に有用である。

【００３０】

肝臓遺伝子機能を調べる方法もまた本明細書に提供される。これらは、典型的にはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系をインビボまたはエキソビボのいずれかで標的細胞に送達するステップを含む。しかしながら、細胞がＣａｓを既に含む場合、それがタンパク質として発現するのか、それともその細胞内に既に含まれるポリヌクレオチドによりコードされるのかに関わらず、ＣＲＩＳＰＲポリヌクレオチドのみを送達すればよい。この方法は、本明細書で考察するとおりの標的組織、器官、オルガノイド、チップまたは細胞集合からの抽出、および場合によりそこへの再挿入を含み得る。送達するとは、細胞の核にポリヌクレオチドを実際に物理的に送達することを意味するとともに、形質移入もまた意味する。

【００３１】

遺伝子治療方法もまた想定される。例えば、本明細書で考察される肝細胞（モデルを含む）において本ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を使用することにより、１つ以上の欠損遺伝子型（例えば単一点突然変異）の補修を達成可能である。肝臓に関連する単一遺伝子病態が特に好ましく、本明細書に例示され、実施例３８を参照されたく、実施例３８ではＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系標的は脂質代謝遺伝子のＡｐｏＢであり、インビボで表現型の変化を誘導するのに有効であった。遺伝子療法で使用される組成物もまた提供される。

【００３２】

ＣＲＩＰＳ－Ｃａｓ技術の適用は広範囲にわたるため、研究および遺伝子療法に関する病態は多数あり、様々である。本明細書には、表Ａ、表Ｂおよび表Ｃを含め、好適な例を提供する。これらのいずれが選択されてもよく、各々が好ましい。限定されないが、特に好ましいいくつかの例は、本明細書に具体的に例示される病態ならびに任意の単一遺伝子病態、特に嚢胞性線維症（ＣＦＴＲ）である。

【００３３】

様々なＣａｓ酵素が想定されるが、Ｃａｓ９が特に好ましく、本出願者らは、ＳａＣａ９について肝臓で特に有効であることを示している。Ｃａｓ酵素がＳａ　Ｃａｓ酵素である場合、Ｓａ由来のｔｒａｃｒ配列もまた好ましい。その場合に好適なＰＡＭはＮＮＧＲＲである。

【００３４】

１つのガイドを使用し得るが、２、３、４個またはそれ以上のガイドによるいわゆる多重化が、遺伝子機能の調査およびモデル作成（複数の遺伝子ノックダウンを提供する）において、また複数の欠陥遺伝子型（単一遺伝子における複数のエラーか、あるいはより高い可能性としては、いくつかの遺伝子にわたり広がる複数のエラー）を補修しようとする遺伝子療法においても、特に有用である。あるいは、２つのガイドによる多重化が、オフターゲット効果を低減するためのデュアルニッカーゼ手法において、または単に、Ｃａｓ動員を確実にするための１つの遺伝子内での複数の標的の選択において有用である。三重および四重ガイドが好ましい。本明細書において遺伝子は、ゲノム遺伝子座と同義的に言及される。

【００３５】
この点で、本明細書に記載されるイントロン手法もまた有用であり、ここではガイドがＣａｓイントロン内に配置される。
【００３６】
好ましい送達手段としては、特にガイドのみを送達しようとする場合、またはガイドを単独で送達しようとする場合に、ＬＮＰなどの、以下にＫａｎａｓｔｙによって記載される方法が挙げられる。しかしながら、レンチウイルスおよびＡＡＶを含めたウイルスベクターが概して好ましい。詳細には、それらは、現在まで成功しているため、肝臓への送達に好ましい。それらの中でＡＡＶ、特に血清型８が好ましく、ＡＡＶ２／８が有効であることが示されている。
【００３７】
一部の好ましい標的病態および遺伝子は、それらが肝臓または腎臓に存在するか、またはそれの病態である限りにおいて、以下のいずれか一つなどの代謝疾患である：アミロイドニューロパチー（ＴＴＲ、ＰＡＬＢ）；アミロイドーシス（ＡＰＯＡ１、ＡＰＰ、ＡＡＡ、ＣＶＡＰ、ＡＤ１、ＧＳＮ、ＦＧＡ、ＬＹＺ、ＴＴＲ、ＰＡＬＢ）；硬変（ＫＲＴ１８、ＫＲＴ８、ＣＩＲＨ１Ａ、ＮＡＩＣ、ＴＥＸ２９２、ＫＩＡＡ１９８８）；嚢胞性線維症（ＣＦＴＲ、ＡＢＣＣ７、ＣＦ、ＭＲＰ７）；糖原病（ＳＬＣ２Ａ２、ＧＬＵＴ２、Ｇ６ＰＣ、Ｇ６ＰＴ、Ｇ６ＰＴ１、ＧＡＡ、ＬＡＭＰ２、ＬＡＭＰＢ、ＡＧＬ、ＧＤＥ、ＧＢＥ１、ＧＹＳ２、ＰＹＧＬ、ＰＦＫＭ）；肝細胞腺腫、１４２３３０（ＴＣＦ１、ＨＮＦ１Ａ、ＭＯＤＹ３）、肝不全、早期発症型、および神経障害（ＳＣＯＤ１、ＳＣＯ１）、肝性リパーゼ欠損症（ＬＩＰＣ）、肝芽腫、癌および癌腫（ＣＴＮＮＢ１、ＰＤＧＦＲＬ、ＰＤＧＲＬ、ＰＲＬＴＳ、ＡＸＩＮ１、ＡＸＩＮ、ＣＴＮＮＢ１、ＴＰ５３、Ｐ５３、ＬＦＳ１、ＩＧＦ２Ｒ、ＭＰＲＩ、ＭＥＴ、ＣＡＳＰ８、ＭＣＨ５；腎髄質嚢胞症（ＵＭＯＤ、ＨＮＦＪ、ＦＪＨＮ、ＭＣＫＤ２、ＡＤＭＣＫＤ２）；フェニルケトン尿症（ＰＡＨ、ＰＫＵ１、ＱＤＰＲ、ＤＨＰＲ、ＰＴＳ）；多嚢胞腎および肝疾患（ＦＣＹＴ、ＰＫＨＤ１、ＡＲＰＫＤ、ＰＫＤ１、ＰＫＤ２、ＰＫＤ４、ＰＫＤＴＳ、ＰＲＫＣＳＨ、Ｇ１９Ｐ１、ＰＣＬＤ、ＳＥＣ６３）。他の好ましい標的としては、以下の任意の１つ以上が挙げられ、以下の１つ以上が挙げられる：ＰＣＳＫ９；Ｈｍｇｃｒ；ＳＥＲＰＩＮＡ１；ＡｐｏＢ；および／またはＬＤＬ。
【００３８】
標的細胞における発現を変化させる方法には、生殖細胞系列の改変は含まれないこともあり、これは倫理的見地から排除され得ることが理解されるであろう。実際、一部の実施形態では幹細胞の形質移入が想定され、確かに好ましいが、特にヘパトサイトで見られるように何らかの再生を示し得るか、またはそれを示すように刺激され得る場合には、非幹細胞（すなわち分裂終了細胞）が特に好ましい。
【００３９】
ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲが、ここでの場合のように、肝臓が真核生物、特に脊椎動物のみに認められる場合には、いずれの場合にも、とりわけ真核生物での使用に特に好ましい。
【００４０】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を使用して表現型の変化を引き起こすことは、とりわけインビボで、特に有利である。
【００４１】
治療上の適用が想定される場合、または標的細胞における他のゲノムエンジニアリングについて、次に補修が必要である場合、ゲノムＤＮＡ標的の続くニッキングまたは開裂、次にＨＤＲ経路を通じた補修が好ましいことは理解されるであろう。遺伝子ノックダウンにはＮＨＥＪが有利であるが、しかしながら治療には、ＨＤＲ経路を通じた補修が好ましい。このような状況では、修復テンプレートを送達することが好ましい。これは、最も好ましくはｓｓＤＮＡであるが、レトロウイルスベクターを介したＲＮＡによって対応するＤＮＡテンプレートを提供することもまた可能である。当業者は、当技術分野の知識に寄与する本明細書の教示から本発明を容易に実施することができ；およびこの点で、当業者

は、当技術分野の知識に寄与する本明細書の教示から、相同アーム長さに関して考慮事項を容易に理解および実現できることが言及される。本明細書に引用されるものを含め、本明細書の発明者Ｚｈａｎｇを含む特許出願および刊行物が挙げられる。修復テンプレートは、好ましくはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の１つ以上のエレメントと同時送達される。

【００４２】

また、少なくとも１つの肝臓遺伝子産物の発現を変化させる方法も提供され、この方法は、細胞標的配列を有し、かつ遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を含有して発現する真核細胞に、

ａ）真核細胞において作動可能な、標的配列とハイブリダイズするＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ガイドＲＮＡをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、および

ｂ）真核細胞において作動可能な、ＩＩ型Ｃａｓ９タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント、

［成分（ａ）および（ｂ）は系の同じまたは異なるベクター上にあり、それによりガイドＲＮＡが標的配列をターゲティングし、かつＣａｓ９タンパク質がＤＮＡ分子を開裂させ、それにより少なくとも１つの肝臓遺伝子産物の発現が変化し；および、Ｃａｓ９タンパク質とガイドＲＮＡとは天然では一緒に存在しない］

を含み得る１つ以上のベクターを含み得るエンジニアリングされた天然に存在しないクラスター化等間隔短鎖回分リピート（ＣＲＩＳＰＲ）－ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ）系を導入するステップを含み得る。

【００４３】

以下での標的への言及は、特に明らかでない限り、遺伝子または細胞、しかし典型的には遺伝子への言及であることが理解されるであろう。

【００４４】

以下は、本発明の全ての態様に等しく適用される。本明細書で肝臓について記載がある場合、それは一般に分裂終了細胞、特に腎臓または脳に言及しているものと理解される。標的配列は、最も好ましくは分裂終了細胞標的配列である。分裂終了細胞は以下の器官のいずれか一つにあるかまたはそれに由来してもよく（すなわちその細胞または細胞型の供給源であってもよく）、あるいは以下の細胞を含むオルガノイドまたはエキソビボモデルまたは細胞集合であってもよい：

腎臓、例えば糸球体細胞；

消化器系、例えば胃、膵臓、十二指腸、回腸および／または結腸；

心臓；

肺；

脳、詳細にはニューロン、および／または一般にＣＮＳ；

眼、例えば網膜組織；

耳、例えば内耳；

皮膚；

筋肉；

骨；および／または

一般に肝臓、しかしながらこれは別の出願の主題でもあるため、一部の実施形態では除外される。

【００４５】

脳および腎臓が特に好ましい。一部の実施形態では、細胞は脳細胞、例えばニューロンである。一部の実施形態では、細胞は腎細胞である。

【００４６】

好ましい腎細胞としては、以下の中の任意の１つ以上が挙げられる：

・　腎糸球体壁細胞；
・　腎糸球体タコ足細胞；
・　腎近位尿細管刷子縁細胞；

・　ヘンレ係締の細い部分の細胞；
・　太い上行脚細胞；
・　腎遠位尿細管細胞；
・　腎集合管細胞；および
・　腎間質細胞。

【００４７】

標的細胞の好ましい例を、例えば、いずれか好ましい「腎臓」または「肝臓」または「骨」または「耳」と題される節にある以下の表、ならびに表Ｂに提供する。これらの標的中の任意の１つ以上が好ましい。実施例１および１８もまた腎細胞を対象とし（分裂終了細胞ではない幹細胞（ｓｔｅｍ　ｃｅｌｓ）ではあるが）、しかしながら送達の教示が適用され得る。

【００４８】

一部の特に好ましい実施形態において、操作は細胞における表現型の変化を引き起こす。

【００４９】

一部の実施形態では、表現型の変化はインビボで細胞において引き起こされ、またはそこで維持され得る。細胞はインビボで形質移入されるか、あるいは抽出されてエキソビボで形質移入された後、同じまたは異なる宿主に再び挿入（移植）し戻される。

【００５０】

ＣＲＩＳＰＲ酵素、および場合によりガイド配列の発現は、例えば、前記分裂終了細胞での酵素および任意選択のガイドの発現能を有する発現カセット内に含まれた、細胞に特異的なプロモーターの制御下にあり得る。換言すれば、ＣＲＩＳＰＲ酵素、および場合によりガイド配列は、標的細胞に特異的な前記プロモーターに作動可能に結合している。

【００５１】

標的細胞は分裂終了細胞であってもよい。とりわけ分裂終了細胞がニューロンである場合、ＡＡＶベクター系が特に好ましい。体細胞もまた好ましい。

【００５２】

ＣＲＩＳＰＲ酵素用プロモーターおよび任意選択のガイド配列用プロモーターは同じであっても、または異なってもよい。

【００５３】

本明細書の考察、特に以下もまた、本明細書に記載される任意の方法、使用または組成物に適用される。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ＲＮＡはキメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）であり得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、複数のキメラおよび／または複数の多ガイド配列と単一ｔｒａｃｒ配列とをさらに含む多重化ＣＲＩＳＰＲ酵素系であり得る。ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の位置で両鎖の開裂を指向するヌクレアーゼであり得る。ＣＲＩＳＰＲ酵素は１つ以上の突然変異を含み得る。ＣＲＩＳＰＲ酵素は、１つ以上の突然変異Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡまたはＤ９８６Ａを含み得る。１つ以上の突然変異はＣＲＩＳＰＲ酵素のＲｕｖＣ１ドメインにあり得る。ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の位置で開裂を指向するニッカーゼであり得る。ニッカーゼは二重ニッカーゼであり得る。少なくとも２つ以上のＮＬＳが好ましい。

【００５４】

ＣＲＩＳＰＲ酵素はＩＩ型、好ましくはＣａｓおよび最も好ましくはＣａｓ９であり得る。ＣａｓまたはＣａｓ９（例えばＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓまたはＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９中の）への言及は、任意のＣａｓ、最も好ましくはＣａｓ９および特にＳａまたはＳｐＣａｓ９（ＤＳＢ、ニッカーゼまたはデュアルニッカーゼ機能を提供するＤ１０Ａなどの全ての突然変異を包含する）であることは理解されるであろう。

【００５５】

ＣＲＩＳＰＲ酵素は触媒ドメインに１つ以上の突然変異を有してもよく、ここでは転写時にｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が、標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、および酵素は機能ドメイ

ンをさらに含む。機能ドメインは転写活性化ドメインであり得る。転写活性化ドメインはＶＰ６４であってもよい。

【００５６】

本方法は、

天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達するステップ

を含む、細胞の目的のゲノム遺伝子座におけるＤＮＡ二重鎖の逆鎖上にある第１および第２の標的配列の操作によってオフターゲット改変を最小限に抑えるステップをさらに含むことができ、組成物は、

Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列であって、

（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得る第１のガイド配列、

（ｂ）第１のｔｒａｃｒメイト配列、

（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、

（ｄ）第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、

（ｅ）第２のｔｒａｃｒメイト配列、および

（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列

を含み、場合により、第１のｔｒａｃｒ配列と第２のガイド配列との間にリンカー配列が存在することで第１のガイド配列と第２のガイド配列とがタンデムになっている、ポリヌクレオチド配列；および

ＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列であって、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）および（ｆ）が５’から３’配向で配置されており、ポリヌクレオチド配列が第１のｔｒａｃｒ配列と第２のガイド配列との間にリンカー配列を含むことで第１のガイド配列と第２のガイド配列とがタンデムになっており、および転写時に第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列がそれぞれ第１および第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつ第１および第２のガイド配列が、それぞれ第１および第２の標的配列に対する第１および第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向する、ポリヌクレオチド配列、

または

ＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメントであって、成分ＩおよびＩＩが系の同じまたは異なるベクター上にあり、転写されると第１のｔｒａｃｒメイト配列が第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつ第１および第２のガイド配列が、それぞれ第１および第２の標的配列に対する第１および第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向する、第２の調節エレメント

を含み、

第１のＣＲＩＳＰＲ複合体は、（１）第１の標的配列にハイブリダイズする第１のガイド配列、および（２）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする第１のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、

第２のＣＲＩＳＰＲ複合体は、（１）第２の標的配列にハイブリダイズする第２のガイド配列、および（２）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする第２のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、

ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡであり、および

第１のガイド配列が第１の標的配列の近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、かつ第２のガイド配列が第２の標的配列の近傍で他方の鎖の開裂を指向して二本鎖切断を誘導し、それによりオフターゲット改変を最小限に抑えることによって生物または非ヒト生物を改変する。

【００５７】

一部の実施形態では、第２の選択肢の上記（Ｂ）が好ましい。しかしながら第１の選択肢（Ａ）が特に好ましい。これは、２つの選択肢のＣＲＩＳＰＲ手法を特徴とする本発明の全ての態様に当てはまる。

【００５８】
本出願は、器官それ自体または器官内の組織または単純に１つの細胞もしくは分裂終了細胞、例えばニューロンのいずれであるかに関わらず、分裂終了細胞に関することは理解されるであろう。ニューロンおよび腎細胞が好ましい。分裂終了細胞は、脊椎動物内、患者（ＣＲＩＳＰＲ指向遺伝子療法を必要としている動物という意味で）またはモデル生物のいずれかの中に含まれていてもよく、または細胞培養物、オルガノイド、もしくは例えば肝細胞を足場に播種して成長させる「オンチップ肝臓」のような他のエキソビボ組織にあってもよい。非移植器官から採取された肝細胞もまた、有用な標的である。３Ｄプリント技術の開発が生物学に適用されることに伴い、プリントされた組織が手の届く範囲にあり、オルガノイドの作成のためこのようにしてプリントされるかまたはチップ上にある肝細胞または組織もまた標的となり得ることが完全に実現可能である。肝臓以外の選択肢もまた、特に腎組織または他の分裂終了細胞／組織について想定される。
【００５９】
従って、本ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系が送達されている分裂終了細胞、例えばニューロンまたは腎細胞を含むモデル生物が提供される。同様に、本ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系が送達されている分裂終了細胞、例えばニューロンまたは腎細胞の２つ以上のエキソビボ集合もまた提供される。かかる集合には、分裂終了器官、オルガノイド、足場に増殖する細胞（「オンチップ腎臓」）が含まれ得る。かかるモデルまたは集合の作成方法もまた提供される。
【００６０】
詳細には、かかる分裂終了細胞は、Ｃａｓ酵素の発現能を有するポリヌクレオチドを発現し得るか、またはそれを含み得る。本明細書で考察するとおり、これには、ノックダウンを含めた遺伝子摂動を通じて遺伝子機能を調べるための既製のモデルが提供されるという利点がある。これは特に、腎臓または脳など、本明細書で列挙するような分裂終了細胞の病態、ならびに肥満症などのより広義の病態を研究する際に有用である。
【００６１】
分裂終了細胞の遺伝子機能を調べる方法もまた本明細書に提供される。これらの方法は、典型的には、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系をインビボあるいはエキソビボで分裂終了細胞に送達するステップを含む。しかしながら、タンパク質として発現しているか、それとも細胞内に既に含まれるポリヌクレオチドによってコードされるかに関わらず、Ｃａｓが細胞に既に含まれる場合にはＣＲＩＳＰＲポリヌクレオチドのみを送達すればよい。この方法は、分裂終了細胞から抽出すること、および場合により、分裂終了細胞に再び挿入し戻すことを含み得る。送達するとは、細胞の核に対するポリヌクレオチドの実際の物理的送達を意味するが、形質移入もまた意味される。従って、送達とは、特に明らかでない限り、形質移入もまた含むものとして読まれなければならない。
【００６２】
また、１つ以上の動物または植物細胞に遺伝子摂動を誘導する方法も提供され、これは、第１の細胞集団に本発明に係るＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を形質導入するステップであって、それにより第１の細胞集団のゲノムを変化させて第２の細胞集団を得るステップを含む。この方法はエキソビボまたはインビトロ、例えば細胞培養であっても、またはエキソビボもしくはインビトロモデル（オルガノイドまたは「オンチップ動物または植物細胞」など）であってもよい。あるいは、この方法はインビボであってもよく、その場合、方法はまた、対象から第１の細胞集団を単離するステップ、および第２の細胞集団を対象に移植する（移植し戻す）ステップも含み得る。遺伝子摂動は、１つ以上、または２つ以上、または３つ以上、または４つ以上の遺伝子に対してであってもよい。遺伝子摂動は、遺伝子機能（すなわちコードされる遺伝子産物の活性）の低下であり得る。これは、例えば、第１の細胞集団のゲノムを変化させて第２の細胞集団を得ることによって誘導してもよく、ここで第２の細胞集団は、第１の細胞集団には存在しない単一遺伝子病態などの欠陥遺伝子型を有する。これは、本明細書で考察するとおりの、欠陥配列を提供する対応する修復テンプレートを必要とし得るか、またはＤＳＢの誘導を介し得る。詳細には、遺伝子摂

動は遺伝子ノックダウンである。一部の実施形態では、動物または植物細胞は、最も好ましくは腎細胞または脳（ニューロン）細胞または肝細胞、例えば初代肝細胞などの分裂終了細胞である。

【００６３】

あるいは、遺伝子摂動は、遺伝子機能（すなわちコードされる遺伝子産物の活性）の増加であり得る。これは、例えば、第１の細胞集団のゲノムを変化させて第２の細胞集団を得ることによって誘導してもよく、ここで第１の細胞集団は、第２の細胞集団には存在しない（すなわちそこでは補修されている）単一遺伝子病態などの欠陥遺伝子型を有する。これは、本明細書で考察するとおりの、補修された配列を提供する対応する修復テンプレートを必要とし得る。

【００６４】

多重化が用いられる場合、１つ以上の遺伝子の減少と１つ以上の遺伝子の増加との混合が想定される。これは、ガイドの１つ以上を（多重体において）提供することによって達成でき、対応する修復テンプレートを使用して機能を低下させ得る一方、ガイドの１つ以上およびそれらの対応するテンプレートを使用して機能を増加させ得る。

【００６５】

また、１つ以上の動物または植物細胞における１つ以上の遺伝子の機能を調べる方法も提供され、この方法は、第１の動物または植物細胞集団中の１つ以上の遺伝子の発現の変化を決定するステップと、前記第１の集団において前記遺伝子摂動を誘導するステップであって、それにより変化したゲノム（または遺伝子型）を有する前記第２の集団を提供するステップと、第２の動物または植物細胞集団中の１つ以上の遺伝子の発現の変化を決定するステップであって、それにより１つ以上の遺伝子の機能を調べるステップとを含む。一部の実施形態では、動物または植物細胞は、最も好ましくは腎細胞または脳（ニューロン）細胞または肝細胞、例えば初代肝細胞などの分裂終了細胞である。

【００６６】

また、モデルおよび前記モデルの作成方法も提供される。モデルは、本明細書に記載されるとおり、動物または植物細胞を含む動物（インビボモデル）であってもよく、またはエキソビボもしくはインビトロモデル、例えば動物または植物のオルガノイドまたは「オンチップ動物または植物細胞」もしくは足場上にある等の動物または植物細胞の集合であってもよい。いずれのモデルの動物または植物細胞も、好ましくはＣａｓ９が形質移入され得る。従って、特に、ＣＲＩＳＰＲ酵素、好ましくはＳａまたはＳｐＣａｓ９などのＣａｓ９を含む１つ以上の動物または植物細胞を含むモデルが提供される。モデル細胞には、本明細書に提供される第２の調節エレメント（これは、少なくとも（ａｔ　ｌｉｓｔ）１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメントである）が形質移入または形質導入されていてもよい。モデルは、上記に記載したとおり、インビボモデルであってもよく、またはエキソビボもしくはインビトロモデルであってもよい。かかるモデルは１つ以上の遺伝子の機能を迅速に調べることが可能であり、なぜなら前記遺伝子の機能に摂動を与えるために、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ポリヌクレオチド配列（前記１つ以上の遺伝子をターゲティングする１つ以上のガイド配列を含む）を送達するだけでよいためである。換言すれば、かかるモデルで遺伝子機能を調べる方法は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ポリヌクレオチド配列（１つ以上のガイド配列を含む）の送達のみを含むことができ、Ｃａｓ（ＣＲＩＳＰＲ酵素）はモデルの細胞に予め提供されている。かかるモデルの作成方法もまた提供され、この方法は、第１の動物または植物細胞集団中の１つ以上の動物または植物細胞に、本明細書に記載されるとおりの少なくとも（ａｔ　ｌｉｓｔ）１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメントを形質導入または形質移入するステップであって、それによりＣＲＩＳＰＲ酵素を含むか、またはそれを発現する１つ以上の第２の動物または植物細胞集団を提供するステップを含む。一部の実施形態では、動物または植物細胞は、最も好ましくは腎細胞または脳（ニューロン）細胞または肝細胞、例えば初代肝細胞などの分裂終了細胞

である。
【００６７】
遺伝子が摂動を受けるモデル、詳細には遺伝子ノックダウンモデルの作成方法もまた提供される。このような方法は、典型的には、本明細書に記載されるとおりの、第１の細胞集団中の１つ以上の遺伝子に遺伝子摂動を誘導するステップであって、それにより変化したゲノム（または遺伝子型）を有する第２の細胞集団を提供するステップを含み得る。次に第２の細胞集団が足場内またはチップ上に播種され、例えばそれによりエキソビボまたはインビトロモデルが提供され得る。あるいは、第２の集団はインビボ動物体内に含まれていてもよい。
【００６８】
遺伝子療法の方法もまた想定される。例えば、本明細書で考察される分裂終了細胞（モデルを含む）において本ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を使用することによって、１つ以上の欠損遺伝子型（例えば単一点突然変異）の補修を達成することができる。分裂終了細胞に関連する単一遺伝子病態が特に好ましく、本明細書に例示されており、実施例３６を参照されたく、ここではＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系標的は脂質代謝遺伝子ＡｐｏＢであり、インビボで表現型の変化を誘導するのに有効であった。実施例３８もまた、本系を形質導入したマウスの脳においてインビボで認められる表現型行動変化に関して示唆的である。遺伝子療法で使用される組成物もまた提供される。
【００６９】
様々なＣａｓ酵素が想定されるが、Ｃａｓ９が特に好ましく、本発明者らはＳａＣａ９が肝臓において特に有効であることを明らかにしている。Ｃａｓ酵素がＳａ　Ｃａｓ酵素である場合、Ｓａ由来のｔｒａｃｒ配列もまた好ましい。かかる状況で好適なＰＡＭは、ＮＮＧＲＲである。
【００７０】
１つのガイドを使用し得るが、２つ、３つ、４つまたはそれ以上のガイドによるいわゆる多重化が、遺伝子機能の研究およびモデル作成（それによる複数の遺伝子ノックダウンの提供）に特に有用であり、しかしながら複数の欠陥遺伝子型（単一遺伝子中の複数のエラーか、あるいはより高い可能性としては、いくつかの遺伝子にわたって散在する複数のエラー）が補修されるべき遺伝子療法においてもまた有用である。あるいは、オフターゲット効果を低減するためのデュアルニッカーゼ手法または単純にＣａｓ動員を確実にするための１つの遺伝子内の複数の標的の選択において、２つのガイドによる多重化が有用である。三重および四重ガイドが好ましい。本明細書における遺伝子はゲノム遺伝子座と同義的に言及される。
【００７１】
この点で、本明細書に記載されるイントロン手法もまた有用であり、ここではガイドがＣａｓイントロン内に位置する。
【００７２】
好ましい送達手段としては、特にガイドのみを送達するべきであるか、またはガイドを単独で送達するべきである場合に、ＬＮＰなど、以下のＫａｎａｓｔｙにより記載される方法が挙げられる。しかしながら、肝臓にはレンチウイルスおよびＡＡＶを含むウイルスベクターが、これらは今日に至るまで成功していることから概して好ましい。これらの中ではＡＡＶ、特に血清型８型が好ましく、ＡＡＶ２／８は有効であることが示されている。一部の好ましい標的は、それが腎臓に存在するか、または腎臓の病態である限りにおいて、以下のいずれか一つのような代謝疾患である：アミロイドニューロパチー（ＴＴＲ、ＰＡＬＢ）；アミロイドーシス（ＡＰＯＡ１、ＡＰＰ、ＡＡＡ、ＣＶＡＰ、ＡＤ１、ＧＳＮ、ＦＧＡ、ＬＹＺ、ＴＴＲ、ＰＡＬＢ）；硬変（ＫＲＴ１８、ＫＲＴ８、ＣＩＲＨ１Ａ、ＮＡＩＣ、ＴＥＸ２９２、ＫＩＡＡ１９８８）；嚢胞性線維症（ＣＦＴＲ、ＡＢＣＣ７、ＣＦ、ＭＲＰ７）；糖原病（ＳＬＣ２Ａ２、ＧＬＵＴ２、Ｇ６ＰＣ、Ｇ６ＰＴ、Ｇ６ＰＴ１、ＧＡＡ、ＬＡＭＰ２、ＬＡＭＰＢ、ＡＧＬ、ＧＤＥ、ＧＢＥ１、ＧＹＳ２、ＰＹＧＬ、ＰＦＫＭ）；肝細胞腺腫、１４２３３０（ＴＣＦ１、ＨＮＦ１Ａ、ＭＯＤＹ３）、肝

不全、早期発症型、および神経障害（ＳＣＯＤ１、ＳＣＯ１）、肝性リパーゼ欠損症（ＬＩＰＣ）、肝芽腫、癌および癌腫（ＣＴＮＮＢ１、ＰＤＧＦＲＬ、ＰＤＧＲＬ、ＰＲＬＴＳ、ＡＸＩＮ１、ＡＸＩＮ、ＣＴＮＮＢ１、ＴＰ５３、Ｐ５３、ＬＦＳ１、ＩＧＦ２Ｒ、ＭＰＲＩ、ＭＥＴ、ＣＡＳＰ８、ＭＣＨ５；腎髄質嚢胞症（ＵＭＯＤ、ＨＮＦＪ、ＦＪＨＮ、ＭＣＫＤ２、ＡＤＭＣＫＤ２）；フェニルケトン尿症（ＰＡＨ、ＰＫＵ１、ＱＤＰＲ、ＤＨＰＲ、ＰＴＳ）；多嚢胞腎および肝疾患（ＦＣＹＴ、ＰＫＨＤ１、ＡＲＰＫＤ、ＰＫＤ１、ＰＫＤ２、ＰＫＤ４、ＰＫＤＴＳ、ＰＲＫＣＳＨ、Ｇ１９Ｐ１、ＰＣＬＤ、ＳＥＣ６３）。他の好ましい（ｐｒｅｆｆｅｒｅｄ）標的としては、以下のうちの任意の１つ以上が挙げられる：ＰＣＳＫ９、ＨＭＧＣＲ、ＡＰＯＢ、ＬＤＬＲ、ＡＮＧＰＴＬ３、Ｆ８、Ｆ９／ＦＩＸ、ＡＡＴ、ＦＡＨ、ＨＰＤ、ＴＡＴ、ＡＴＰ７Ｂ、ＵＧＴ１Ａ１、ＯＴＣ、ＡＲＨ。

【００７３】

分裂終了細胞の発現を変化させる方法には、生殖細胞系列の改変は含まれず、これは倫理的見地から排除され得ることが理解されるであろう。実際、一部の実施形態では幹細胞の形質移入が想定され、確かに好ましいが、特に何らかの再生を示し得るか、またはそれを示すように刺激され得る場合には、ニューロンまたは腎細胞が特に好ましい。

【００７４】

ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲは、特にここでの場合のように、肝臓が真核生物、特に脊椎動物のみに認められる場合には、いずれの場合にも、真核生物での使用に特に好ましい。

【００７５】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を使用して表現型の変化を引き起こすことは、とりわけインビボで、特に有利である。本発明者らは本出願においてこれを示している。

【００７６】

治療上の適用が想定される場合、または分裂終了細胞における他のゲノムエンジニアリングについて、次に補修が必要である場合、ゲノムＤＮＡ標的の以下のニッキングまたは開裂、次にＨＤＲ経路を通じた補修が好ましいことは理解されるであろう。遺伝子ノックダウンにはＮＨＥＪが有利であるが、しかしながら治療には、ＨＤＲ経路を通じた補修が好ましい。このような状況では、修復テンプレートを送達することが好ましい。これは、最も好ましくはｓｓＤＮＡであるが、レトロウイルスベクターを介したＲＮＡによる対応するＤＮＡテンプレートの提供もまた可能である。当業者は、当該技術分野の知識に寄与する本明細書の教示から本発明を容易に実施することができ；およびこの点で、当業者は、当該技術分野の知識に寄与する本明細書の教示から、相同アーム長さに関して考慮事項を容易に理解および実現できることが言及される。本明細書に引用されるものを含め、本明細書の発明者Ｚｈａｎｇを含む特許出願および刊行物が挙げられる。修復テンプレートは、好ましくはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の１つ以上のエレメントと同時送達される。

【００７７】

また、少なくとも１つの分裂終了細胞遺伝子産物の発現を変化させる方法も提供され、この方法は、標的配列を有し、かつ遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を含有して発現する真核生物肝細胞、例えば肝実質細胞に、

ａ）真核細胞において作動可能な、標的配列とハイブリダイズするＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、および

ｂ）真核細胞において作動可能な、ＩＩ型Ｃａｓ９タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント

［成分（ａ）および（ｂ）は系の同じまたは異なるベクター上にあり、それによりガイドＲＮＡが標的配列を標的にし、かつＣａｓ９タンパク質がＤＮＡ分子を開裂させ、それにより少なくとも１つの分裂終了細胞遺伝子産物の発現が変化し；および、Ｃａｓ９タンパク質とガイドＲＮＡとは天然では一緒に存在しない］

を含む１つ以上のベクターを含むエンジニアリングされた天然に存在しないクラスター化等間隔短鎖回分リピート（ＣＲＩＳＰＲ）－ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）（ＣＲＩＳＰＲ

－Ｃａｓ）系を導入するステップを含む。以下での標的への言及は、特に明らかでない限り、分裂終了細胞標的または本来分裂終了細胞で発現する遺伝子であることが理解されるであろう。ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列、ガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列またはｔｒａｃｒ配列の一部または全部がＲＮＡであってもよい。ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする配列、ガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列またはｔｒａｃｒ配列をコードするポリヌクレオチドはＲＮＡであってもよく、リポソーム、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃によって送達されてもよい。

【００７８】

ＲＮＡであり、かつｔｒａｃｒメイト配列などの特徴を「含む」と言われるポリヌクレオチドが参照される場合、ＲＮＡ配列がその特徴を含むことは理解されるであろう。ポリヌクレオチドがＤＮＡであり、かつｔｒａｃｒメイト配列などの特徴を含むと言われる場合、ＤＮＡ配列は、問題となるその特徴を含むＲＮＡに転写されまたは転写されることができる。特徴がＣＲＩＳＰＲ酵素などのタンパク質である場合、参照されるＤＮＡまたはＲＮＡ配列は（ＤＮＡの場合には初めに転写されてから）翻訳され、または翻訳されることができる。

【００７９】

従って、特定の実施形態では本発明は、組成物を発現させるためその組成物を作動可能にコードする１つ以上のウイルスまたはプラスミドベクターを含むウイルスまたはプラスミドベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達することを含む目的ゲノム遺伝子座における標的配列の操作により、ヒトを含む生物、例えば哺乳動物または非ヒト哺乳動物もしくは生物を改変する（例えば、生物の分裂終了細胞を改変することによる）方法を提供し、ここで組成物は以下を含む：（Ａ）Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列であって、（ａ）真核細胞中の標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、（ｂ）ｔｒａｃｒメイト配列、および（ｃ）ｔｒａｃｒ配列を含むポリヌクレオチド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、およびＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含む（または場合により一部の実施形態のとおり少なくとも１つ以上の核局在化配列がＮＬＳを含まなくてもよい）ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント［（ａ）、（ｂ）および（ｃ）は、５’から３’配向で配置されており、成分ＩおよびＩＩは、系の同じまたは異なるベクター上にあり、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、およびＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物、または（Ｂ）Ｉ．（ａ）真核細胞中の標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、および（ｂ）少なくとも１つ以上のｔｒａｃｒメイト配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、ＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント、およびＩＩＩ．ｔｒａｃｒ配列に作動可能に結合している第３の調節エレメント［成分Ｉ、ＩＩおよびＩＩＩは系の同じまたは異なるベクター上にあり、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、およびＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物。一部の実施形態では、成分Ｉ、ＩＩおよびＩＩＩは同じベクター上にある。他の実施形態では、成分ＩおよびＩＩが同じベクター上にあり、一方で成分ＩＩＩが別のベクター上にある。他の実施形態では、成分ＩおよびＩＩＩが同じベクター上にあり、一方で成分ＩＩが別のベクター上にある。他の実施形態では、成分ＩＩおよびＩＩＩが同じベクター上にあり、一方で成分Ｉが別のベクター上にある。他の実施形態

では、成分Ｉ、ＩＩおよびＩＩＩの各々が異なるベクター上にある。本発明はまた、本明細書に記載されるとおりのウイルスまたはプラスミドベクター系も提供する。

【００８０】

好ましくは、ベクターはレンチウイルスまたはバキュロウイルスまたは好ましくはアデノウイルス／アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターであるが、他の送達手段が公知であり（酵母系、微小胞、遺伝子銃／ベクターを金ナノ粒子と結合させる手段など）、および提供される。一部の実施形態では、ウイルスまたはプラスミドベクターの１つ以上がリポソーム、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃によって送達され得る。

【００８１】

標的配列の操作とは、本出願人らは標的配列の後成的操作も意味する。これは、標的配列のメチル化状態の改変（すなわちメチル化またはメチル化パターンまたはＣｐＧ島の付加または除去）、ヒストン改変、標的配列への接触可能性の増加または低減によるか、または三次元折り畳みの促進などによる、標的配列のクロマチン状態の操作であってもよい。

【００８２】

目的ゲノム遺伝子座における標的配列の操作によりヒトを含む生物もしくは哺乳動物または非ヒト哺乳動物もしくは生物を改変する方法が参照される場合、これは生物（または哺乳動物）に全体として適用されても、または（その生物が多細胞生物である場合）当該の生物由来の単一細胞もしくは細胞集団だけに適用されてもよいことは理解されるであろう。例えばヒトの場合、本出願人らは特に単一細胞または細胞集団を想定し、それらは好ましくはエキソビボで改変されて、次に再び導入され得る。この場合、生検または他の組織試料もしくは生体液試料が必要となり得る。これに関して幹細胞もまた特に好ましい。しかし、当然ながらインビボ実施形態もまた想定される。

【００８３】

特定の実施形態では本発明は、目的ゲノム遺伝子座中の標的配列の異常により引き起こされる病態を治療または阻害が必要とされる対象（例えば哺乳動物またはヒト）または非ヒト対象（例えば哺乳動物）における目的ゲノム遺伝子座中の標的配列の異常により引き起こされる病態を治療または阻害する方法を提供し、この方法は、標的配列を操作することにより対象または非ヒト対象を改変することを含み、ここで病態は、組成物を発現させるためその組成物を作動可能にコードする１つ以上のＡＡＶまたはレンチウイルスベクターを含むＡＡＶまたはレンチウイルスベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達することを含む治療を提供することを含む標的配列の操作による治療または阻害に感受性があり、標的配列は発現時の組成物により操作され、組成物は以下を含む：（Ａ）Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列であって、（ａ）真核細胞中の標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、（ｂ）ｔｒａｃｒメイト配列、および（ｃ）ｔｒａｃｒ配列を含むポリヌクレオチド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、およびＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含む（または場合により一部の実施形態のとおり少なくとも１つ以上の核局在化配列がＮＬＳを含まなくてもよい）ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント［（ａ）、（ｂ）および（ｃ）は、５’から３’配向で配置されており、成分ＩおよびＩＩは、系の同じまたは異なるベクター上にあり、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、およびＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物、または（Ｂ）Ｉ．（ａ）真核細胞中の標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、および（ｂ）少なくとも１つ以上のｔｒａｃｒメイト配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、ＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする

酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント、およびＩＩＩ．ｔｒａｃｒ配列に作動可能に結合している第３の調節エレメント［成分Ｉ、ＩＩおよびＩＩＩは系の同じまたは異なるベクター上にあり、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、およびＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物。一部の実施形態では、成分Ｉ、ＩＩおよびＩＩＩは同じベクター上にある。他の実施形態では、成分ＩおよびＩＩが同じベクター上にあり、一方で成分ＩＩＩが別のベクター上にある。他の実施形態では、成分ＩおよびＩＩＩが同じベクター上にあり、一方で成分ＩＩが別のベクター上にある。他の実施形態では、成分ＩＩおよびＩＩＩが同じベクター上にあり、一方で成分Ｉが別のベクター上にある。他の実施形態では、成分Ｉ、ＩＩおよびＩＩＩの各々が異なるベクター上にある。本発明はまた、本明細書に記載されるとおりのウイルス（例えばＡＡＶまたはレンチウイルス）ベクター系も提供し、および本明細書に記載されるとおりのベクター系の一部であり得る。

【００８４】

本発明の一部の方法は、発現を誘導するステップを含み得る。本発明の一部の方法は、生物または対象は、真核生物（ヒトを含めた哺乳動物を含む）または非ヒト真核生物または非ヒト動物または非ヒト哺乳動物であるものとする。一部の実施形態では、生物または対象は非ヒト動物であり、節足動物、例えば昆虫であってもよく、または線虫であってもよい。本発明の一部の方法において、生物または対象は植物である。本発明の一部の方法において、生物または対象は哺乳動物または非ヒト哺乳動物である。非ヒト哺乳動物は、例えばげっ歯類（好ましくはマウスまたはラット）、有蹄類、または霊長類であってもよい。本発明の一部の方法において、生物または対象は微細藻類を含むも類藻類であり、または真菌である。本発明の一部の方法において、ウイルスベクターはＡＡＶまたはレンチウイルスであり、本明細書に記載されるとおりのベクター系の一部であり得る。本発明の一部の方法において、ＣＲＩＳＰＲ酵素はＣａｓ９である。本発明の一部の方法において、ガイド配列の発現はＴ７プロモーターの制御下にあり、Ｔ７ポリメラーゼの発現によって駆動される。

【００８５】

一部の実施形態における本発明は、ＣＲＩＳＰＲ酵素を送達する方法を包含し、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡを細胞に送達することを含む。これらの方法の一部においてＣＲＩＳＰＲ酵素はＣａｓ９である。

【００８６】

本発明はまた、本発明のベクター系、詳細には本明細書に記載されるとおりのウイルスベクター系を調製する方法も提供する。一部の実施形態における本発明は、本発明のＡＡＶを調製する方法を包含し、この方法は、ＡＡＶをコードする１つまたは複数の核酸分子を含有するまたはそれから本質的になる１つまたは複数のプラスミドをＡＡＶ感染細胞に形質移入すること、およびＡＡＶの複製およびパッケージングに必須のＡＡＶ　ｒｅｐおよび／またはｃａｐを供給することを含む。一部の実施形態では、ＡＡＶの複製およびパッケージングに必須のＡＡＶ　ｒｅｐおよび／またはｃａｐは、細胞に１つまたは複数のヘルパープラスミドまたは１つまたは複数のヘルパーウイルスを形質移入することにより供給される。一部の実施形態ではヘルパーウイルスはポックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはバキュロウイルスである。一部の実施形態ではポックスウイルスはワクシニアウイルスである。一部の実施形態では細胞は哺乳類細胞である。および一部の実施形態では細胞は昆虫細胞であり、ヘルパーウイルスはバキュロウイルスである。他の実施形態では、ウイルスはレンチウイルスである。

【００８７】

植物では、病原体は多くの場合に宿主特異的である。例えば、フザリウム・オキシスポ

ラム・ｆ・エスピー・リコペルシシ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ　ｆ．ｓｐ．ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｉ）はトマト萎凋病を引き起こすが、攻撃するのはトマトのみであり、Ｆ．オキシスポラム・ｆ・ジアンチ（Ｆ．ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ　ｆ．ｄｉａｎｔｈｉｉ）、プクシニア・グラミニス・ｆ・エスピー・トリチシ（Ｐｕｃｃｉｎｉａ　ｇｒａｍｉｎｉｓ　ｆ．ｓｐ．ｔｒｉｔｉｃｉ）はコムギのみを攻撃する。植物は既存の誘導防御を有して多くの病原体に抵抗する。特に病原体が植物より高い頻度で複製することに伴い、植物世代間での突然変異および組換えイベントが、感受性を生じさせる遺伝的変異性をもたらす。植物には非宿主抵抗性が存在することもあり、例えばその宿主と病原体とが適合しない。また、水平抵抗性、例えば、典型的には多くの遺伝子によって制御される、あらゆる病原体系統に対する部分抵抗性、および垂直抵抗性、例えば、典型的には数個の遺伝子によって制御される、他の系統に対しては存在しない、一部の病原体系統に対する完全抵抗性も存在し得る。遺伝子対遺伝子レベルでは、植物と病原体とは共に進化し、一方の遺伝的変化が他方の変化と均衡する。従って、育種家は自然変異性を用いて、収穫量、品質、均一性、耐寒性、抵抗性に関して最も有用な遺伝子をかけ合わせる。抵抗性遺伝子の供給源には、天然または外来品種、在来品種、野生植物の近縁種、および誘発突然変異（例えば突然変異誘発物質による植物材料の処理）が含まれる。本発明を用いることで、突然変異を誘発する新規の手段が植物育種家に提供される。従って、当業者は抵抗性遺伝子の供給源のゲノムを分析し、かつ所望の特性または形質を有する品種において本発明を用いることにより、これまでの突然変異誘発物質より高い精度で抵抗性遺伝子の産生を誘発し、ひいては植物育種プログラムを加速させ、および改善することができる。

【００８８】

本発明は、医薬または治療において使用される本発明の組成物またはそのＣＲＩＳＰＲ酵素（それに加えてまたは代えてＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡ）をさらに包含する。一部の実施形態では本発明は、本発明に係る方法において使用される本発明に係る組成物またはそのＣＲＩＳＰＲ酵素（それに加えてまたは代えてＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡ）を包含する。一部の実施形態では本発明は、エキソビボ遺伝子またはゲノム編集における本発明の組成物またはそのＣＲＩＳＰＲ酵素（それに加えてまたは代えてＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡ）の使用を提供する。特定の実施形態では本発明は、エキソビボ遺伝子またはゲノム編集用医薬の製造におけるまたは本発明に係る方法において使用される本発明の組成物またはそのＣＲＩＳＰＲ酵素（それに加えてまたは代えてＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡ）の使用を包含する。本発明は、一部の実施形態では、特にＣａｓ９が化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）または黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９である（またはそれに由来する）場合に、５’－モチーフを含むＰＡＭ（プロトスペーサー隣接モチーフ）配列が標的配列の３’末端に隣接する本発明の組成物またはそのＣＲＩＳＰＲ酵素（それに加えてまたは代えてＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡ）を包含する。例えば、好適なＰＡＭは、以下に記載するとおり、それぞれＳｐＣａｓ９またはＳａＣａｓ９酵素（または誘導酵素）に対する５’－ＮＲＧまたは５’－ＮＮＧＲＲ（式中Ｎは任意のヌクレオチドである）である。

【００８９】

ＳｐＣａｓ９またはＳａＣａｓ９は、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）または黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９に由来するものまたはそれから得られるものであることは理解されるであろう。当然ながらそれは、本明細書に記載されるとおり、使用目的に合わせて野生型から突然変異しているか、または他の形で変化している。デュアルニッカーゼＤ１０Ａ突然変異体または変異体が、同じ染色体の異なる鎖上の対向する部位を指向する２つのオーバーラップガイドとの組み合わせでは特に、好ましい。

【００９０】

本発明の態様（ａｐｅｃｔｓ）は、ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えばＣａｓ９が媒介する遺伝子ターゲティングの特異性を改善すること、およびＣＲＩＳＰＲ酵素、例えばＣａｓ９によるオフターゲット改変の可能性を低減することを包含する。一部の実施形態における本発明は、以下を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達するこ

とを含む細胞の目的ゲノム遺伝子座におけるＤＮＡ二重鎖の逆鎖上にある第１および第２の標的配列の操作によってオフターゲット改変を最小限に抑えることにより生物または非ヒト生物を改変する方法を含み得る：

Ｉ．第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列、この第１のポリヌクレオチド配列は以下を含む：

（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得る第１のガイド配列、

（ｂ）第１のｔｒａｃｒメイト配列、および

（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、

ＩＩ．第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ｃｈｉＲＮＡポリヌクレオチド配列、この第２のポリヌクレオチド配列は以下を含み得る：

（ａ）第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、

（ｂ）第２のｔｒａｃｒメイト配列、および

（ｃ）第２のｔｒａｃｒ配列、および

ＩＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含み、かつ１つ以上の突然変異を含み得るＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列、ここで（ａ）、（ｂ）および（ｃ）は、５’から３’配向で配置されており、転写されると第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列がそれぞれ第１および第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつ第１および第２のガイド配列がそれぞれ第１および第２の標的配列への第１および第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、第１のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第１の標的配列にハイブリダイズする第１のガイド配列、および（２）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする第１のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、第２のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第２の標的配列にハイブリダイズする第２のガイド配列、および（２）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする第２のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡであり、および第１のガイド配列が第１の標的配列の近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、かつ第２のガイド配列が第２の標的配列の近傍で他方の鎖の開裂を指向して二本鎖切断を誘導し、従ってオフターゲット改変を最小限に抑えることにより生物または非ヒト生物を改変する。

【００９１】

本発明の一部の方法において、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列、第１および第２のガイド配列、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列または第１および第２のｔｒａｃｒ配列の一部または全部がＲＮＡである。本発明のさらなる実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする配列、第１および第２のガイド配列、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列または第１および第２のｔｒａｃｒ配列をコードするポリヌクレオチドはＲＮＡであり、リポソーム、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃によって送達される。本発明の特定の実施形態では、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列は１００％の同一性を共有し、および／または第１および第２のｔｒａｃｒ配列は１００％の同一性を共有する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、１つ以上のベクターを含むベクター系中に含まれ得る。本発明の好ましい実施形態においてＣＲＩＳＰＲ酵素はＣａｓ９酵素、例えばＳｐＣａｓ９である。本発明の態様においてＣＲＩＳＰＲ酵素は触媒ドメインに１つ以上の突然変異を含み、この１つ以上の突然変異は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される。極めて好ましい実施形態においてＣＲＩＳＰＲ酵素はＤ１０Ａ突然変異を有する。好ましい実施形態において、第１のＣＲＩＳＰＲ酵素は、その酵素が相補鎖ニッキング酵素となるような１つ以上の突然変異を有し、第２のＣＲＩＳＰＲ酵素は、その酵素が非相補鎖ニッキング酵素となるような１つ以上の突然変異を有する。あるいは、第１の酵素が非相補鎖ニッキング酵素であってもよく、および第２の酵素が相補鎖ニッキング酵素であってもよい。

【００９２】

本発明の好ましい方法において、第１のガイド配列が第１の標的配列の近傍でＤＮＡ二

重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、かつ第２のガイド配列が第２の標的配列の近傍で他方の鎖の開裂を指向することにより、５’オーバーハングが生じる。本発明の実施形態において５’オーバーハングは高々２００塩基対、好ましくは高々１００塩基対、またはより好ましくは高々５０塩基対である。本発明の実施形態において５’オーバーハングは少なくとも２６塩基対、好ましくは少なくとも３０塩基対またはより好ましくは３４～５０塩基対である。最も好ましくは、オーバーラップは５～－１塩基対の間である。

【００９３】

一部の実施形態における本発明は、以下を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達することを含む細胞の目的ゲノム遺伝子座におけるＤＮＡ二重鎖の逆鎖上にある第１および第２の標的配列の操作によってオフターゲット改変を最小限に抑えることにより生物または非ヒト生物を改変する方法を包含する

Ｉ．以下に作動可能に結合している第１の調節エレメント

（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得る第１のガイド配列、および

（ｂ）少なくとも１つ以上のｔｒａｃｒメイト配列、

ＩＩ．以下に作動可能に結合している第２の調節エレメント

（ａ）第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、および

（ｂ）少なくとも１つ以上のｔｒａｃｒメイト配列、

ＩＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第３の調節エレメント、および

ＩＶ．ｔｒａｃｒ配列に作動可能に結合している第４の調節エレメント、

ここで成分Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩおよびＩＶは系の同じまたは異なるベクター上にあり、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、第１および第２のガイド配列がそれぞれ第１および第２の標的配列への第１および第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、第１のＣＲＩＳＰＲ複合体は、（１）第１の標的配列にハイブリダイズする第１のガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、第２のＣＲＩＳＰＲ複合体は、（１）第２の標的配列にハイブリダイズする第２のガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡであり、および第１のガイド配列が第１の標的配列の近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、かつ第２のガイド配列が第２の標的配列の近傍で他方の鎖の開裂を指向して二本鎖切断を誘導し、従ってオフターゲット改変を最小限に抑えることにより生物または非ヒト生物を改変する。

【００９４】

本発明はまた、本明細書に記載されるとおりのベクター系も提供する。本系は、１つ、２つ、３つまたは４つの異なるベクターを含み得る。従って成分Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩおよびＩＶは１つ、２つ、３つまたは４つの異なるベクター上にあってもよく、成分の可能な位置のあらゆる組み合わせが本明細書において想定され、例えば：成分Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩおよびＩＶが同じベクター上にあってもよく；成分Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩおよびＩＶが各々異なるベクター上にあってもよく；成分Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩおよびＩＶが全部で２つまたは３つの異なるベクター上にあってもよく、位置のあらゆる組み合わせが想定される等する。

【００９５】

本発明の一部の方法においてＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列、第１および第２のガイド配列、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列または第１および第２のｔｒａｃｒ配列の一部または全部がＲＮＡである。本発明のさらなる実施形態において第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列は１００％の同一性を共有し、および／または第１および第２のｔｒａｃｒ配列は１００％の同一性を共有する。本発明の好ましい実施形態においてＣＲＩＳＰＲ酵素はＣａｓ９酵素、例えばＳｐＣａｓ９である。本発明の態様においてＣＲＩＳＰＲ酵素は触媒ドメインに１つ以上の突然変異を含み、この１つ以上

の突然変異は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される。極めて好ましい実施形態においてＣＲＩＳＰＲ酵素はＤ１０Ａ突然変異を有する。好ましい実施形態において、第１のＣＲＩＳＰＲ酵素は、その酵素が相補鎖ニッキング酵素となるような１つ以上の突然変異を有し、第２のＣＲＩＳＰＲ酵素は、その酵素が非相補鎖ニッキング酵素となるような１つ以上の突然変異を有する。あるいは第１の酵素が非相補鎖ニッキング酵素であってもよく、および第２の酵素が相補鎖ニッキング酵素であってもよい。本発明のさらなる実施形態において、ウイルスベクターの１つ以上はリポソーム、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃によって送達される。

【００９６】

本発明の好ましい方法において、第１のガイド配列が第１の標的配列の近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、かつ第２のガイド配列が第２の標的配列の近傍で他方の鎖の開裂を指向することにより、５’オーバーハングが生じる。本発明の実施形態において５’オーバーハングは高々２００塩基対、好ましくは高々１００塩基対、またはより好ましくは高々５０塩基対である。本発明の実施形態において５’オーバーハングは少なくとも２６塩基対、好ましくは少なくとも３０塩基対またはより好ましくは３４～５０塩基対である。

【００９７】

一部の実施形態における本発明は、目的の遺伝子産物をコードする二本鎖ＤＮＡ分子を含有してそれを発現する細胞に、１つ以上の突然変異を有するＣａｓタンパク質と、ＤＮＡ分子のそれぞれ第１の鎖および第２の鎖を標的にする２つのガイドＲＮＡとを含むエンジニアリングされた天然に存在しないＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を導入することによってオフターゲット改変を最小限に抑えることにより目的ゲノム遺伝子座を改変する方法であって、それによりガイドＲＮＡが、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を標的にし、かつＣａｓタンパク質が、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子の第１の鎖および第２の鎖の各々にニックを入れ、それにより遺伝子産物の発現が変化し；および、Ｃａｓタンパク質と２つのガイドＲＮＡとが天然で一緒に存在することはない、方法を包含する。

【００９８】

本発明の好ましい方法において、Ｃａｓタンパク質が、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子の第１の鎖および第２の鎖の各々にニックを入れることにより、５’オーバーハングが生じる。本発明の実施形態において５’オーバーハングは高々２００塩基対、好ましくは高々１００塩基対、またはより好ましくは高々５０塩基対である。本発明の実施形態において５’オーバーハングは少なくとも２６塩基対、好ましくは少なくとも３０塩基対またはより好ましくは３４～５０塩基対である。

【００９９】

本発明の実施形態はまた、ｔｒａｃｒメイト配列およびｔｒａｃｒ配列に融合したガイド配列を含むガイドＲＮＡも包含する。本発明の態様においてＣａｓタンパク質は、真核細胞、好ましくは哺乳類細胞またはヒト細胞での発現にコドンが最適化される。本発明のさらなる実施形態においてＣａｓタンパク質はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、例えばＣａｓ９タンパク質である。極めて好ましい実施形態においてＣａｓタンパク質はＣａｓ９タンパク質、例えばＳｐＣａｓ９である。本発明の態様ではＣａｓタンパク質は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される１つ以上の突然変異を有する。極めて好ましい実施形態においてＣａｓタンパク質はＤ１０Ａ突然変異を有する。

【０１００】

本発明の態様は、遺伝子産物の発現を低下させること、または遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子にテンプレートポリヌクレオチドがさらに導入されること、または２つの５’オーバーハングをリアニーリングおよびライゲートさせることにより介在配列が正確に切り出されること、または遺伝子産物の活性または機能を変化させること、または遺伝子産物の発現を増加させることに関する。本発明のある実施形態において、遺伝子産物はタン

パク質である。
【０１０１】
本発明はまた、１つ以上の突然変異を有するＣａｓタンパク質と、細胞中の遺伝子産物をコードする二本鎖ＤＮＡ分子のそれぞれ第１の鎖および第２の鎖を標的にする２つのガイドＲＮＡとを含むエンジニアリングされた天然に存在しないＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系であって、それによりガイドＲＮＡが、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を標的にし、かつＣａｓタンパク質が、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子の第１の鎖および第２の鎖の各々にニックを入れ、それにより遺伝子産物の発現が変化し；および、Ｃａｓタンパク質と２つのガイドＲＮＡとが天然で一緒に存在することはない、系も包含する。
【０１０２】
本発明の態様ではガイドＲＮＡは、ｔｒａｃｒメイト配列およびｔｒａｃｒ配列に融合したガイド配列を含み得る。本発明のある実施形態においてＣａｓタンパク質はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質である。本発明の態様においてＣａｓタンパク質は、真核細胞、好ましくは哺乳類細胞またはヒト細胞での発現にコドンが最適化される。本発明のさらなる実施形態においてＣａｓタンパク質はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、例えばＣａｓ９タンパク質である。極めて好ましい実施形態においてＣａｓタンパク質はＣａｓ９タンパク質、例えばＳｐＣａｓ９である。本発明の態様ではＣａｓタンパク質は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される１つ以上の突然変異を有する。極めて好ましい実施形態においてＣａｓタンパク質はＤ１０Ａ突然変異を有する。
【０１０３】
本発明の態様は、遺伝子産物の発現を低下させること、または遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子にテンプレートポリヌクレオチドがさらに導入されること、または２つの５’オーバーハングをリアニーリングおよびライゲートさせることにより介在配列が正確に切り出されること、または遺伝子産物の活性または機能を変化させること、または遺伝子産物の発現を増加させることに関する。本発明のある実施形態において、遺伝子産物はタンパク質である。
【０１０４】
本発明はまた、以下を含む１つ以上のベクターを含むエンジニアリングされた天然に存在しないベクター系も包含する：
ａ）遺伝子産物をコードする二本鎖ＤＮＡ分子のそれぞれ第１の鎖および第２の鎖を標的にする２つのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ガイドＲＮＡの各々に作動可能に結合している第１の調節エレメント、
ｂ）Ｃａｓタンパク質に作動可能に結合している第２の調節エレメント
ここで成分（ａ）および（ｂ）は系の同じまたは異なるベクター上にあり、それによりガイドＲＮＡが、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を標的にし、かつＣａｓタンパク質が、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子の第１の鎖および第２の鎖の各々にニックを入れ、それにより遺伝子産物の発現が変化し；および、Ｃａｓタンパク質と２つのガイドＲＮＡとが天然で一緒に存在することはない。
【０１０５】
本発明の態様ではガイドＲＮＡは、ｔｒａｃｒメイト配列およびｔｒａｃｒ配列に融合したガイド配列を含み得る。本発明のある実施形態においてＣａｓタンパク質はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質である。本発明の態様においてＣａｓタンパク質は、真核細胞、好ましくは哺乳類細胞またはヒト細胞での発現にコドンが最適化される。本発明のさらなる実施形態においてＣａｓタンパク質はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、例えばＣａｓ９タンパク質である。極めて好ましい実施形態においてＣａｓタンパク質はＣａｓ９タンパク質、例えばＳｐＣａｓ９である。本発明の態様ではＣａｓタンパク質は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される１つ以上の突然変異を有する。極めて好ましい実施形態においてＣａｓタンパク質はＤ１０Ａ突然変異を有する。

【０１０６】
本発明の態様は、遺伝子産物の発現を低下させること、または遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子にテンプレートポリヌクレオチドがさらに導入されること、または２つの５’オーバーハングをリアニーリングおよびライゲートさせることにより介在配列が正確に切り出されること、または遺伝子産物の活性または機能を変化させること、または遺伝子産物の発現を増加させることに関する。本発明のある実施形態において、遺伝子産物はタンパク質である。本発明の好ましい実施形態において系のベクターはウイルスベクターである。さらなる実施形態において、系のベクターはリポソーム、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃によって送達される。
【０１０７】
一態様において、本発明は、細胞中の標的ポリヌクレオチドを改変する方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ、それにより標的ポリヌクレオチドを改変することを含み、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、前記ガイド配列は、次いでｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列に結合している。一部の実施形態において、前記開裂は、前記ＣＲＩＳＰＲ酵素により標的配列の局在における１つまたは２つの鎖を開裂することを含む。一部の実施形態において、前記開裂は、標的遺伝子の転写の減少をもたらす。一部の実施形態において、方法は、外因性テンプレートポリヌクレオチドとの相同組換えにより前記開裂標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、前記修復は、前記標的ポリヌクレオチドの１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含む突然変異をもたらす。一部の実施形態において、前記突然変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されるタンパク質中の１つ以上のアミノ酸変化をもたらす。一部の実施形態において、方法は、１つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含み、１つ以上のベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ｔｒａｃｒメイト配列に結合しているガイド配列、およびｔｒａｃｒ配列の１つ以上の発現をドライブする。一部の実施形態において、前記ベクターを対象中の真核細胞中に送達する。一部の実施形態において、前記改変を、細胞培養物中の前記真核細胞中で行う。一部の実施形態において、方法は、前記改変前に前記真核細胞を対象から単離することをさらに含む。一部の実施形態において、方法は、前記真核細胞および／またはそれに由来する細胞を前記対象に戻すことをさらに含む。
【０１０８】
一態様において、本発明は、細胞中のポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、ＣＲＩＳＰＲ複合体をポリヌクレオチドに結合させ、その結果、前記結合が前記ポリヌクレオチドの発現の増加または減少をもたらすことを含み；ＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、前記ガイド配列は、次いでｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列に結合している。一部の実施形態において、方法は、１つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含み、１つ以上のベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ｔｒａｃｒメイト配列に結合しているガイド配列、およびｔｒａｃｒ配列の１つ以上の発現をドライブする。
【０１０９】
一態様において、本発明は、突然変異疾患遺伝子を含むモデル真核細胞を生成する方法を提供する。一部の実施形態において、疾患遺伝子は、疾患を有し、または発症するリスクの増加に関連する任意の遺伝子である。一部の実施形態において、方法は、（ａ）１つ以上のベクターを真核細胞に導入すること（１つ以上のベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ｔｒａｃｒメイト配列に結合しているガイド配列、およびｔｒａｃｒ配列の１つ以上の発現をドライブする）および（ｂ）ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記疾患遺伝子内の標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ（ＣＲＩＳＰＲ複合体は、（１）標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および（

２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされるｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む）、それにより、突然変異疾患遺伝子を含むモデル真核細胞を生成することを含む。一部の実施形態において、前記開裂は、前記ＣＲＩＳＰＲ酵素により標的配列の局在における１つまたは２つの鎖を開裂することを含む。一部の実施形態において、前記開裂は、標的遺伝子の転写の減少をもたらす。一部の実施形態において、方法は、外因性テンプレートポリヌクレオチドとの相同組換えにより前記開裂標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、前記修復は、前記標的ポリヌクレオチドの１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含む突然変異をもたらす。一部の実施形態において、前記突然変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されるタンパク質中の１つ以上のアミノ酸変化をもたらす。

【０１１０】

一態様において、本発明は、１つ以上の原核細胞中の遺伝子中の１つ以上の突然変異を導入することにより１つ以上の原核細胞を選択する方法であって、１つ以上のベクターを原核細胞中に導入すること（１つ以上のベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ｔｒａｃｒメイト配列に結合しているガイド配列、ｔｒａｃｒ配列、および編集テンプレートの１つ以上の発現をドライブし；編集テンプレートは、ＣＲＩＳＰＲ酵素開裂を停止させる１つ以上の突然変異を含む）；編集テンプレートと、選択すべき細胞中の標的ポリヌクレオチドとを相同組換えさせること；ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記遺伝子内の標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ（ＣＲＩＳＰＲ複合体は、（１）標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされるｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、標的ポリヌクレオチドへのＣＲＩＳＰＲ複合体の結合は、細胞死を誘導する）、それにより、１つ以上の突然変異が導入された１つ以上の原核細胞の選択を可能とすることを含む方法を提供する。好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ９である。本発明の別の態様において、選択される細胞は真核細胞、例えば分裂終了真核細胞であってもよい。本発明の態様により、選択マーカーもカウンターセレクション系を含み得る２ステッププロセスも要求しない規定の細胞の選択が可能となる。

【０１１１】

一態様において、本発明は、真核細胞における標的ポリヌクレオチドを改変する方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ、それにより標的ポリヌクレオチドを改変することを含み、ここでＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体形成するＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、前記ガイド配列がｔｒａｃｒメイト配列に結合し、次にはｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする。

【０１１２】

他の実施形態では、本発明は、真核細胞におけるポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。本方法は、そのポリヌクレオチドに結合するＣＲＩＳＰＲ複合体を使用して標的ポリヌクレオチドの発現を増加または低下させることを含む。

【０１１３】

望ましい場合、細胞における発現の改変を達成するため、ｔｒａｃｒ配列、ｔｒａｃｒメイト配列に連結したガイド配列、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする配列を含む１つ以上のベクターが細胞に送達される。一部の方法では、１つ以上のベクターは、核局在化配列を含む前記ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している調節エレメント；およびｔｒａｃｒメイト配列に作動可能に結合している調節エレメントおよびｔｒａｃｒメイト配列の上流にガイド配列を挿入するための１つ以上の挿入部位を含む。ガイド配列は発現すると、細胞中の標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向する。典型的には、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む。

【０１１４】
一部の方法では、細胞における発現の改変を達成するため標的ポリヌクレオチドが不活性化され得る。例えば、細胞中の標的配列にＣＲＩＳＰＲ複合体が結合したとき、配列が転写されないか、コードされたタンパク質が産生されないか、または野生型配列が機能するとおりには配列が機能しないように標的ポリヌクレオチドが不活性化される。例えば、タンパク質が産生されないようにタンパク質またはマイクロＲＮＡコード配列が不活性化され得る。
【０１１５】
特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡまたはＤ９８６Ａからなる群から選択される１つ以上の突然変異を含み、および／または１つ以上の突然変異はＣＲＩＳＰＲ酵素のＲｕｖＣ１またはＨＮＨドメインにあるか、または本明細書において考察されるとおりの他の形の突然変異である。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は触媒ドメインに１つ以上の突然変異を有し、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、およびこの酵素は機能ドメインをさらに含む。一部の実施形態では、機能ドメインは転写活性化ドメイン、好ましくはＶＰ６４である。一部の実施形態では、機能ドメインは転写抑制ドメイン、好ましくはＫＲＡＢである。一部の実施形態では、転写抑制ドメインはＳＩＤ、またはＳＩＤのコンカテマー（例えばＳＩＤ４Ｘ）である。一部の実施形態では、機能ドメインは後成的改変ドメインであり、従って後成的改変酵素が提供される。一部の実施形態では、機能ドメインは活性化ドメインであり、これはＰ６５活性化ドメインであってもよい。
【０１１６】
一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素はＩ型またはＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ酵素であり、しかし好ましくはＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ酵素である。このＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ酵素は任意のＣａｓ酵素であってよい。Ｃａｓ酵素は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系の複数のヌクレアーゼドメインを有する最大のヌクレアーゼと相同性を共有する一般的な酵素クラスを指し得るとおりＣａｓ９と同定され得る。最も好ましくは、Ｃａｓ９酵素はｓｐＣａｓ９またはｓａＣａｓ９由来であり、またはそれから誘導される。誘導されるとは、本出願人らは、その誘導された酵素が野生型酵素と高度な配列相同性を有するという意味では主に野生型酵素をベースとするが、しかしそれは本明細書に記載されるとおり何らかの形で突然変異している（改変されている）ものであることを意味する。
【０１１７】
用語ＣａｓおよびＣＲＩＳＰＲ酵素は、特に明らかでない限り、本明細書では概して同義的に使用されることが理解されるであろう。上述のとおり、本明細書で使用される残基の付番の多くは化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座由来のＣａｓ９酵素を参照する。しかしながら、この発明が、ＳｐＣａｓ９、ＳａＣａ９、Ｓｔ１Ｃａｓ９など、他の微生物種由来のさらに多くのＣａｓ９を含むことは理解されるであろう。
【０１１８】
この場合にはヒトに最適化された（すなわちヒトでの発現に最適化されている）コドン最適化配列の例が本明細書に提供される（ＳａＣａｓ９ヒトコドン最適化配列を参照のこと）。これが好ましいが、他の例が可能であることが理解されるであろうとともに、宿主種に対するコドン最適化は公知である。
【０１１９】
好ましくは、送達はベクターの形態であり、ベクターはレンチウイルスまたはバキュロウイルスまたは好ましくはアデノウイルス／アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターであってもよいが、他の送達手段が公知であり（酵母系、微小胞、遺伝子銃／ベクターを金ナノ粒子と結合させる手段など）、および提供される。ベクターは、ウイルス系または酵母系（例えば、ここでは目的の核酸がプロモーターに作動可能に連結されかつその制御下に（発現の点で、最終的にプロセシングされたＲＮＡを提供するなどのため）

あり得る）を意味するのみならず、また宿主細胞への核酸の直接送達も意味する。本明細書における方法では、ベクターはウイルスベクターであってもよく、これは有利にはＡＡＶであるが、レンチウイルスなど、本明細書で考察するとおりの他のウイルスベクターが用いられてもよい。例えば、昆虫細胞での発現にバキュロウイルスを用いることができる。これらの昆虫細胞は、次には本発明の送達に適しているＡＡＶまたはレンチウイルスベクターなど、さらなるベクターを多量に産生するのに有用となり得る。また、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡを細胞に送達することを含む本ＣＲＩＳＰＲ酵素の送達方法も想定される。特定の実施形態ではＣＲＩＳＰＲ酵素はトランケートされ、および／または１０００個未満のアミノ酸もしくは４０００個未満のアミノ酸を含み、および／またはヌクレアーゼまたはニッカーゼであり、および／またはコドンが最適化され、および／または１つ以上の突然変異を含み、および／またはキメラＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、および／または本明細書で考察するとおりの他の任意選択要素を含むことは理解されるであろう。ＡＡＶおよびレンチウイルスベクターが好ましい。

【０１２０】

特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素、典型的にはＣａｓおよび詳細にはＣａｓ９に好適なＰＡＭが標的配列の３’末端に隣接しまたは後続する。

【０１２１】

例えば、好適なＰＡＭは、それぞれＳｐＣａｓ９またはＳａＣａｓ９酵素（または誘導酵素）に対する５’－ＮＲＧまたは５’－ＮＮＧＲＲである。

【０１２２】

ＳｐＣａｓ９またはＳａＣａｓ９は、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）または黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９由来のものであるかまたはそれから誘導されるものであることは理解されるであろう。

【０１２３】

従って、本出願人らが権利を留保し、かつ本明細書によって任意の以前に公知の産物、プロセス、または方法のディスクレーマー（ｄｉｓｃｌａｉｍｅｒ）を開示するようなこれまでに公知のいかなる産物、その産物の作製プロセス、またはその産物の使用方法も本発明の範囲内に包含しないことが、本発明の目的である。さらに、本発明は、本出願人らが権利を留保し、かつ本明細書によって任意の以前記載された産物、その産物の作製プロセス、またはその産物の使用方法のディスクレーマー（ｄｉｓｃｌａｉｍｅｒ）を開示するような、米国特許商標庁（ＵＳＰＴＯ）（米国特許法第１１２条第一段落）または欧州特許庁（ＥＰＯ）（ＥＰＣ第８３条）の明細書の記載および実施可能要件を満たさないいかなる産物、その産物の作製プロセス、またはその産物の使用方法も本発明の範囲内に包含しないものと意図されることが注記される。

【０１２４】

本開示および特に特許請求の範囲および／または段落において、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含んだ（ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などのような用語は、米国特許法に帰属する意味を有し得；例えば、それらは、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含んだ（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」などを意味し得；「本質的に～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ ｏｆ）」および「本質的に～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｓ ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ ｏｆ）」のような用語は、米国特許法に帰属する意味を有し、例えば、それらは、明示的に記述されない構成要素を許容するが、先行技術に見出され、または本発明の基本もしくは新規特徴に影響する構成要素を排除することが留意される。

【０１２５】

これらのおよび他の実施形態は、以下の詳細な説明により開示され、またはそれから明らかであり、それにより包含される。

【０１２６】

本発明の新規特徴を、特に添付の特許請求の範囲を用いて記載する。本発明の特徴および利点のより良好な理解は、本発明の原理が利用される説明的な実施形態を記載する以下

の詳細な説明、および付属の図面を参照することにより得られる。
【図面の簡単な説明】
【０１２７】
【図１】ＣＲＩＳＰＲ系の模式的モデルを示す。化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）からのＣａｓ９ヌクレアーゼ（黄色）を、２０ｎｔガイド配列（青色）および足場（赤色）からなる合成ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）によりゲノムＤＮＡにターゲティングする。必要な５’－ＮＧＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ；マゼンタ）のすぐ上流のＤＮＡ標的（青色）とのガイド配列塩基対、およびＣａｓ９は、ＰＡＭの約３ｂｐ上流の二本鎖切断（ＤＳＢ）（赤色三角）を媒介する。
【図２Ａ】例示的ＣＲＩＳＰＲ系、考えられる作用機序、真核細胞中の発現の例示的適応、ならびに核局在化およびＣＲＩＳＰＲ活性を評価する試験の結果を示す。
【図２Ｂ】例示的ＣＲＩＳＰＲ系、考えられる作用機序、真核細胞中の発現の例示的適応、ならびに核局在化およびＣＲＩＳＰＲ活性を評価する試験の結果を示す。
【図２Ｃ】例示的ＣＲＩＳＰＲ系、考えられる作用機序、真核細胞中の発現の例示的適応、ならびに核局在化およびＣＲＩＳＰＲ活性を評価する試験の結果を示す。
【図２Ｄ】例示的ＣＲＩＳＰＲ系、考えられる作用機序、真核細胞中の発現の例示的適応、ならびに核局在化およびＣＲＩＳＰＲ活性を評価する試験の結果を示す。
【図２Ｅ－Ｆ】例示的ＣＲＩＳＰＲ系、考えられる作用機序、真核細胞中の発現の例示的適応、ならびに核局在化およびＣＲＩＳＰＲ活性を評価する試験の結果を示す。
【図３Ａ－Ｃ】例示的標的についてのＳｐＣａｓ９特異性の評価の結果を示す。
【図３Ｄ】例示的標的についてのＳｐＣａｓ９特異性の評価の結果を示す。
【図４Ａ－Ｂ】例示的ベクター系および真核細胞中の相同組換えの指向におけるその使用についての結果を示す。
【図４Ｃ－Ｅ】例示的ベクター系および真核細胞中の相同組換えの指向におけるその使用についての結果を示す。
【図４Ｆ】例示的ベクター系および真核細胞中の相同組換えの指向におけるその使用についての結果を示す。
【図４Ｇ】例示的ベクター系および真核細胞中の相同組換えの指向におけるその使用についての結果を示す。
【図５】プロトスペーサー配列の表を提供し、ヒトおよびマウスゲノム中の遺伝子座に対して例示的化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）およびＳ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ系に基づき設計されたプロトスペーサー標的と対応するＰＡＭについての改変効率結果をまとめる。細胞をＣａｓ９およびプレｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡまたはキメラＲＮＡのいずれかにより形質移入し、形質移入から７２時間後に分析した。インデルパーセントは、示された細胞系からのＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイ結果に基づき算出した（全てのプロトスペーサー標的についてＮ＝３、誤差は、標準誤差（Ｓ．Ｅ．Ｍ．）であり、Ｎ．Ｄ．は、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを使用して検出可能でないことを示し、Ｎ．Ｔ．は、本試験において試験しなかったことを示す）。
【図６Ａ－Ｂ】Ｃａｓ９媒介遺伝子ターゲティングについての異なるｔｒａｃｒＲＮＡ転写物の比較を示す。
【図６Ｃ】Ｃａｓ９媒介遺伝子ターゲティングについての異なるｔｒａｃｒＲＮＡ転写物の比較を示す。
【図７】二本鎖切断により誘導された微小挿入および欠失の検出のためのｓｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイの模式図を示す。
【図８Ａ－Ｂ】真核細胞中のＣＲＩＳＰＲ系エレメントの発現のための例示的バイシストロニック発現ベクターを示す。
【図９Ａ－Ｃ】ヒトゲノム中の隣接する化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ＳＦ３７０遺伝子座１ＰＡＭ（ＮＧＧ）（図９Ａ）と、Ｓ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＬＭＤ９遺伝子座２ＰＡＭ（ＮＮＡＧＡＡＷ）（図９Ｂ）との間の距離のヒストグラム；ならびに染色体（Ｃｈｒ）単位のそれぞれのＰＡＭについての距離（図９

Ｃ）を示す。
【図１０Ａ－Ｃ】例示的ＣＲＩＳＰＲ系、真核細胞中の発現のための例示的適応、およびＣＲＩＳＰＲ活性を評価する試験の結果を示す。
【図１０Ｄ】例示的ＣＲＩＳＰＲ系、真核細胞中の発現のための例示的適応、およびＣＲＩＳＰＲ活性を評価する試験の結果を示す。
【図１１Ａ－Ｃ】哺乳動物細胞中のゲノム遺伝子座のターゲティングのためのＣＲＩＳＰＲ系の例示的操作を示す。
【図１２Ａ－Ｂ】哺乳動物細胞中のｃｒＲＮＡプロセシングのノザンブロット分析の結果を示す。
【図１３Ａ－Ｂ】ヒトＰＶＡＬＢおよびマウスＴｈ遺伝子座中のプロトスペーサーの例示的選択を示す。
【図１４】ヒトＥＭＸ１遺伝子座中のＳ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ系の例示的プロトスペーサーおよび対応するＰＡＭ配列標的を示す。
【図１５】Ｓｕｒｖｅｙｏｒ、ＲＦＬＰ、ゲノムシーケンシング、およびノザンブロットアッセイに使用されたプライマーおよびプローブについての配列の表を提供する。
【図１６Ａ】キメラＲＮＡを有するＣＲＩＳＰＲ系の例示的操作および真核細胞中の系活性についてのＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイの結果を示す。
【図１６Ｂ】キメラＲＮＡを有するＣＲＩＳＰＲ系の例示的操作および真核細胞中の系活性についてのＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイの結果を示す。
【図１６Ｃ】キメラＲＮＡを有するＣＲＩＳＰＲ系の例示的操作および真核細胞中の系活性についてのＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイの結果を示す。
【図１７Ａ－Ｂ】真核細胞中のＣＲＩＳＰＲ系活性についてのＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイの結果のグラフ表示を示す。
【図１８】ＵＣＳＣゲノムブラウザを使用するヒトゲノム中のいくつかの化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９標的部位の例示的可視化を示す。
【図１９Ａ】大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つの群および小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つの群を含むＣａｓ９の５つの科を明らかにする系統発生分析の円形表示を示す。
【図１９Ｂ】大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つの群および小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つの群を含むＣａｓ９の５つの科を明らかにする系統発生分析の円形表示を示す。
【図１９Ｃ】大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つの群および小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つの群を含むＣａｓ９の５つの科を明らかにする系統発生分析の円形表示を示す。
【図１９Ｄ】大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つの群および小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つの群を含むＣａｓ９の５つの科を明らかにする系統発生分析の円形表示を示す。
【図２０Ａ】大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つの群および小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つの群を含むＣａｓ９の５つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。
【図２０Ｂ】大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つの群および小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つの群を含むＣａｓ９の５つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。
【図２０Ｃ】大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つの群および小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つの群を含むＣａｓ９の５つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。
【図２０Ｄ】大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つの群および小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つの群を含むＣａｓ９の５つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。
【図２０Ｅ】大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つの群および小型Ｃａｓ９（約１

１００アミノ酸）の２つの群を含むＣａｓ９の５つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。
【図２０Ｆ】大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つの群および小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つの群を含むＣａｓ９の５つの科を明らかにする系統発生分析の線形表示を示す。
【図２１Ａ】相同組換えを介するゲノム編集を示す。（ａ）ＲｕｖＣ　Ｉ触媒ドメイン中のＤ１０Ａ突然変異を有するＳｐＣａｓ９ニッカーゼの模式図。（ｂ）センスまたはアンチセンス一本鎖オリゴヌクレオチドのいずれかを修復テンプレートとして使用するヒトＥＭＸ１遺伝子座における相同組換え（ＨＲ）を表す模式図。上方の赤色矢印は、ｓｇＲＮＡ開裂部位を示し；ゲノタイピングのためのＰＣＲプライマー（表ＪおよびＫ）を右側パネルに矢印として示す。（ｃ）ＨＲにより改変された領域の配列。ｄ、ＥＭＸ標的１遺伝子座における野生型（ｗｔ）およびニッカーゼ（Ｄ１０Ａ）ＳｐＣａｓ９媒介インデルについてのＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイ（ｎ＝３）。矢印は、予測断片サイズの位置を示す。の線形表示を示す。
【図２１Ｂ】相同組換えを介するゲノム編集を示す。（ａ）ＲｕｖＣ　Ｉ触媒ドメイン中のＤ１０Ａ突然変異を有するＳｐＣａｓ９ニッカーゼの模式図。（ｂ）センスまたはアンチセンス一本鎖オリゴヌクレオチドのいずれかを修復テンプレートとして使用するヒトＥＭＸ１遺伝子座における相同組換え（ＨＲ）を表す模式図。上方の赤色矢印は、ｓｇＲＮＡ開裂部位を示し；ゲノタイピングのためのＰＣＲプライマー（表ＪおよびＫ）を右側パネルに矢印として示す。（ｃ）ＨＲにより改変された領域の配列。ｄ、ＥＭＸ標的１遺伝子座における野生型（ｗｔ）およびニッカーゼ（Ｄ１０Ａ）ＳｐＣａｓ９媒介インデルについてのＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイ（ｎ＝３）。矢印は、予測断片サイズの位置を示す。の線形表示を示す。
【図２１Ｃ】相同組換えを介するゲノム編集を示す。（ａ）ＲｕｖＣ　Ｉ触媒ドメイン中のＤ１０Ａ突然変異を有するＳｐＣａｓ９ニッカーゼの模式図。（ｂ）センスまたはアンチセンス一本鎖オリゴヌクレオチドのいずれかを修復テンプレートとして使用するヒトＥＭＸ１遺伝子座における相同組換え（ＨＲ）を表す模式図。上方の赤色矢印は、ｓｇＲＮＡ開裂部位を示し；ゲノタイピングのためのＰＣＲプライマー（表ＪおよびＫ）を右側パネルに矢印として示す。（ｃ）ＨＲにより改変された領域の配列。ｄ、ＥＭＸ標的１遺伝子座における野生型（ｗｔ）およびニッカーゼ（Ｄ１０Ａ）ＳｐＣａｓ９媒介インデルについてのＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイ（ｎ＝３）。矢印は、予測断片サイズの位置を示す。の線形表示を示す。
【図２１Ｄ】相同組換えを介するゲノム編集を示す。（ａ）ＲｕｖＣ　Ｉ触媒ドメイン中のＤ１０Ａ突然変異を有するＳｐＣａｓ９ニッカーゼの模式図。（ｂ）センスまたはアンチセンス一本鎖オリゴヌクレオチドのいずれかを修復テンプレートとして使用するヒトＥＭＸ１遺伝子座における相同組換え（ＨＲ）を表す模式図。上方の赤色矢印は、ｓｇＲＮＡ開裂部位を示し；ゲノタイピングのためのＰＣＲプライマー（表ＪおよびＫ）を右側パネルに矢印として示す。（ｃ）ＨＲにより改変された領域の配列。ｄ、ＥＭＸ標的１遺伝子座における野生型（ｗｔ）およびニッカーゼ（Ｄ１０Ａ）ＳｐＣａｓ９媒介インデルについてのＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイ（ｎ＝３）。矢印は、予測断片サイズの位置を示す。
【図２２Ａ】ＳｐＣａｓ９のための単一ベクター設計を示す。
【図２２Ｂ】ＳｐＣａｓ９のための単一ベクター設計を示す。
【図２３】Ｃａｓ９オルソログの長さ分布を表すグラフを示す。
【図２４Ａ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２４Ｂ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２４Ｃ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２４Ｄ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列

を示す。
【図２４Ｅ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２４Ｆ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２４Ｇ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２４Ｈ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２４Ｉ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２４Ｊ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２４Ｋ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２４Ｌ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２４Ｍ】図２４Ａ～図２４Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図２５Ａ】条件的Ｃａｓ９、Ｒｏｓａ２６ターゲティングベクターマップを示す。
【図２５Ｂ】構成的Ｃａｓ９、Ｒｏｓａ２６ターゲティングベクターマップを示す。
【図２６】構成的および条件的Ｃａｓ９構築物における重要なエレメントの略図を示す。
【図２７】送達およびインビボマウス脳Ｃａｓ９発現データを示す。
【図２８】細胞へのＣａｓ９およびキメラＲＮＡのＲＮＡ送達を示す（Ａ）ニューロ２Ａ細胞へのＤＮＡまたはｍＲＮＡのいずれかとしてのＧＦＰレポーターの送達。（Ｂ）Ｃａｓ９およびキメラＲＮＡをＲＮＡとしてＩｃａｍ２遺伝子に対して送達すると、試験した２つのスペーサーのうちの一方に開裂が生じる。（Ｃ）Ｃａｓ９およびキメラＲＮＡをＲＮＡとしてＦ７遺伝子に対して送達すると、試験した２つのスペーサーのうちの一方に開裂が生じる。
【図２９】ＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）修復が遺伝子編集をいかに促進するかを示す。エラープローン非相同末端結合（ＮＨＥＪ）経路において、ＤＳＢの末端は内因性ＤＮＡ修復機構によりプロセシングされ、一緒に再結合し、このことは接合部位におけるランダム挿入／欠失（インデル）突然変異をもたらし得る。遺伝子のコード領域内で生じるインデル突然変異は、フレームシフトおよび早期終止コドンをもたらし得、遺伝子ノックアウトをもたらす。あるいは、プラスミドまたは一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）の形態の修復テンプレートを供給して高いフィデリティおよび正確な編集を可能とする相同性組換え修復（ＨＤＲ）経路を活用することができる。
【図３０】図３０Ａ～図３０Ｃは、ＨＥＫおよびＨＵＥＳ９細胞でのＨＤＲについて予想される結果を示す。（ａ）相同性アームを有するターゲティングプラスミドまたはｓｓＯＤＮ（センスまたはアンチセンス）のいずれかを使用して、Ｃａｓ９により開裂される標的ゲノム遺伝子座（赤色の三角形）で配列を編集することができる。ＨＤＲの効率をアッセイするため、本発明者らは標的遺伝子座にＨｉｎｄＩＩＩ部位（赤色のバー）を導入し、これを、相同性領域外にアニールするプライマーでＰＣＲ増幅した。ＨｉｎｄＩＩＩでＰＣＲ産物を消化すると、ＨＤＲイベントの発生が明らかになる。（ｂ）目的の遺伝子座に対してセンス方向またはアンチセンス方向（ｓまたはａ）のいずれかに向くｓｓＯＤＮをＣａｓ９と組み合わせて使用することにより、標的遺伝子座における効率的なＨＤＲ媒介性編集を実現することができる。改変の両側に４０ｂｐ、および好ましくは９０ｂｐの最小相同性領域が推奨される（赤色のバー）。（ｃ）野生型Ｃａｓ９およびＣａｓ９ニッカーゼ（Ｄ１０Ａ）の両方を使用して、ＥＭＸ１遺伝子座におけるＨＤＲに対してｓｓＯＤＮが及ぼす効果の例が示される。各ｓｓＯＤＮは、２つの制限部位の１２ｂｐの挿入が

隣接する９０ｂｐの相同性アームを含む。
【図３１】図３１Ａ～図３１Ｃは、嚢胞性線維症ΔＦ５０８突然変異の修復戦略を示す。
【図３２】図３２Ａ～図３２Ｂ（ａ）は、ＦＸＮイントロン１におけるＧＡＡリピート伸長の略図を示し、（ｂ）は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を使用したＧＡＡ伸長領域の切り出しに用いられる戦略の略図を示す。
【図３３】Ｔｅｔ１～３およびＤｎｍｔ１、３ａおよび３ｂ遺伝子座の効率的なＳｐＣａｓ９媒介性ターゲティングのスクリーニングを示す。形質移入したＮ２Ａ細胞のＤＮＡに関するＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイにより、種々のｇＲＮＡを使用することによる効率的なＤＮＡ開裂を実証する。
【図３４】ＡＡＶ１／２送達系における２ベクター系を使用した多重ゲノムターゲティング戦略を示す。Ｔｅｔ１－３およびＤｎｍｔ１、３ａおよび３ｂ　ｇＲＮＡはＵ６プロモーターの制御下にある。ＧＦＰ－ＫＡＳＨはヒトシナプシンプロモーターの制御下にある。制限酵素部位が、サブクローニングによる単純なｇＲＮＡ置換戦略を示す。２つの核局在化シグナル（ＮＬＳ）が隣接するＨＡタグ標識ＳｐＣａｓ９が示される。両方のベクターとも、１：１比でＡＡＶ１／２ウイルスによって脳に送達される。
【図３５】Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを用いた多重ＤＮＭＴターゲティングベクター＃１の機能検証を示す。ＤＮＭＴ遺伝子ファミリー遺伝子座のＳｐＣａｓ９媒介性開裂を試験するため、Ｎ２Ａ細胞にＤＮＭＴターゲティングベクター＃１（＋）およびＳｐＣａｓ９コードベクターを同時形質移入した。ｇＲＮＡのみ（－）が陰性対照である。形質移入後４８時間でＤＮＡ精製および下流処理のため細胞を回収した。
【図３６】Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを用いた多重ＤＮＭＴターゲティングベクター＃２の機能検証を示す。ＤＮＭＴ遺伝子ファミリー遺伝子座のＳｐＣａｓ９媒介性開裂を試験するため、Ｎ２Ａ細胞にＤＮＭＴターゲティングベクター＃１（＋）およびＳｐＣａｓ９コードベクターを同時形質移入した。ｇＲＮＡのみ（－）が陰性対照である。形質移入後４８時間でＤＮＡ精製および下流処理のため細胞を回収した。
【図３７】インビボでのＨＡ－ＳｐＣａｓ９発現に使用される短いプロモーターおよび短いポリＡバージョンの概略図を示す。Ｌ－ＩＴＲからＲ－ＩＴＲまでのコード領域のサイズを右側に示す。
【図３８】インビボでのＨＡ－ＳａＣａｓ９発現に使用される短いプロモーターおよび短いポリＡバージョンの概略図を示す。Ｌ－ＩＴＲからＲ－ＩＴＲまでのコード領域のサイズを右側に示す。
【図３９】Ｎ２Ａ細胞におけるＳｐＣａｓ９およびＳａＣａｓ９の発現を示す。種々の短いプロモーターの制御下にありかつ短いポリＡ（ｓｐＡ）配列を有するＨＡタグ標識ＳｐＣａｓ９およびＳａＣａｓ９バージョンの代表的なウエスタンブロット。チューブリンがローディング対照である。ｍＣｈｅｒｒｙ（ｍＣｈ）が形質移入対照である。形質移入後４８時間でウエスタンブロッティングのため細胞を回収してさらに処理した。
【図４０】Ｔｅｔ３遺伝子座の効率的なＳａＣａｓ９媒介性ターゲティングのスクリーニングを示す。形質移入したＮ２Ａ細胞のＤＮＡに関するＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイにより、ＮＮＧＧＧＴ　ＰＵＭ配列を有する種々のｇＲＮＡを使用することによる効率的なＤＮＡ開裂が実証される。ＧＦＰ形質移入細胞およびＳａＣａｓ９のみを発現する細胞が対照である。
【図４１】マウス脳におけるＨＡ－ＳａＣａｓ９の発現を示す。ヒトシナプシンプロモーターの制御下でＨＡ－ＳａＣａｓ９の発現をドライブするウイルスを動物の歯状回に注入した。手術後２週間で動物を犠牲にした。ウサギモノクローナル抗体Ｃ２９Ｆ４（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）を使用してＨＡタグを検出した。ＤＡＰＩ染色で細胞核は青色に染色された。
【図４２】形質導入７日後の培養下の皮質初代ニューロンにおけるＳｐＣａｓ９およびＳａＣａｓ９の発現を示す。種々のプロモーターの制御下にありかつｂｇｈまたは短いポリＡ（ｓｐＡ）配列を有するＨＡタグ標識ＳｐＣａｓ９およびＳａＣａｓ９バージョンの代表的なウエスタンブロット。チューブリンがローディング対照である。

【図４３】種々のプロモーターを含むＳｐＣａｓ９および多重ｇＲＮＡ構築物を有するＡＡＶ１粒子による形質導入後７日の初代皮質ニューロンのＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色を示す（ＤＮＭＴについては最後のパネルに例を示す）。ＡＡＶ形質導入後のニューロンを、対照の非形質導入ニューロンと比較した。赤色の核は、透過処理された死細胞を示す（パネルの２列目）。生細胞は緑色で示される（パネルの３列目）。
【図４４】種々のプロモーターを含むＳａＣａｓ９を有するＡＡＶ１粒子による形質導入後７日の初代皮質ニューロンのＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色を示す。赤色の核は、透過処理された死細胞を示す（パネルの２列目）。生細胞は緑色で示される（パネルの３列目）。
【図４５】ＴＥＴおよびＤＮＭＴ遺伝子座に関するＳｐＣａｓ９ならびにｇＲＮＡ多重体を有するＡＡＶ１ウイルスによる形質導入後のニューロンの形態比較を示す。形質導入されていないニューロンを対照として示す。
【図４６】初代皮質ニューロンにおけるＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイを用いた多重ＤＮＭＴターゲティングベクター＃１の機能検証を示す。ＤＮＭＴ遺伝子ファミリー遺伝子座のＳｐＣａｓ９媒介性開裂を試験するため、細胞にＤＮＭＴターゲティングベクター＃１および種々のプロモーターを有するＳｐＣａｓ９ウイルスを共形質導入した。
【図４７】脳におけるＳｐＣａｓ９開裂のインビボ効率を示す。ＤＮＭＴファミリー遺伝子座を標的とするｇＲＮＡ多重体を有するＡＡＶ１／２ウイルスを、２つの異なるプロモーター：マウスＭｅｃｐ２およびラットＭａｐ１ｂの制御下にあるＳｐＣａｓ９ウイルスと共にマウスに注入した。注入後２週間で脳組織を摘出し、ｇＲＮＡ多重体構築物からシナプシンプロモーターによりドライブされるＧＦＰ発現に基づき、ＦＡＣＳを使用して核を調製および選別した。ｇＤＮＡ抽出後、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを実行した。＋はＧＦＰ陽性核を示し、－は同じ動物からの対照のＧＦＰ陰性核を示す。ゲル上の数字は、評価したＳｐＣａｓ９効率を示す。
【図４８】海馬ニューロンからのＧＦＰ－ＫＡＳＨ標識細胞核の精製を示す。細胞核膜の核外膜（ＯＮＭ）をＧＦＰとＫＡＳＨタンパク質膜貫通ドメインとの融合物でタグ標識する。定位手術およびＡＡＶ１／２注入の１週間後の脳における強力なＧＦＰ発現。密度勾配遠心ステップによるインタクトな脳からの細胞核の精製。精製された核を示す。Ｖｙｂｒａｎｔ（登録商標）ＤｙｅＣｙｃｌｅ（商標）Ｒｕｂｙ染色によるクロマチン染色は赤色で示され、ＧＦＰ標識核は緑色で示される。ＧＦＰ＋およびＧＦＰ－細胞核の代表的なＦＡＣＳプロファイル（マゼンタ色：Ｖｙｂｒａｎｔ（登録商標）ＤｙｅＣｙｃｌｅ（商標）Ｒｕｂｙ染色、緑色：ＧＦＰ）。
【図４９】マウス脳におけるＳｐＣａｓ９開裂効率を示す。ＴＥＴファミリー遺伝子座を標的とするｇＲＮＡ多重体を有するＡＡＶ１／２ウイルスを、２つの異なるプロモーター：マウスＭｅｃｐ２およびラットＭａｐ１ｂの制御下にあるＳｐＣａｓ９ウイルスと共にマウスに注入した。注入後３週間で脳組織を摘出し、ｇＲＮＡ多重体構築物からシナプシンプロモーターによりドライブされるＧＦＰ発現に基づき、ＦＡＣＳを使用して核を調製および選別した。ｇＤＮＡ抽出後、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを実行した。＋はＧＦＰ陽性核を示し、－は同じ動物からの対照のＧＦＰ陰性核を示す。ゲル上の数字は、評価したＳｐＣａｓ９効率を示す。
【図５０】培養下の皮質ニューロンにおけるＧＦＰ－ＫＡＳＨ発現を示す。ＴＥＴ遺伝子座を標的とするｇＲＮＡ多重体構築物を有するＡＡＶ１ウイルスをニューロンに形質導入した。ＫＡＳＨドメインの局在化により、最も強力なシグナルは細胞核の周りに局在する。
【図５１】（上）ガイドＲＮＡのペア間の間隔（２つのＰＡＭ配列の配置パターンにより示されるとおり）のリストを示す。ＳｐＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）ニッカーゼと共に使用したとき、パターン１、２、３、４を満たすガイドＲＮＡペアのみがインデルを呈した。（下）ＳｐＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）と、パターン１、２、３、４を満たすガイドＲＮＡのペアとの組み合わせが、標的部位におけるインデルの形成をもたらしたことを示すゲル画像。
【図５２】Ｕ６ガイドＲＮＡ発現カセット（ｃａｓｓｓｅｔｔｅ）の作成に使用されるＵ６リバースプライマー配列のリストを示す。Ｕ６および所望のガイドＲＮＡを含有するア

ンプリコンを作成するためには、各プライマーがＵ６フォワードプライマー「ｇｃａｃｔｇａｇｇｇｃｃｔａｔｔｃｃｃａｔｇａｔｔｃ」とペアを形成する必要がある。
【図５３】図３３に掲載する２４パターンの位置を示すヒトＥＭＸ１遺伝子座からのゲノム配列マップを示す。
【図５４】（右側）種々のガイドＲＮＡペアにより標的化されたＣａｓ９ニッカーゼによる開裂の後に可変の５’オーバーハングが存在するときの標的部位におけるインデルの形成を示すゲル画像を示す。（左側）右側にゲルのレーン番号を示し、使用したガイドＲＮＡペアおよびＣａｓ９ニッカーゼによる開裂後に存在する５’オーバーハングの長さを特定することを含めた種々のパラメータを示す表を示す。
【図５５】図５４のゲルパターン（右）をもたらしおよび実施例３５にさらに記載する種々のガイドＲＮＡペアの位置を示すヒトＥＭＸ１遺伝子座からのゲノム配列マップを示す。
【図５６】図５６Ａ～図５６Ｋは、初代皮質ニューロンにおけるＭｅｃｐ２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ターゲティングを示す。（Ａ）ＡＡＶ　ＳｐＣａｓ９およびｓｇＲＮＡ発現ベクター。ｓｇＲＮＡベクターは、形質導入されたニューロンを同定するためのＧＦＰ－ＫＡＳＨ融合タンパク質のコード配列を含む。（Ｂ）ＨＡタグ標識Ｃａｓ９（ＨＡ－Ｃａｓ９）およびＧＦＰ－ＫＡＳＨの発現を示すＣａｓ９およびｓｇＲＮＡベクターで同時形質導入された培養下のニューロン。核はＤＡＰＩで標識。スケールバー、２０μｍ。（Ｃ）初代皮質ニューロンにおけるＧＦＰ－ＫＡＳＨ$^{+}$（ｎ＝６３５）およびＨＡ－Ｃａｓ９（ｎ＝６５９）の重感染効率。（Ｄ）Ｃａｓ９標的位置を示すマウスＭｅｃｐ２遺伝子座の図解表示；ｓｇＲＮＡを青色で示す。ＰＡＭ配列を紫色で示す。（Ｅ）皮質ニューロンにおけるＭｅｃｐ２遺伝子座の改変を示すＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）アッセイゲル。（Ｆ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９によるＭｅｃｐ２遺伝子座のターゲティング後におけるＭｅＣＰ２タンパク質レベルのウエスタンブロットおよびＭｅＣＰ２タンパク質レベルの定量化（ｔ検定、＊＊＊ｐ＜０．０００１、ｎ＝７）。（Ｇ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９によるＭｅｃｐ２遺伝子座のターゲティング後のニューロンにおける樹状突起樹の複雑さの低下。スケールバー、２０μｍ。（Ｈ）樹状末端の数および（Ｉ）Ｓｈｏｌｌ解析で評価した樹状突起樹形態（ｔ検定、＊＊＊ｐ＜０．０００１、ｎ＝４０）。（Ｊ）Ｃａｓ９およびＭｅｃｐ２　ｓｇＲＮＡでターゲティングしたニューロンにおける樹状突起棘形態の変化。スケールバー、１０μｍ。（Ｋ）棘密度定量化（ｔ検定、＊＊＊ｐ＜０．０００１、ｎ＝４０）。
【図５７】図５７Ａ～図５７Ｉは、マウス脳におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の送達およびＭｅｃｐ２のターゲティングを示す。（Ａ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９によってターゲティングされる細胞の細胞核をマウス脳から精製するための戦略。（Ｂ）マウス海馬の背側歯状回（ＤＧ）におけるＨＡ－Ｃａｓ９およびＧＦＰ－ＫＡＳＨ（ｓｇＲＮＡ）の発現。スケールバー、１００μｍ。（Ｃ）２つのベクターのＣａｓ９－ＣＲＩＳＰＲ系によって効率的にターゲティングされた細胞の定量化。（Ｄ）ＤＧ領域におけるＡＡＶ送達後２週間のＭｅｃｐ２遺伝子座の改変を示すＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）アッセイゲル。ＦＡＣＳ選別したＧＦＰ－ＫＡＳＨ陽性細胞は、より高いレベルのＭｅｃｐ２遺伝子座改変を示す。（Ｅ）標的脳領域におけるＭｅＣＰ２タンパク質発現のウエスタンブロット分析および背側ＤＧにおけるＭｅＣＰ２タンパク質レベルの定量化（ｔ検定、＊＊ｐ＜０．００１、ｎ＝４）。（Ｆ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９によるＭｅｃｐ２遺伝子座のターゲティング後２週間の背側ＤＧ領域の画像。スケールバー、１５０μｍ。（Ｇ）標的脳領域におけるＭｅＣＰ２陽性細胞の集団の、対照副次部位と比較した定量化（ｔ検定、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１、ｎ＝それぞれ２９０および２４９細胞）。（Ｈ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９送達後１週間の背側ＤＧにおける顆粒細胞の樹状突起棘の形態を示すゴルジ－Ｃｏｘ染色の例。スケールバー、１０μｍ。（Ｉ）背側ＤＧ領域における樹状突起棘密度の定量化（ｔ検定、＊＊＊ｐ＜０．０００１、ｎ＝２０）。
【図５８】図５８Ａ～図５８Ｆは、マウス脳における同時の多重遺伝子編集を示す。（Ａ）多重ゲノムターゲティング用に設計したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の概略図。（Ｂ）タ

ーゲティングされるＤＮＭＴマウス遺伝子座の図解表示。ガイドＲＮＡを青色で示す。ＰＡＭ配列を紫色で示す。（Ｃ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９送達後に歯状回からＦＡＣＳ選別した核におけるＤＮＭＴファミリー遺伝子に関するオンターゲット改変率の次世代シーケンシング。ＭＬＥ（最尤推定量）スコアを示す。（Ｄ）ＤＮＭＴファミリー遺伝子をターゲティングするＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系をインビボ送達した後のＤｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１タンパク質のウエスタンブロット分析（上）。インビボＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ターゲティング後のＤＧにおけるＤｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１タンパク質レベルのウエスタンブロット定量化（下；ｔ検定、＊＊ｐ＜０．００１、＊ｐ＜０．０５、Ｄｎｍｔ３ａ：ｎ＝７；Ｄｎｍｔ１：ｎ＝５）。（Ｅ、Ｆ）訓練文脈（Ｅ）および文脈変化（Ｆ）で試験した、海馬のＤＧ領域でＳＰＲ－Ｃａｓ９を使用してＤＮＭＴ遺伝子をターゲティングした８週間後の文脈学習障害（ｔ検定、＊＊＊ｐ＜０．０００１、ｎ＝１８）。

【図５９】図５９Ａ～図５９Ｅは、ＡＡＶパッケージング用のＨＡタグ標識ＳｐＣａｓ９（ＨＡ－Ｃａｓ９）のクローニングおよび発現を示す。（Ａ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系の概略図。単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）の媒介によるＣａｓ９のターゲティングにより、標的遺伝子座の二重鎖切断（ＤＳＢ）が生じる。非相同末端結合（ＮＨＥＪ）機構により、標的ゲノム遺伝子座のインデル突然変異がもたらされる。（Ｂ）ショートラットＭａｐ１ｂプロモーター（ｒＭａｐ１ｂ）、トランケート型のマウスＭｅｃｐ２プロモーター（ｓＭｅｃｐ２）およびショートポリＡモチーフ（ｓｐＡ）を使用してＣａｓ９発現カセットサイズを最小限に抑えるための種々のクローニング戦略の概略図。（Ｃ）種々のＣａｓ９発現カセットを使用したＣａｓ９を発現する初代皮質ニューロン培養物のウエスタンブロット分析。（Ｄ）Ｍｅｃｐ２プロモーターはニューロン（Ｍａｐ１ｂ、ＮｅｕＮ；矢印）においてＣａｓ９（赤色）発現をドライブするが、アストログリア（ＧＦＡＰ、三角矢印）ではドライブしない。核はＤＡＰＩで標識した（青色）。スケールバー、２０μｍ。（Ｅ）ウイルス送達の７日後に細胞をＬＩＦＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）キットで染色した。ＤＡＰＩ$^{+}$および死滅（ＤＥＡＤ$^{+}$）細胞の定量化。（ＩＴＲ－逆方向末端反復配列；ＨＡ－ヘマグルチニンタグ；ＮＬＳ－核局在化シグナル；ｓｐＡ－合成ポリアデニル化シグナル；Ｕ６－ＰｏｌＩＩＩプロモーター；ｓｇＲＮＡ－単一ガイドＲＮＡ；ｈＳｙｎ－ヒトシナプシン１プロモーター；ＧＦＰ－緑色蛍光タンパク質；ＫＡＳＨ－Ｋｌａｒｓｉｃｈｔ、ＡＮＣ１、Ｓｙｎｅ相同性核膜貫通ドメイン；ｂＧＨ　ｐＡ－ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル；ＷＰＲＥ－ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント）。

【図６０】図６０Ａ～図６０Ｂは、Ｎｅｕｒｏ－２ａ細胞におけるＭｅｃｐ２のターゲティングを示す。（Ａ）Ｍｅｃｐ２ターゲティング配列および対応するプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）。（Ｂ）Ｃａｓ９と共にＮｅｕｒｏ－２ａ細胞に同時形質移入した６つのＭｅｃｐ２　ｓｇＲＮＡの評価。形質移入後４８時間にＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）アッセイを用いて遺伝子座改変効率を分析した。

【図６１】初代皮質ニューロンにおけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９送達を示す。ＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲ（緑色、ＧＦＰ－ＫＡＳＨ）形質導入後７日の培養ニューロンにおけるＭｅＣＰ２（赤色）の免疫蛍光染色。Ｍｅｃｐ２ターゲティングＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲによって形質導入された細胞のＭｅＣＰ２免疫蛍光の低下（中央のパネル）が示される。核はＤＡＰＩで標識した（青色）。スケールバー、２０μｍ。

【図６２】図６２Ａ～図６２Ｃは、標的細胞核のＧＦＰ標識を示す。（Ａ）ＧＦＰ標識の概略図。核膜貫通ＫＡＳＨドメインに融合した高感度緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）および核外膜へのＧＦＰ－ＫＡＳＨのインテグレーションが示される。（Ｂ）歯状回へのウイルス送達後４週間における、ヒトシナプシンプロモーターによってドライブされるＧＦＰ－ＫＡＳＨの発現。ヘマトキシリン／エオシン染色（上）により、形態学的な異常はないことが明らかになった。免疫蛍光分析は、ＧＦＰ－ＫＡＳＨを発現する海馬（中央、緑色）における正常な組織学（ＮｅｕＮが赤色、中央のパネル）を示し、アストログリオーシスの徴候を示さない（ＧＦＡＰが赤色、下のパネル）。核はＤＡＰＩで標識した（青色）。スケールバー、２００μｍ。（Ｃ）細胞型特異的プロモーターを使用することにより、

ＧＦＰ－ＫＡＳＨを種々の細胞型にターゲティングすることができる。グリア線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）プロモーターは、マウス海馬のアストログリア細胞（赤色）におけるＧＦＰ－ＫＡＳＨ（緑色）の発現をドライブする。核はＤＡＰＩで標識した（青色）。挿入図は高倍率を示す。スケールバー、５０μｍ。（ＫＡＳＨ－Ｋｌａｒｓｉｃｈｔ、ＡＮＣ１、Ｓｙｎｅ相同性核膜貫通ドメイン）（ＯＮＭ－核外膜；ＩＮＭ－核内膜）。

【図６３】図６３Ａ～図６３Ｂは、インビトロでのＤＮＭＴファミリーメンバーの多重ゲノムターゲティングを示す。（Ａ）Ｄｎｍｔ３ａ、Ｄｎｍｔ１およびＤｎｍｔ３ｂターゲティング配列および対応するプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）。（Ｂ）Ｃａｓ９ならびにＤｎｍｔ３ａ、Ｄｎｍｔ１およびＤｎｍｔ３ｂ遺伝子座をターゲティングするＤＮＭＴ　３ｘｓｇＲＮＡベクターの形質移入後４８時間のＮｅｕｒｏ－２ａ細胞のＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）ヌクレアーゼアッセイ分析。３つ全ての標的遺伝子の効率的なゲノム編集が示される。

【図６４】図６４Ａ～図６４Ｃは、標的Ｄｎｍｔ３ａ、Ｄｎｍｔ１およびＤｎｍｔ３ｂ遺伝子座の次世代シーケンシングを示す。Ｃａｓ９およびＤＮＭＴ　３ｘｓｇＲＮＡをマウス歯状回にインビボ送達した後の突然変異Ｄｎｍｔ３ａ（Ａ）、Ｄｎｍｔ１（Ｂ）およびＤｎｍｔ３ｂ（Ｃ）遺伝子座のシーケンシング結果の例。緑色：野生型配列、赤色破線：欠失塩基、赤色塩基：挿入または突然変異。赤色の三角矢印はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９切断部位を示す。

【図６５Ａ】ガイド（標的）１がＡｐｏＢに最も高い割合のインデルを誘導したことを示す。

【図６５Ｂ】注入後４週間のインデル形成効率に関するＳｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼゲルアッセイの結果を示す。

【図６６】ＡＡＶ－Ｃａｓ９－ｓｇＲＮＡ送達後のインビボでの肝臓脂質蓄積表現型を検出するオイルレッド染色を示す。各囲み内のスケールバーが２０マイクロメートルを表す。

【図６７】種々の標的間および２つの異なる遺伝子（ＡＡＶＳ１およびＥＭＸ１）の範囲内では、灰色のバーで表される２１ｎｔｄ／塩基対（ｂｐ）が、少なくとも２０または２２塩基対（それぞれ黒色および白色のバーで表される）と比較して最適なスペーサー長さであることを示す。

【図６８】ガイド配列をＣａｓ９イントロン配列に挿入することができたかどうかを示す。

【図６９】試験した各標的についてＵ６がインデル形成割合の増加を示すとおり、完全長Ｈ１プロモーター（灰色のバー）がなおもＵ６プロモーター（黒色のバー）より弱いことを示す。

【図７０】短鎖Ｈ１プロモーターが完全長Ｈ１より弱いことを示す。

【図７１】Ｄ１０Ａ　ＳａＣＡｓ９二重ニッカーゼの開裂効率に関して測定した構築物中の２つのガイド配列の５’末端間の距離を示す。

【図７２】マウス脳におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系送達およびＭｅｃｐ２遺伝子座のターゲティングを示す。（ａ）ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９およびＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅ（Ｍｅｃｐ２）発現ベクター。ｓｇＲＮＡベクターは、形質導入ニューロンを同定するためのＧＦＰ－ＫＡＳＨ融合タンパク質のコード配列を含む。（ｂ）マウス海馬の背側歯状回（ＤＧ）におけるＨＡ－Ｃａｓ９およびＧＦＰ－ＫＡＳＨの発現。スケールバー、１００μｍ。（ｃ）デュアルベクターＣａｓ９－ＣＲＩＳＰＲ系によって効率的にターゲティングされる細胞の定量化。（ｄ）Ｃａｓ９標的位置を示すマウスＭｅｃｐ２遺伝子座の図解表示；ｓｇＲＮＡを青色で示す。ＰＡＭ配列を紫色で示す。Ｍｅｃｐ２遺伝子座のシーケンシングによって検出される代表的な突然変異パターンを下に示した：緑色－野生型配列；赤色ダッシュ記号－欠失した塩基；赤色の塩基：挿入または突然変異；赤色の三角矢印はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９切断部位を示す。（ｅ）ＤＧ領域へのＡＡＶ送達後２週間のＭｅｃｐ２遺伝子座の改変を示すＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）アッセイゲル。（ｆ）ターゲティングした脳領域におけるＭｅＣＰ２タンパク質発現のウエスタンブロット分析および背側

ＤＧにおけるＭｅＣＰ２タンパク質レベルの定量化（ｔ検定、＊＊ｐ＜０．００１、３匹の動物からのｎ＝４、エラーバー：ｓ．ｅ．ｍ．）。（ｇ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９によるＭｅｃｐ２遺伝子座のターゲティング後２週間の背側ＤＧ領域の画像。スケールバー、１５０μｍ。（ｈ）ターゲティングした脳領域において検出された全ての細胞中にあるＭｅＣＰ２陽性細胞集団（ＤＡＰＩ染色）の、対照副次部位と比較した定量化（ｔ検定、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１、２匹の動物からのそれぞれｎ＝２９０および２４９細胞；エラーバー：ｓ．ｅ．ｍ）。（ＩＴＲ－逆方向末端反復；ＨＡ－ヘマグルチニンタグ；ＮＬＳ－核局在化シグナル；ｓｐＡ－合成ポリアデニル化シグナル；Ｕ６－ＰｏｌＩＩＩプロモーター；ｓｇＲＮＡ－単一ガイドＲＮＡ；ｈＳｙｎ－ヒトシナプシン１プロモーター；ＧＦＰ－緑色蛍光タンパク質；ＫＡＳＨ－Ｋｌａｒｓｉｃｈｔ、ＡＮＣ１、Ｓｙｎｅ相同性核膜貫通ドメイン；ｂＧＨ　ｐＡ－ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル（ｐｏｌｙａｄｅｎｙｌａｔｉｏ　ｓｉｇｎａｌ）；ＷＰＲＥ－ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント）。

【図７３】Ｃａｓ９媒介性ＭｅＣＰ２ノックダウンニューロンにおける遺伝子発現の解析を示す。（ａ）マウス脳からのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９標的細胞の細胞核精製戦略。（ｂ）ＲＮＡｓｅｑによって検出された差次的発現遺伝子の階層クラスタリング（ｔ検定、ｐ＜０．０１、８匹の動物からの選別した核のｎ＝１９集団）。行毎に遺伝子の相対ｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）発現レベルを正規化し、赤色－青色カラースケールで表示する。各列が、指示するとおり、対照動物またはＭｅｃｐ２　ｓｇＲＮＡ形質導入動物のいずれかに由来する単離歯状回細胞集団からＦＡＣＳ選別した１００個の標的神経核の集団を表す。

【図７４】ＣＲＩＳＰＲ媒介性ＭｅＣＰ２ノックダウン後のニューロンの細胞応答特性における細胞自律性欠陥を示す。（ａ）マウス視覚野からの生体内実験構成および視覚刺激パラメータを示す略画。ＧＦＰ$^{+}$ニューロンを示す。スケールバー、２０μｍ。（ｂ）対側眼および同側眼の両方に特異的な入力を受け取る第２／３層興奮性ニューロンにおける記録構成を示す略画。ゲノム改変ＧＦＰ$^{+}$細胞は緑色であり、一方、非改変細胞は灰色である。正規化したスパイク形状は、規則的にスパイク発火する興奮性ニューロンを示す。（ｃ、ｄ）それぞれＭｅｃｐ２および対照ｓｇＲＮＡを発現するＧＦＰ$^{+}$細胞から平均ＯＳＩ（ｃ）および誘発ＦＲ（ｄ）を測定した（ｔ検定、＊ｐ＜０．０５；グラフ中の数字は記録された細胞の数を示す；ｎ＝２～３匹の動物；エラーバー：ｓ．ｅ．ｍ）。

【図７５】マウス脳における同時多重化遺伝子編集を示す。（ａ）多重化ゲノムターゲティング用に設計されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の概略図。（ｂ）標的ＤＮＭＴマウス遺伝子座の図解表示。ガイドＲＮＡを青色で示す。ＰＡＭ配列を紫色で示す。（ｃ）ＤＧ領域へのＡＡＶ送達後４週間の、ＦＡＣＳ選別したＧＦＰ－ＫＡＳＨ陽性細胞におけるＤＮＭＴ遺伝子座の改変を示すＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）アッセイゲル。（ｄ）単一細胞におけるＤＮＭＴ遺伝子座改変のディープシーケンシングベースの解析であって、複数の遺伝子座に改変が同時に起こることを示す。（ｅ）ＤＮＭＴファミリー遺伝子をターゲティングするＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系をインビボ送達した後のＤｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１タンパク質のウエスタンブロット分析（上）。インビボＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ターゲティング後のＤＧにおけるＤｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１タンパク質レベルのウエスタンブロット定量化（下；ｔ検定、＊＊ｐ＜０．００１、＊ｐ＜０．０５、Ｄｎｍｔ３ａ：ｎ＝７；Ｄｎｍｔ１：５匹の動物からのｎ＝５；エラーバー：ｓ．ｅ．ｍ）。（ｆ）訓練文脈および文脈変化で試験した、海馬のＤＧ領域でＳｐＣａｓ９を使用してＤＮＭＴ遺伝子をターゲティングした８週間後の文脈学習障害（ｔ検定、＊＊＊ｐ＜０．０００１、ｎ＝１８匹の動物、２つの独立した実験；エラーバー：ｓ．ｅ．ｍ）。

【図７６】ＡＡＶパッケージングのためのＨＡタグ標識ＳｐＣａｓ９（ＨＡ－ＳｐＣａｓ９）のクローニングおよび発現を示す。（ａ）短鎖ラットＭａｐ１ｂプロモーター（ｐＭａｐ１ｂ）、トランケート型のマウスＭｅｃｐ２プロモーター（ｐＭｅｃｐ２）および短鎖ポリＡモチーフ（ｓｐＡ）を使用してＳｐＣａｓ９発現カセットサイズを最小限に抑える種々のクローニング戦略の概略図。（ｂ）種々のＳｐＣａｓ９発現カセットを使用してＨＡ－ＳｐＣａｓ９を発現する初代皮質ニューロン培養物のウエスタンブロット分析。（

ｃ）Ｍｅｃｐ２プロモーターは ＨＡ－ＳｐＣａｓ９（赤色）発現をニューロンでは駆動するが（Ｍａｐ１ｂ、ＮｅｕＮ；矢印）、しかしアストログリアでは駆動しない（ＧＦＡＰ、三角矢印）。ＨＡ－ＳｐＣａｓ９とＧＦＰ－ＫＡＳＨとの同時発現が示される（下）。核はＤＡＰＩ（青色）で標識した。スケールバー、２０μｍ。（ｄ）ＧＦＰ標識の概略図。核膜貫通ＫＡＳＨドメインに融合した高感度緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）および核外膜へのＧＦＰ－ＫＡＳＨのインテグレーションが示される。（ｅ）ＨＡ－ＳｐＣａｓ９とＧＦＰ－ＫＡＳＨとの両方を発現する細胞の集団を示す重感染効率計算（３つの培養物からのｎ＝９７３ニューロン；エラーバー：ｓ．ｅ．ｍ）。（ｆ）ウイルス送達７日後に細胞をＬＩＦＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）キットで染色した。ＤＡＰＩ$^{+}$および死滅（ＤＥＡＤ$^{+}$）細胞の定量化（対照　ｎ＝５１８個のＤＡＰＩ$^{+}$核；ＳｐＣａｓ９／ＧＦＰ－ＫＡＳＨ　２つの培養物からのｎ＝１００３個のＤＡＰＩ$^{+}$核；エラーバー：ｓ．ｅ．ｍ）。（ＩＴＲ－逆方向末端反復；ＨＡ－ヘマグルチニンタグ；ＮＬＳ－核局在化シグナル；ｓｐＡ－合成ポリアデニル化シグナル；Ｕ６－ＰｏｌＩＩＩプロモーター；ｓｇＲＮＡ－単一ガイドＲＮＡ；ｈＳｙｎ－ヒトシナプシン１プロモーター；ＧＦＰ－緑色蛍光タンパク質；ＫＡＳＨ－Ｋｌａｒｓｉｃｈｔ、ＡＮＣ１、Ｓｙｎｅ相同性　核膜貫通ドメイン；ｂＧＨ　ｐＡ－ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル；ＷＰＲＥ－ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント）。

【図７７】Ｎｅｕｒｏ－２ａ細胞におけるＭｅｃｐ２のターゲティングを示す。（ａ）Ｍｅｃｐ２ターゲティング配列および対応するプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）。（ｂ）Ｎｅｕｒｏ－２ａ細胞にＳｐＣａｓ９と同時形質移入した６つのＭｅｃｐ２　ｓｇＲＮＡの評価。形質移入後４８時間にＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）アッセイを用いて遺伝子座改変効率を分析した。

【図７８】初代皮質ニューロンにおけるＭｅｃｐ２のＣＲＩＳＰＲ－ＳｐＣａｓ９ターゲティングを示す。（ａ）ＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲ形質導入７日後の培養ニューロンにおけるＭｅＣＰ２（赤色）の免疫蛍光染色（緑色、ＧＦＰ－ＫＡＳＨ）。核はＤＡＰＩ（青色）で標識した。スケールバー、２０μｍ。（ｂ）ＳｐＣａｓ９またはｄＳｐＣａｓ９をＭｅｃｐ２　ｓｇＲＮＡまたは対照（細菌ｌａｃＺ遺伝子をターゲティングする）ｓｇＲＮＡと共に使用したＭｅｃｐ２遺伝子座ターゲティングに関するＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）アッセイゲルを用いた評価。（ｃ）標的ニューロン集団（ＧＦＰ$^{+}$）中のＭｅＣＰ２陽性核の定量化。（ｄ）ＣＲＩＳＰＲ－ＳｐＣａｓ９によるＭｅｃｐ２遺伝子座のターゲティング後におけるＭｅＣＰ２タンパク質レベルのウエスタンブロットおよびＭｅＣＰ２タンパク質レベルの定量化（ｔ検定、＊＊ｐ＜０．００１、３個の培養物からのｎ＝５、エラーバー：ｓ．ｅ．ｍ）。

【図７９】インビトロでのＳｐＣａｓ９媒介性ＭｅＣＰ２ノックダウン後のニューロンの樹状突起樹における形態学的変化を示す。（ａ）ＣＲＩＳＰＲ－ＳｐＣａｓ９によるＭｅｃｐ２遺伝子座のターゲティング後のニューロンにおける樹状突起樹の複雑さの低下。スケールバー、２０μｍ。（ｂ）ＳｐＣａｓ９およびＭｅｃｐ２　ｓｇＲＮＡでターゲティングしたニューロンにおける樹状突起棘形態の変化。スケールバー、１０μｍ。細胞の形態はｍＣｈｅｒｒｙ構築物との同時形質移入で可視化した。形態分析用の細胞はＭｅｃｐ２染色の結果に基づき選択した。（ｃ）樹状末端の数で評価した樹状突起樹形態、および（ｄ）Ｓｈｏｌｌ解析（ｔ検定、＊＊＊ｐ＜０．０００１、２つの培養物からのｎ＝４０）。（ｅ）棘密度定量化（ｔ検定、＊＊＊ｐ＜０．０００１、２つの培養物からのｎ＝４０、エラーバー：ｓ．ｅ．ｍ）。

【図８０】対照動物およびＳｐＣａｓ９媒介性Ｍｅｃｐ２ノックダウンの神経核のＲＮＡｓｅｑを示す。発現レベルの分位点毎の全ＲＮＡ－ｓｅｑライブラリ（各々１００個の、対照ｓｇＲＮＡから取った核またはＭｅｃｐ２　ｓｇＲＮＡを形質導入した核の１９個のライブラリ、；ｎ＝４匹の動物／群）で検出された遺伝子の数を示す箱ひげ図。全ての遺伝子をその平均ｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）発現レベルで１０分位に分け、次に各分位点について、試料毎に検出された（ｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）＞２）遺伝子の数をカウントした。図示する３つの標的配列は、それぞれＤｎｍｔ３ａ、Ｄｎｍｔ１およびＤｎｍｔ３ｂにつ

いて、配列番号＿＿＿、配列番号＿＿＿および配列番号＿＿＿である。
【図８１】インビトロでのＤＮＭＴファミリーメンバーの多重化ゲノムターゲティングを示す。（ａ）Ｄｎｍｔ３ａ、Ｄｎｍｔ１およびＤｎｍｔ３ｂターゲティング配列および対応するプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）。（ｂ）Ｄｎｍｔ３ａ、Ｄｎｍｔ１およびＤｎｍｔ３ｂ遺伝子座をターゲティングするＳｐＣａｓ９およびＤＮＭＴ　３ｘｓｇＲＮＡベクターの形質移入後４８時間におけるＮｅｕｒｏ－２ａ細胞のＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）ヌクレアーゼアッセイ分析。ターゲティングされた３つ全ての遺伝子の効率的なゲノム編集が示される。
【図８２】標的Ｄｎｍｔ３ａ、Ｄｎｍｔ１およびＤｎｍｔ３ｂ遺伝子座の次世代シーケンシングを示す。ＳｐＣａｓ９およびＤＮＭＴ　３ｘｓｇＲＮＡをマウス歯状回にインビボ送達した後の突然変異Ｄｎｍｔ３ａ（ａ）、Ｄｎｍｔ１（ｂ）およびＤｎｍｔ３ｂ（ｃ）遺伝子座のシーケンシング結果の例。緑色：野生型配列、赤色ダッシュ記号：欠失した塩基、赤色の塩基：挿入または突然変異。赤色の三角矢印はＣＲＩＳＰＲ－ＳｐＣａｓ９切断部位を示す。この図に用いた完全配列は、それぞれＤｎｍｔ３ａ、Ｄｎｍｔ１およびＤｎｍｔ３ｂ遺伝子座について、配列番号　、配列番号　、および配列番号　として提供される。それらは、配列番号　（Ｄｎｍｔ３ａ）：ＣＣＴ　ＣＣＧ　ＴＧＴ　ＣＡＧ　ＣＧＡ　ＣＣＣ　ＡＴＧ　ＣＣＡ　Ａ、配列番号　（Ｄｎｍｔ１）：ＣＣＡ　ＧＣＧ　ＴＣＧ　ＡＡＣ　ＡＧＣ　ＴＣＣ　ＡＧＣ　ＣＣＧおよび配列番号　（Ｄｎｍｔ３ｂ）ＡＧＡ　ＧＧＧ　ＴＧＣ　ＣＡＧ　ＣＧＧ　ＧＴＡ　ＴＡＴ　ＧＡＧ　Ｇである。
【図８３】
【図８４】
【図８５】
【発明を実施するための形態】
【０１２８】
本明細書の図は例示目的に過ぎず、必ずしも一定の尺度で描かれているとは限らない。
【０１２９】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に関する一般的な情報については、２０１３年１月３０日；２０１３年３月１５日；２０１３年３月２８日；２０１３年４月２０日；２０１３年５月６日および２０１３年５月２８日にそれぞれ出願された米国仮特許出願第６１／７５８，４６８号明細書；同第６１／８０２，１７４号明細書；同第６１／８０６，３７５号明細書；同第６１／８１４，２６３号明細書；同第６１／８１９，８０３号明細書および同第６１／８２８，１３０号明細書が参照される。また、２０１３年６月１７日に出願された米国仮特許出願第６１／８３６，１２３号明細書も参照される。また、２０１２年１２月１２日および２０１３年１月２日にそれぞれ出願された米国仮特許出願第６１／７３６，５２７号明細書および同第６１／７４８，４２７号明細書も参照される。また、２０１３年３月１５日に出願された米国仮特許出願第６１／７９１，４０９号明細書も参照される。また、２０１３年３月１５日に出願された米国仮特許出願第６１／７９９，８００号明細書も参照される。また、各々２０１３年６月１７日に出願された米国仮特許出願第６１／８３５，９３１号明細書、同第６１／８３５，９３６号明細書、同第６１／８３６，１２７号明細書、同第６１／８３６，１０１号明細書、同第６１／８３６，０８０号明細書および同第６１／８３５，９７３号明細書も参照される。さらに、２０１３年８月５日に出願された米国仮特許出願第６１／８６２，４６８号明細書および同第６１／８６２，３５５号明細書；２０１３年８月２８日に出願された同第６１／８７１，３０１号明細書；２０１３年９月２５日に出願された同第６１／９６０，７７７号明細書および２０１３年１０月２８日に出願された同第６１／９６１、９８０号明細書が参照される。これらの出願の各々、ならびにその中に引用されるかまたはその審査手続中に引用される全ての文献（「出願引用文献」）および出願引用文献中で引用または参照される全ての文献は、そこで言及されるかまたはまたはその中の任意の文献中にある、かつ参照によって本明細書に援用される任意の製品に関する任意の指示書、説明書、製品仕様書、およびプロダクトシートと共に、本明細書によって参照により本明細書に援用され、かつ本発明の実施に用いら

れ得る。全ての文献（例えば、これらの出願および出願引用文献）は、個々の文献それぞれについて参照によって援用されることが具体的かつ個々に指示されたものとするのと同程度に参照により本明細書に援用される。

【０１３０】

また、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に関する一般的な情報については以下が挙げられ：

・ Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｃｏｎｇ，Ｌ．，Ｒａｎ，Ｆ．Ａ．，Ｃｏｘ，Ｄ．，Ｌｉｎ，Ｓ．，Ｂａｒｒｅｔｔｏ，Ｒ．，Ｈａｂｉｂ，Ｎ．，Ｈｓｕ，Ｐ．Ｄ．，Ｗｕ，Ｘ．，Ｊｉａｎｇ，Ｗ．，Ｍａｒｒａｆｆｉｎｉ，Ｌ．Ａ．，＆ Ｚｈａｎｇ，Ｆ．Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｆｅｂ １５；３３９（６１２１）：８１９－２３（２０１３）；

・ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｅｄｉｔｉｎｇ ｏｆ ｂａｃｔｅｒｉａｌ ｇｅｎｏｍｅｓ ｕｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｊｉａｎｇ Ｗ．，Ｂｉｋａｒｄ Ｄ．，Ｃｏｘ Ｄ．，Ｚｈａｎｇ Ｆ，Ｍａｒｒａｆｆｉｎｉ ＬＡ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｍａｒ；３１（３）：２３３－９（２０１３）；

・ Ｏｎｅ－Ｓｔｅｐ Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｉｃｅ Ｃａｒｒｙｉｎｇ Ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｇｅｎｅｓ ｂｙ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．Ｗａｎｇ Ｈ．，Ｙａｎｇ Ｈ．，Ｓｈｉｖａｌｉｌａ ＣＳ．，Ｄａｗｌａｔｙ ＭＭ．，Ｃｈｅｎｇ ＡＷ．，Ｚｈａｎｇ Ｆ．，Ｊａｅｎｉｓｃｈ Ｒ．Ｃｅｌｌ Ｍａｙ ９；１５３（４）：９１０－８（２０１３）；

・ Ｏｐｔｉｃａｌ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ ｓｔａｔｅｓ．Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ Ｓ，Ｂｒｉｇｈａｍ ＭＤ，Ｔｒｅｖｉｎｏ ＡＥ，Ｈｓｕ ＰＤ，Ｈｅｉｄｅｎｒｅｉｃｈ Ｍ，Ｃｏｎｇ Ｌ，Ｐｌａｔｔ ＲＪ，Ｓｃｏｔｔ ＤＡ，Ｃｈｕｒｃｈ ＧＭ，Ｚｈａｎｇ Ｆ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１３ Ａｕｇ ２２；５００（７４６３）：４７２－６．ｄｏｉ：１０．１０３８／Ｎａｔｕｒｅ１２４６６．Ｅｐｕｂ ２０１３ Ａｕｇ ２３；

・ Ｄｏｕｂｌｅ Ｎｉｃｋｉｎｇ ｂｙ ＲＮＡ－Ｇｕｉｄｅｄ ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ９ ｆｏｒ Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｄｉｔｉｎｇ Ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ．Ｒａｎ，ＦＡ．，Ｈｓｕ，ＰＤ．，Ｌｉｎ，ＣＹ．，Ｇｏｏｔｅｎｂｅｒｇ，ＪＳ．，Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ，Ｓ．，Ｔｒｅｖｉｎｏ，ＡＥ．，Ｓｃｏｔｔ，ＤＡ．，Ｉｎｏｕｅ，Ａ．，Ｍａｔｏｂａ，Ｓ．，Ｚｈａｎｇ，Ｙ．，＆ Ｚｈａｎｇ，Ｆ．Ｃｅｌｌ Ａｕｇ ２８．ｐｉｉ：Ｓ００９２－８６７４（１３）０１０１５－５．（２０１３）；

・ ＤＮＡ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｏｆ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ Ｃａｓ９ ｎｕｃｌｅａｓｅｓ．Ｈｓｕ，Ｐ．，Ｓｃｏｔｔ，Ｄ．，Ｗｅｉｎｓｔｅｉｎ，Ｊ．，Ｒａｎ，ＦＡ．，Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ，Ｓ．，Ａｇａｒｗａｌａ，Ｖ．，Ｌｉ，Ｙ．，Ｆｉｎｅ，Ｅ．，Ｗｕ，Ｘ．，Ｓｈａｌｅｍ，Ｏ．，Ｃｒａｄｉｃｋ，ＴＪ．，Ｍａｒｒａｆｆｉｎｉ，ＬＡ．，Ｂａｏ，Ｇ．，＆ Ｚｈａｎｇ，Ｆ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．２６４７（２０１３）；

・ Ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｓｙｓｔｅｍ．Ｒａｎ，ＦＡ．，Ｈｓｕ，ＰＤ．，Ｗｒｉｇｈｔ，Ｊ．，Ａｇａｒｗａｌａ，Ｖ．，Ｓｃｏｔｔ，ＤＡ．，Ｚｈａｎｇ，Ｆ．Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｎｏｖ；８（１１）：２２８１－３０８．（２０１３）；

・ Ｇｅｎｏｍｅ－Ｓｃａｌｅ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ Ｋｎｏｃｋｏｕｔ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｃｅｌｌｓ．Ｓｈａｌｅｍ，Ｏ．，Ｓａｎｊａｎａ，Ｎ Ｅ．，Ｈａｒｔｅｎｉａｎ，Ｅ．，Ｓｈｉ，Ｘ．，Ｓｃｏｔｔ，ＤＡ．，Ｍｉｋｋｅｌｓｏｎ，Ｔ．，Ｈｅｃｋｌ，Ｄ．，Ｅｂｅｒｔ，ＢＬ．，Ｒｏｏｔ，ＤＥ．，Ｄｏｅｎｃｈ，ＪＧ．，Ｚｈａｎｇ，Ｆ．Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｅｃ １２．（２０１３）．［Ｅｐｕｂ ａｈｅａｄ ｏｆ ｐｒｉｎｔ］；

・ Ｃｒｙｓｔａｌ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ｃａｓ９ ｉｎ ｃｏｍｐｌｅｘ ｗ

ith guide RNA and target DNA. Nishimasu, H., Ran, FA., Hsu, PD., Konermann, S., Shehata, SI., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O. Cell Feb 27. (2014). 156(5):935-49;
・ Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. Wu X., Scott DA., Kriz AJ., Chiu AC., Hsu PD., Dadon DB., Cheng AW., Trevino AE., Konermann S., Chen S., Jaenisch R., Zhang F., Sharp PA. Nat Biotechnol. (2014) Apr 20. doi:10.1038/nbt.2889、および
・ Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering, Hsu et al, Cell 157, 1262-1278 (June 5, 2014) (Hsu 2014)
、
この各々が参照により本明細書に援用され、簡潔には以下のとおり考察している：
・ Cong et al.は、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Streptococcus thermophilus）Cas9およびまた化膿性連鎖球菌（Streptoccocus pyogenes）Cas9の両方に基づき、真核細胞で使用されるII型CRISPR/Cas系をエンジニアリングし、Cas9ヌクレアーゼが低分子RNAの指図を受けてヒトおよびマウス細胞で正確なDNA開裂を誘導し得ることを実証した。この著者らの研究はさらに、ニッキング酵素に変換されるCas9を使用して、最小限の変異原活性を有する真核細胞での相同性組換え修復を促進し得ることを示した。加えて、この著者らの研究は、複数のガイド配列を単一のCRISPR配列にコードすることによって哺乳類ゲノム内の内在性ゲノム遺伝子座部位でいくつかを同時に編集することが可能となり得ることを実証し、RNAガイドヌクレアーゼ技術の容易なプログラム可能性および広範な適用性を実証した。このようにRNAを使用して細胞における配列特異的DNA開裂をプログラムすることが可能となり、ゲノムエンジニアリングツールの新しいクラスが定義された。これらの研究はさらに、他のCRISPR遺伝子座が哺乳類細胞に移植可能であると見込まれ、また哺乳類ゲノム開裂も媒介し得ることを示した。重要なことに、CRISPR/Cas系のいくつかの側面をさらに改良してその効率および多用途性を高め得ることが想定され得る。

【0131】

・ Jiang et al.は、デュアルRNAと複合体形成したクラスター化等間隔短鎖回分リピート（CRISPR）関連Cas9エンドヌクレアーゼを使用して、肺炎連鎖球菌（Streptococcus pneumoniae）および大腸菌（Escherichia coli）のゲノムに正確な突然変異を導入した。この手法は、標的ゲノム部位におけるデュアルRNA：Cas9指向開裂によって非突然変異細胞を死滅させ、選択可能マーカーまたは対抗選択系の必要性を回避することによった。この研究は、単一および複数のヌクレオチド変化が生じるように短鎖CRISPR RNA（crRNA）の配列を変えることによってデュアルRNA：Cas9特異性を再プログラム化すると、テンプレートの編集が行われることを報告した。この研究は、2つのcrRNAを同時に使用すると突然変異誘発の多重化が可能であることを示した。さらに、この手法をリコンビニアリングと組み合わせて用いたとき、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）では、記載される手法を用いて回収された細胞のほぼ100%が所望の突然変異を含み、大腸菌（E. coli）では回収された細胞の65%が突然変異を含んだ。

【0132】

・ Konermann et al.は、CRISPR Cas9酵素およびまた転写活性化因子様エフェクターに基づくDNA結合ドメインの光学的および化学的モジュレーションを可能にする多用途のかつロバストな技術が当該技術分野で必要とされていること

に対処した。
・　本明細書で考察するとおり、微生物ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系由来のＣａｓ９ヌクレアーゼが２０ｎｔガイド配列によって特異的なゲノム遺伝子座にターゲティングされ、ガイド配列はＤＮＡ標的との特定のミスマッチに耐えることができるため、従って望ましくないオフターゲット突然変異誘発を促進し得る。これに対処するため、Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．は、Ｃａｓ９ニッカーゼ突然変異体を対のガイドＲＮＡと組み合わせて標的二本鎖切断を導入するという手法を記載した。ゲノム中の個々のニックは高いフィデリティで修復されるため、二本鎖切断には適切にオフセットしたガイドＲＮＡによる同時のニッキングが必要であり、これが標的開裂のために特異的に認識される塩基の数を伸長する。この著者らは、対のニッキングを使用して細胞系におけるオフターゲット活性を５０～１，５００分の１に減らし、オンターゲット開裂効率を犠牲にすることなしにマウス接合体における遺伝子ノックアウトを促進し得ることを実証した。この多用途戦略により、高い特異性が要求される多種多様なゲノム編集適用が可能となる。
【０１３３】
・　Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．は、標的部位の選択を知らせ、かつオフターゲット効果を回避するためのヒト細胞におけるＳｐＣａｓ９ターゲティングの特異性を特徴付けた。この研究は、７００個を超えるガイドＲＮＡ変異体ならびに２９３Ｔおよび２９３ＦＴ細胞の１００個を超える予測ゲノムオフターゲット遺伝子座におけるＳｐＣａｓ９誘導インデル突然変異レベルを評価した。この著者ら、ＳｐＣａｓ９がミスマッチの数、位置および分布に感受性を有して、配列依存的に種々の位置におけるガイドＲＮＡと標的ＤＮＡとの間のミスマッチに耐えること。この著者らはさらに、ＳｐＣａｓ９媒介性開裂がＤＮＡメチル化の影響を受けないこと、およびＳｐＣａｓ９およびｓｇＲＮＡの投与量を滴定してオフターゲット改変を最小限に抑え得ることを示した。加えて、哺乳類ゲノムエンジニアリング適用を促進するため、この著者らは、標的配列の選択および検証ならびにオフターゲット解析をガイドするウェブベースのソフトウェアツールの提供を報告した。
【０１３４】
・　Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．は、哺乳類細胞における非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同性組換え修復（ＨＤＲ）を用いたＣａｓ９媒介性ゲノム編集ならびに下流機能研究用の改変細胞系生成のための一組のツールを記載した。オフターゲット開裂を最小限に抑えるため、この著者らはさらに、対のガイドＲＮＡを含むＣａｓ９ニッカーゼ突然変異体を使用した二重ニッキング戦略を記載した。この著者らによって提供されるプロトコルは、標的部位の選択、開裂効率の評価およびオフターゲット活性の分析に関する指針を実験的に導いた。この研究は、標的設計から始めて、僅か１～２週間以内に遺伝子改変を達成し得るとともに、２～３週間以内に改変クローン細胞系を誘導し得ることを示した。
【０１３５】
・　Ｓｈａｌｅｍ　ｅｔ　ａｌ．は、ゲノムワイドな規模で遺伝子機能を調べる新しい方法を記載した。この著者らの研究は、６４，７５１個のユニークなガイド配列で１８，０８０個の遺伝子をターゲティングするゲノム規模のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ノックアウト（ＧｅＣＫＯ）ライブラリの送達が、ヒト細胞におけるネガティブ選択およびポジティブ選択の両方のスクリーニングを可能にしたことを示した。第一に、この著者らは、ＧｅＣＫＯライブラリを使用した、癌および多能性幹細胞における細胞生存にとって不可欠な遺伝子の同定を示した。次に、この著者らは黒色腫モデルにおいて、その欠損が突然変異体プロテインキナーゼＢＲＡＦを阻害する治療薬ベムラフェニブに対する耐性に関わる遺伝子をスクリーニングした。この著者らの研究は、最も上位にランク付けされた候補に、以前検証された遺伝子ＮＦ１およびＭＥＤ１２ならびに新規ヒットＮＦ２、ＣＵＬ３、ＴＡＤＡ２Ｂ、およびＴＡＤＡ１が含まれたことを示した。この著者らは、同じ遺伝子をターゲティングする独立したガイドＲＮＡ間における高度な一致および高率のヒット確認を観察し、従ってＣａｓ９によるゲノム規模スクリーニングの有望さを実証した。
【０１３６】
・　Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．は、２．５Åの分解能でｓｇＲＮＡおよびその標

的ＤＮＡと複合体形成する化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９の結晶構造を報告した。この構造から、標的認識ローブとヌクレアーゼローブとで構成された、それらの界面にある正電荷の溝にｓｇＲＮＡ：ＤＮＡヘテロ二本鎖を受け入れる２ローブ構成が明らかになった。認識ローブはｓｇＲＮＡおよびＤＮＡの結合に決定的に重要であるのに対し、ヌクレアーゼローブはＨＮＨおよびＲｕｖＣヌクレアーゼドメインを含み、これらのドメインは標的ＤＮＡのそれぞれ相補鎖および非相補鎖の開裂に適切な位置にある。ヌクレアーゼローブはまた、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）との相互作用に関与するカルボキシル末端ドメインも含む。この高分解能構造解析および付随する機能解析により、Ｃａｓ９によるＲＮＡガイドＤＮＡターゲティングの分子機構が明らかになることで、ひいては新規の多用途ゲノム編集技術の合理的な設計への道が開かれつつある。

【０１３７】

・　Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．は、マウス胚性幹細胞（ｍＥＳＣ）においてシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を負荷した化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来の触媒不活性Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）のゲノムワイドな結合部位をマッピングした。この著者らは、試験した４つのｓｇＲＮＡの各々が、多くの場合にｓｇＲＮＡにおける５ヌクレオチドシード領域およびＮＧＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）によって特徴付けられる数十個ないし数千個のゲノム部位にｄＣａｓ９をターゲティングすることを示した。クロマチンが接触不可能であることにより、一致するシード配列を含む他の部位に対するｄＣａｓ９結合が減少し；従ってオフターゲット部位の７０％が遺伝子と会合する。この著者らは、触媒活性Ｃａｓ９を形質移入したｍＥＳＣにおける２９５個のｄＣａｓ９結合部位の標的シーケンシングから、バックグラウンドレベルを上回って突然変異した部位は１つのみ同定されたことを示した。この著者らは、Ｃａｓ９結合および開裂の２状態モデルを提案しており、このモデルではシードの一致が結合を引き起こすが、開裂には標的ＤＮＡとの広範な対合が必要である。

【０１３８】

・　Ｈｓｕ　２０１４は、２０１４年６月５日より前に出願された本明細書の系統上にある出願の情報、データおよび知見にあるような、細胞の遺伝子スクリーニングを含めたヨーグルトからゲノム編集に至るまでのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９の歴史を広く考察するレビュー論文である。Ｈｓｕ　２０１４の一般的な教示は、本明細書の特定のモデル、動物を含まない。

【０１３９】

本発明は、ゲノム摂動または遺伝子編集など、配列ターゲティングが関わる遺伝子発現の制御に使用される、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系およびその成分に関する系、方法および組成物のエンジニアリングおよび最適化に関する。有利な実施形態においてＣａｓ酵素はＣａｓ９である。

【０１４０】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓポリヌクレオチド配列は、概して本明細書ではガイド、またはさらにはガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）と称されるが、しかしながらこの用語法はこれまでそれほど一般的でなかったことは理解されるであろう。さらに、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系が参照されるが、しかしながらこれは任意のＣａｓに対する広義の参照であり（但し、それはＤＳＢ、ニックまたは二重ニックのいずれかを誘導するヌクレアーゼ機能を有するものとする）、しかしながらＣａｓ９が好ましく、ＳａＣａｓ９が特に好ましいことは理解されるであろう。

【０１４１】

本肝臓データにおける重要な点のいくつかを、一般に分裂終了細胞までの流れとして（肝細胞は典型的には分裂終了細胞であるため）以下にまとめる：

ＡＡＶ２／８

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の好ましい送達は、ウイルスベクターを介した送達である。このベクターは、本明細書である程度詳しく考察するとおり、レンチウイルスベクターまた

はＡＡＶベクターであってもよい。本発明者らが特に明らかにしているのは、ＡＡＶがウイルスベクターの好ましい例であるということである。その範囲内で、本発明者らは次に、ＡＡＶ８および詳細にはＡＡＶ２／８（ＡＡＶ２パッケージングシグナルＩＴＲと共にパッケージングされたＡＡＶ８）が、肝臓への、特にインビボでの送達に有用であることを明らかにしている。

【０１４２】

インビボで見られる表現型の変化

他の部分で考察するとおり、本発明者らはインビボで表現型の変化を検出し得ることを示すことができた。多くの場合にＲＮＡｉに突き付けられる欠陥は持続効果が見られないことであるため、これは顕著な前進である。本発明では、初めて肝臓における表現型の変化を見ることができる。これを達成する好ましい構成は、実施例３６の構成を用いることである。これの重要な要素は単独または組み合わせで好ましく、すなわち以下である：

・　Ｓａ　Ｃａｓ９；
・　ガイド、ｔｒａｃｒ配列およびｔｒａｃｒメイトを含むキメラガイドＲＮＡの使用；
・　ｔｒａｃｒ配列について、Ｓａ　Ｃａｓ９の動員にＳａ　ｔｒａｃｒが好ましい；
・　ＡＡＶ８またはより好ましくはＡＡＶ２／８；
・　実験目的では、Ｒｏｓａ２６が有用な陰性対照である；
・　ＡＡＶベクターにおけるＣＭＶプロモーターの使用は役立つが、ＴＢＧなどの肝臓特異的プロモーターの使用（肝臓ターゲティングのため）が特に有効である；
・　ＣＲＩＳＰＲは、ガイドの送達に成功しかつＣｓｓ９酵素が好適に発現すると、全標的にわたって幅広い適用性を有することが示されているため、１つまたは複数の標的は広範囲に及び得る。しかしながら、それにも関わらず、肝臓における好ましい標的（ガイドの設計対象となり得る）は、ＰＣＳＫ９；Ｈｍｇｃｒ；ＳＥＲＰＩＮＡ１；ＡｐｏＢ；および／またはＬＤＬの１つ以上を含む。

【０１４３】

従って、一部の実施形態では、Ｃａｓ酵素がＳａ　Ｃａｓ９であることが特に好ましい。好ましくは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓポリヌクレオチド配列はキメラであり、好ましくは、Ｃａｓ９がＳａ　Ｃａｓ９である場合にＳａ　ｔｒａｃｒを含む。好ましくはＡＡＶ２／８であるウイルスベクターが用いられてもよい。さらに、肝臓特異的プロモーターが理想的であり、好ましい例はＴＢＧである。これらは全て、Ｃａｓ９がＳａＣａｓ９である場合のＳａ　ｔｒａｃｒを含め、キメラＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓポリヌクレオチド配列を提供するため組み合わせで用いられてもよく、およびベクターはＡＡＶ２／８であって、少なくともＣａｓ９がＴＢＧなどの肝臓特異体の制御下にある。上記の任意の標的、詳細には肥満症におけるその重要性からＡｐｏＢが、この系で用いられ得る。

【０１４４】

Ｙｉｎ　ａｎｄ　Ａｎｄｅｒｓｏｎの最近のＮａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ論文（ＮＢＴ　２８８４、本明細書で参照される）は、本発明者らが既に示したインビボでの表現型の変化に関するさらなる裏付けを提供している。

【０１４５】

次に本発明者らが提供する追加的なデータが、Ｃａｓ９を用いた体細胞肝組織の効率的なインビボ編集を実証することによってさらなる裏付けを加える。さらに、ＡＡＶ２／８による送達およびＳａＣａｓ９の使用がやはり、インビボでのこの特定の手法の有用性を示す。ここでもやはり、好ましいＡｐｏＢがターゲティングされた。

【０１４６】

後述の実施例３６および３７は、インビボ、特に脂質代謝遺伝子ＡｐｏＢでの表現型の変化の誘導における有効性（ｅｆｆｅｃｉｃａｃｙ）に関する優れたインビボデータを示し、一方、実施例３８は、分裂終了細胞（その中で肝臓は重要な例である）に対するこの技術の適用性を示す。実施例３９は、検出目的に複数のエピトープタグが好ましいことを示す。

【０１４７】

ウイルスベクターが好ましいが、一部の実施形態では、細胞透過性ペプチドの使用が実行可能な代替法であり、従ってこれもまた好ましい。

【０１４８】

実施例３６では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系によって遺伝子型の変化、および決定的には表現型の変化の両方が見られることを示した。そればかりでなく、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系はインビボで表現型の変化を誘導することにおいて有効であった。

【０１４９】

具体的には、標的は脂質代謝遺伝子ＡｐｏＢであった。極めて有望なことには、ＡｐｏＢは肝臓送達の「ゴールドスタンダード」と言われることもあり、肥満症のマウスモデルで広範に用いられている。肝臓は一部の実施形態では好ましい分裂終了細胞であるが、他の場合にはまた除外されることもある。いずれにしろ、本研究は、インビボであっても表現型の変化が見られることの原理証明を提供し、これは他の分裂終了細胞にも等しく適用可能である。実際、実施例３９は、別個の組織、脳において分裂終了ニューロンでこれのさらなる証明を提供する。

【０１５０】

実施例３７における送達は静脈内注射によった。ＡＡＶベクター、ならびにＣａｓ９に対する肝臓特異的プロモーター（ＴＢＧ）を使用した。

【０１５１】

ここで見られるとおりのウイルスベクターからの発現を介した送達は、送達方法としてＡｎｄｅｒｓｏｎ／Ｙｉｎ（ＮＢＴ　２８８４）による流体力学的送達の使用の改良であり、なぜなら流体力学的送達は数ｍｌの流体を注入する必要があり、これがマウスの体に負担をかけ、致死的となり得るためである。流体力学的送達はプラスミド（ネイキッド）ＤＮＡの送達に最も良く適しているが、本発明者らは、ガイド配列およびＣａｓ９配列をウイルス送達ベクターにパッケージングすることが、効率を大幅に高める点で好ましいことを示している。実際、比較的少量を導入するだけでよく、これは静脈内（ｉ．ｖ．）的に行うことができ、治療上はるかに良好に容認される可能性が高い。特に有望であったのは、ＡｐｏＢなどの肝臓の「ゴールドスタンダード」遺伝子に遺伝子型の変化が見られたのみならず、表現型の変化もまた記録されたことであった。ＰＣＳＫ９での先行研究は遺伝子型の変化を示しているが、表現型の変化は示しておらず、従ってＡｐｏＢで見られた表現型の変化は、肝臓へのＣＲＩＳＰＲ送達、および肝臓で表現型の変化を生じさせるその能力の妥当性を立証している。これは、より治療的に容認される送達手段（流体力学的送達と比較したｉ．ｖ．）と組み合わされる。従って、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系（ガイドおよびＣａｓ９）の、特に静脈内的なウイルス送達が好ましい）。

【０１５２】

潜在的な標的としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ＰＣＳＫ９、ＨＭＧＣＲ、ＡＰＯＢ、ＬＤＬＲ、ＡＮＧＰＴＬ３、Ｆ８、Ｆ９／ＦＩＸ、ＡＡＴ、ＦＡＨ、ＨＰＤ、ＴＡＴ、ＡＴＰ７Ｂ、ＵＧＴ１Ａ１、ＯＴＣ、ＡＲＨ。

【０１５３】

従って、インビボで表現型の変化を誘導する方法が提供され、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を標的細胞、例えば肝臓に投与するステップを含む。好適な送達経路が本明細書に記載されるが、しかし一部の実施形態ではｉ．ｖ．注射が好ましい。ウイルスベクター、特にＡＡＶ、詳細にはＡＡＶ血清型２／８が好ましい。

【０１５４】

また、脂質代謝遺伝子、例えばＡｐｏＢをターゲティングする１つ以上のガイドを含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系も提供される。前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を投与するステップを含む、肥満症を治療する方法もまた想定される。１つ以上の肝臓遺伝子ノックダウン、特に例えばＡｐｏＢを含めた脂質代謝遺伝子のノックダウンを含むマウスモデルが好ましい。

【０１５５】

Ｃａｓ９の肝臓特異的プロモーターは明らかであるが、本明細書で言及されるものを含

み得る。好ましい例はＴＢＧである。
【０１５６】
実施例３８に示されるとおり、ガイドは１８～２３ヌクレオチド長であり得る。ガイドは１８～２２、または１９～２２、または１８～２１、２０～２２ヌクレオチド長であってもよいが、好ましくは２２ヌクレオチド長、および最も好ましくは２１ヌクレオチド長である。
【０１５７】
また、ＳａＣａｓ９イントロンへのガイド配列のパッケージング成功の原理証明も提供される。従って、１つ以上のガイド配列がＣａｓ９イントロンにパッケージング（配置または挿入）されているＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系が好ましい。
【０１５８】
Ｈ１プロモーターを使用することができ、状況によっては好ましいこともある。
【０１５９】
Ｒａｎ（Ｃｅｌｌ，１５４，２１　Ａｕｇ　２０１３）の研究を詳しく述べると、Ｄ１０Ａ二重ニッカーゼを使用するデュアルガイド手法におけるオーバーラップの程度が調べられた。－５～＋１ｂｐ（５’から５’）の間で最適な結果が示された。従って、デュアルガイド手法を用いてオフターゲット効果を最小限に抑えることが好ましい。これらは好ましくはその５’末端でゲノム標的の異なるＤＮＡ鎖上においてオーバーラップし、またはオーバーラップしそうになる。好ましくは、オーバーラップは－５～＋１ｂｐの範囲である。このような場合、Ｃａｓ９は好ましいＤ１０Ａ変異体などの二重ニッカーゼであることは理解されるであろう。
【０１６０】
Ｃａｓ９には複数のまたは反復するエピトープタグが好ましい。詳細には、実施例３９に、検出を向上させるための三重エピトープタグを示した。タグは好ましくはリピート、より好ましくは三重リピートである。ＨＡは好ましいＣａｓ９エピトープタグである。従って、一部の実施形態では三重ＨＡエピトープタグが好ましい。
【０１６１】
実施例３９は以下の具体的なポイントを提示する：
－　成功裏の分裂終了ニューロンにおけるＡＡＶ媒介性Ｃａｓ９インビボ送達ならびに効率的なゲノム改変の初めての実証；
－　Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡ発現細胞からの神経核の容易な単離を可能にする核タグ標識技法の開発について；
－　ニューロントランスクリプトームのＲＮＡｓｅｑ解析に向けた適用の実証；
－　電気生理学的試験および他の技法をどのようにＣａｓ９媒介性ゲノム摂動と統合して表現型の変化を決定し得るか；および
－　多重ターゲティングおよびＣａｓ９媒介性ゲノム編集を用いてげっ歯類の行動に関する遺伝子機能を調べる能力の実証。
【０１６２】
これに基づけば、実施例３９が２つの主要な領域：モデルの作成および試験を含めた、遺伝子機能の理解および試験；および遺伝子療法においてさらなる概念実証を提供することが分かり得る。
【０１６３】
以下でさらに考察するさらなる態様は、核タグ標識方法に関する。
【０１６４】
本明細書におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系への言及は、１つ以上のゲノム配列をターゲティングするために用いられる１つ又は複数のガイドと組み合わせた本明細書に提供されるＣａｓ９酵素に言及するための略記であることが理解されるであろう。ガイドへの言及には、ｓｇＲＮＡ、ならびに対象のゲノム中の標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列とｔｒａｃｒメイト配列とｔｒａｃｒ配列とを含む本明細書に記載されるキメラポリヌクレオチド配列が含まれる。

【０１６５】
データは本質的に、本発明に係る２つの別個のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系（Ｃａｓ９酵素と組み合わせたガイドＲＮＡ）を使用した遺伝子ノックダウンによって生じる表現型の変化、この場合、それによる遺伝子機能の摂動の成功を示す。選択された組織は脳組織であったが、しかしながらこれらの結果は、広範囲の分裂終了組織に関する原理証明を提供する。先行研究は分裂細胞（すなわち有糸分裂前期の細胞）に着目してきたため、これは重要な差異である。
【０１６６】
換言すれば、ＳｐＣａｓ９が分裂細胞のエンジニアリングに広く用いられているのに対し、本発明者らは、ＳｐＣａｓ９を分裂終了ニューロンのゲノムのエンジニアリングにも用い得ることを実証する。これは、ＮＨＥＪ媒介性インデル生成でノックダウンを作り出すことによって高効率で行われるが、ＨＤＲ機構を介した補修（修復テンプレートの提供時）が関与する治療用途もまた想定される。両方ともに、本明細書に示すＣａｓ９および１つまたは複数のＲＮＡガイドの送達および機能性発現の成功に依存する。
【０１６７】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系によって誘導される遺伝子型の変化が、次に表現型の変化をもたらすという事実もまた、上記の領域（遺伝子機能および遺伝子療法）の両方にとって重要である。
【０１６８】
第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系は、Ｍｅｃｐ２を指向する（ターゲティングする）ガイド配列を用いた。ガイドを含む１つのベクターとＣａｓ９を含む１つとを有するデュアルベクターＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を用いることに成功し、かかるデュアルベクター系の原理証明がさらに示された。デュアルベクターＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を定位注入によって脳内の２つの別個の部位、具体的には海馬歯状回および視覚野に送達することに成功した。いずれの場合にも、同じ遺伝子Ｍｅｃｐ２の遺伝子摂動が見られたことから、デュアルベクター系の送達に成功し、それが予想どおり働いたことで、Ｃａｓ９酵素（この場合ＳｐＣａｓ９）における転写および機能活性があり、ガイド配列によるゲノム標的配列へのＣａｓ９の動員が成功したことが示された。
【０１６９】
ＳｐＣａｓ９およびｓｇＲＮＡのＡＡＶ媒介性インビボ送達は、インタクトな神経回路内で正確なゲノム摂動を達成するための迅速かつ強力な技術を提供する。そのため、使用したベクターはＡＡＶベクターであったことから、一般におよび詳細にはデュアルベクターＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系、とりわけ分裂終了細胞および組織における、および詳細には脳におけるそれらの使用に関するさらなるエビデンスが加わった。
【０１７０】
当然ながら、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系、詳細にはＣａｓ９または１つまたは複数のガイドとＣａｓ９との両方からの発現を達成する際には、プロモーターの選択が重要であることは理解されるであろう。細胞および細胞ライフサイクルステージ特異性の好適な例は、文献から決定することができる。それにも関わらず、いくつかの非限定的な例を含む：ここでは肝臓特異的プロモーターＴＢＧ；Ｈ１プロモーター；トランケート型Ｈ１プロモーター；Ｕ６プロモーターを使用してＳａＣａｓ９の発現を駆動する。また、ガイドは必ずしも特異的プロモーターを必要としないため、１つ以上のガイドを同様にある／当該のＣａｓ９イントロンにパッケージングすることもできる。
【０１７１】
使用される第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系は多重化手法を含んだ。ＳｐＣａｓ９系の重要な利点の一つは、多重ゲノム編集を促進するその能力である。この第２の系は、好適なガイドを含めることにより、同じファミリーの３つ以上の遺伝子（この場合、Ｄｍｎｔ１、３ａおよび３ｂ）をターゲティングすることに成功し、複数の遺伝子の安定したノックアウトをもたらした。これは、生きている動物の組織における個々の遺伝子機能の探索のみならず、遺伝子ファミリー全体の機能の探索にもまた広く関係する。これは、以前は

これが不可能であったか、または長い年月をかけた古典的遺伝学によってのみ達成することができた脳などの組織にとって特に重要である。本発明者らは、単一または複数の遺伝子摂動（さらには完全なノックダウンまでも）が正常動物の分裂終了細胞で起こり得ることを示している。しかしながら、これはモデル生物（例えば既に遺伝子突然変異もしくは摂動を有しているか、またはある種の発現の変化を含むもの）またはトランスジェニック生物にも等しく適用することができ、モデル生物を作製し、かつモデル生物を使用して遺伝子機能を理解するための既存の方法の手っ取り早い代替法を与える。さらなるガイド（および／または全ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系）を用いて、同じ生物内で後の遺伝子摂動および／または復元（例えば、ＨＤＲに好適なｓｓＤＮＡなどの修復テンプレートを例えば提供することによる、摂動を受けた遺伝子の補修による遺伝子機能の回復）ラウンドを生じさせ得る。

【０１７２】

実際、一般に、単一または複数の遺伝子のＳｐＣａｓ９媒介性ターゲティングは、古典的な、より長い時間のかかる遺伝マウスモデルを用いて観察される形態学的、電気生理学的、および行動学的表現型を再現することができる。

【０１７３】

全遺伝子ファミリーまたは関連遺伝子をノックダウンする代わりに、ここでのデータはまた、３つ以上の無関係な遺伝子の同時ノックダウンも同様に実現可能であることの原理証明も提供する。これは全ての組織にわたって適用可能であるが、分裂終了組織、特に脳に関して特に強く提案される。

【０１７４】

本研究の別の有用な態様は、ＣＲＩＳＰＲを用いて遺伝子型の変化を生じさせ、次に電気生理学（特に脳およびＣＮＳ組織に関して）、生化学的、シーケンシングの、電気生理学的、および／または行動学的リードアウトなどの古典的なツールを用いて、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系によって誘導される遺伝子型の変化からどのような表現型の変化が（それが存在する場合に）生じるかを確立することで遺伝子機能を調べる組み合わせ手法、または統合手法をとり得ることを示したことである。例えば脳では、これにより、神経プロセスにおける個々のおよび一群の遺伝子の機能ならびに脳障害でのその役割をインビボで調べることが可能になる。

【０１７５】

本研究における遺伝子摂動の成功は、遺伝子機能の補修または復元、すなわち遺伝子療法におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の使用にも等しく適用可能である。これは、特に分裂終了細胞、特に脳のターゲティングに関連する。

【０１７６】

一般に、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の使用は、設計および作製に長い時間がかかり、かつ多重化できないＺｎフィンガー、および、ＣＲＩＳＰＲオフターゲット効果は二重ニッカーゼ（ｎｉｃａｋｓｅ）手法を用いて最小限に抑えることができるものの、オフターゲット効果が多過ぎるｓｈＲＮＡなど、既存の技法の改良を示す。

【０１７７】

組織のターゲティング

本明細書の本研究は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を適切な部位（すなわち目的の器官または組織内にある細胞）に送達することによる、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を使用した分裂終了細胞の遺伝子のターゲティングを裏付ける。好ましい組織は以下の器官内にある：

- 腎臓；
- 胃、膵臓、十二指腸、回腸および／または結腸を含む消化器系；
- 心臓；
- 肺；
- 脳、詳細にはニューロン、および／または一般にＣＮＳ；
- 網膜組織を含む眼；
- 内耳を含む耳；

・ 皮膚；
・ 筋肉；
・ 骨；および／または
・ 一般に肝臓。

【０１７８】
上記の多くは有糸分裂前期細胞を含み得るが、本発明のこの態様は、それらの器官内にある分裂終了細胞または組織に関することが理解されるであろう。

【０１７９】
特に、器官は腎臓または脳であることが好ましい。脳の範囲内では、データは、好ましい組織である海馬歯状回および視覚野への送達を特に示すが、しかしながら以下：一次運動野、一次聴覚野（ｐｒｉｍａｒｙ　ａｕｄｉｔｏｔｙ　ｃｏｒｔｅｘ）、一次体性感覚野、小脳、主嗅球、前頭前野、内梨状核、扁桃、黒質、線条体、淡蒼球、視床、視床下部、傍小脳脚核（ｐａｒａｂｒａｎｃｈｉａｌ　ｎｕｃｌｅｕｓ）、上オリーブ複合体、蝸牛神経核、乳頭核のいずれか１つ以上を含む他の組織もまた、一部の実施形態では好ましい。

【０１８０】
脳の細胞、詳細にはニューロンが、特に好ましい。

【０１８１】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系、特にＣａｓ９の発現を駆動するプロモーターの選択は、上述のとおり重要である。プロモーターは１つ以上の細胞型および細胞周期段階に特異的であり得るため、プロモーターの選択時に考慮するべきことは細胞周期段階（初期／後期）および細胞型である。好適なプロモーターとしては、一部の実施形態では以下の１つ以上を挙げることができる：

【０１８２】
【表１】

細胞型	プロモーター
興奮性ニューロン	CamkII
高速スパイキング介在ニューロン	パルブアルブミン
全ての介在ニューロン	vGAT
ドーパミン受容性ニューロン	DR1
ドーパミン受容性ニューロン	DR2
アストログリア	GFAP
活性ニューロン	Arc

【０１８３】
脳、詳細には海馬歯状回のターゲティングに使用されるデュアルベクターＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系は、２つの別個のウイルスベクター上のＳｐＣａｓ９およびｓｇＲＮＡ発現カセットにパッケージングされる。従ってＣａｓ９、詳細にはＳｐＣＡｓ９は、好ましくはアデノウイルスベクター、特にＡＡＶによって（すなわちＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９として）送達される。ガイドは、好ましくはアデノウイルスベクター、特にＡＡＶによってｓｇＲＮＡ発現カセットとして（すなわちＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅとして）送達される。この組織（海馬歯状回）および一般に脳に好ましい経路は定位注入である。

【０１８４】
遺伝子機能の理解および試験、ならびにそれを行うためのモデルの作成および使用

調べることのできる病態にはハンチントン病（Ｈｕｎｔｉｎｇｄｏｎ’ｓ）が含まれるが、本質的に分裂終了細胞に認められる任意の病態、および特にインビボでの調査が有益となり得るものまたは有用なモデルがないものが含まれる。

【０１８５】

上述のとおり、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を使用して分裂終了細胞における１つ以上の遺伝子の機能を調べることができる。これは、分裂終了細胞へのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の送達および発現によって達成することができ、ここでＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の１つまたは複数のガイドは、Ｃａｓ９をゲノム標的または目的の標的に動員するように設計される。同様に、分裂終了細胞内にＣａｓ９がタンパク質の（転写された）形態で既に含まれる場合、ガイドを分裂終了細胞に送達することで十分となる。分裂終了細胞内にＣａｓ９がポリヌクレオチド（転写されていない）として既に含まれる場合、分裂終了細胞へのガイドの送達ならびにＣａｓ９ポリヌクレオチドの転写の誘導が必要となる。ここでは、Ｃａｓ９をｔｅｔ（テトラサイクリン）オン・オフ系などの誘導性または抑制性プロモーターの制御下に置くことが有利となり得る。

【０１８６】

特に有望な一態様は、ＣＲＩＳＰＲ技法を表現型アッセイと統合して、遺伝子摂動、特にノックダウンによって生じる表現型の変化を（それが存在する場合に）決定することである。例えば、実施例３９は、特定のゲノムエレメントの生物学的機能に関する洞察を提供するためターゲティングされたゲノム摂動を定量的リードアウトと組み合わせて何を達成し得るかを示す。詳細には、脳におけるＣａｓ９媒介性インビボゲノム編集を電気生理学的記録法と組み合わせることによってもまた、特定の細胞型または回路成分に対するゲノム摂動の効果を研究し得る。広義には、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の使用（それによるＣａｓ９媒介性ゲノム摂動の提供）を生化学的、シーケンシングの、電気生理学的、および行動学的解析と組み合わせて、標的ゲノムエレメントの機能を研究することができる。

【０１８７】

従って一態様において、分裂終了細胞における１つ以上の遺伝子の機能を調べる方法が提供され、この方法は、以下に記載するとおりの欠損遺伝子型または遺伝子ノックダウンを誘導するステップと；その病態における１つ以上の遺伝子の発現の変化を決定するステップであって、それにより１つ以上の遺伝子の機能を調べるステップとを含む。

【０１８８】

場合により、この方法はまた、第２の細胞集団を対象に移植するステップであって、それにより欠損遺伝子型または遺伝子ノックダウンに関連する病態を誘導するステップも含み得る。これは、決定するステップより前であってもよい。

【０１８９】

以下は本発明の適切な態様に広範に適用される。細胞はヒト、動物またはモデル生物などの対象の細胞であってもよく、従って遺伝子機能はインビボで調べられる。しかしながら、細胞がエキソビボであり、例えば細胞培養物またはモデル器官もしくはオルガノイド中の細胞であり得ることもまた想定される。一部の実施形態では、この方法は、対象から第１の細胞集団を単離するステップと、場合によりそれらを培養するステップと、それらに１つ以上のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を形質導入するステップとを含み得る。さらなる任意選択の培養が続き得る。次に形質導入細胞を移植により対象に戻すことが行われ得る。

【０１９０】

細胞は、本明細書に記載される任意の組織または器官に由来し得る。脳は、前記１つ以上の遺伝子の機能を調べる方法を提供する好ましい一例であり、ここで分裂終了細胞は脳細胞、例えばニューロンである。特にインビボで、これは動物行動に対する遺伝子機能を調べることを可能にする。動物は、好ましくは哺乳動物、例えばげっ歯類である。不均一な細胞型の入り組んだ回路網で構成される神経系の複雑さを所与とすれば、ニューロンのゲノムをインビボで効率的に編集可能であることにより、自然文脈に組み込まれた関連細胞型における遺伝子機能の直接的な試験が可能となる。これは、訓練文脈条件下で試験し

たときノックアウトマウスが記憶固定障害を示した本発明者らのデータによって裏付けられる。本明細書の結果は、歯状回ニューロンにおけるＤＮＭＴファミリーメンバーのＣＲＩＰＳＲ－Ｃａｓ９媒介性ノックアウトが、行動課題における遺伝子の機能を探索するのに十分であることを実証している。

【０１９１】

これは、遺伝子機能の研究、詳細には神経回路の分析のため、インビボで哺乳類の脳における標的遺伝子ノックアウトを促進することにおけるＣａｓ９の多用途性を示している。生きている動物の脳に複数の遺伝子の安定したノックアウトを導入することには、生理学的および神経病理学的病態における多遺伝子機構の因果関係研究など、潜在的に広範囲に及ぶ適用性があるものと思われる。

【０１９２】

本研究の特質は、本出願者らが、培養初代マウス皮質ニューロンにおいて十分なレベルのＳｐＣａｓ９発現を達成する能力に基づきマウスＭｅｃｐ２プロモーター（２３５ｂｐ、ｐＭｅｃｐ２）７および最小ポリアデニル化シグナル（４８ｂｐ、ｓｐＡ）を選択したことである。Ｍｅｃｐ２遺伝子は、自閉症スペクトラム障害の一種であるレット症候群において主要な役割を果たす。Ｍｅｃｐ２をターゲティングするため、本発明者らは初めにマウスＭｅｃｐ２遺伝子のエクソン３をターゲティングするいくつかのｓｇＲＮＡを設計し、Ｎｅｕｒｏ－２ａ細胞を使用してそれらの有効性を評価した。ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイを用いて最も効率の高いｓｇＲＮＡを同定した。送達は、高力価ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９およびＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅの混合物（１：１比）の定位注入によった。本発明者らはまた、脳における多重ゲノム編集の可能性を試験することにも成功した。本出願者らは、核標識用のＧＦＰ－ＫＡＳＨを伴うタンデムの３つのｓｇＲＮＡからなる多重ｓｇＲＮＡ発現ベクターを設計した。

【０１９３】

従って、分裂終了細胞における１つ以上の遺伝子ノックダウンによって特徴付けられる病態を誘導する方法もまた提供される。かかる病態の例は多数あるが、例示されるとおりのレット症候群を挙げることができる。好適なプロモーターは明らかで、レット症候群にはＭｅｃｐ２プロモーターが理想的である。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系、詳細にはＣａｓ９の発現を駆動するためのプロモーターを選択する一つの方法は、目的の遺伝子に対するプロモーターを選択することである。

【０１９４】

従って一態様において、分裂終了細胞における１つ以上の欠損遺伝子（または遺伝子型（ｇｅｎｏｔｙｏｅ））または遺伝子ノックダウンによって特徴付けられる病態を誘導する方法が提供され、この方法は、

Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメントであって、ポリヌクレオチド配列が

（ａ）対象のゲノムにおける３つ以上の標的配列にハイブリダイズし得る１つ、２つ、３つ（ｔｈｅｅ）、４つまたはそれ以上のガイド配列、

（ｂ）ｔｒａｃｒメイト配列、および

（ｃ）ｔｒａｃｒ配列

を含む、第１の調節エレメント、および

ＩＩ．少なくとも（ａｔ　ｌｉｓｔ）１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメントであって、（ａ）、（ｂ）および（ｃ）が５’から３’への方向に並ぶ、第２の調節エレメント

［成分ＩおよびＩＩは系の同じまたは異なるベクター上にあり、転写時にｔｒａｃｒメイト配列はｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、

ＣＲＩＳＰＲ複合体は、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲ

ＩＳＰＲ酵素を含み、
ＣＲＩＳＰＲ酵素が第１の細胞集団のゲノムを変化させることにより、１つ以上の欠損遺伝子またはノックダウン遺伝子を有する第２の細胞集団が得られる］
を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を第１の細胞集団に形質導入するステップを含み得る。
【０１９５】
場合により、この方法はまた、対象から第１の細胞集団を単離するステップも含み得る。
【０１９６】
場合により、この方法はまた、第２の細胞集団を対象に移植するステップであって、それにより増殖状態を誘導するステップも含み得る。
【０１９７】
これには、標的細胞へと非機能性の（これには部分的に非機能性であることが含まれる）遺伝子型を誘導するステップであって、それにより研究用モデルを提供するステップ（後の機能性遺伝子型の回復を含む）が関わり得る。
【０１９８】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系はまた、分裂終了ニューロンにおける標的ノックアウトを可能にすることにより、細胞アッセイにおける遺伝子機能の研究を促進するために用いることもできる。
【０１９９】
ヌクレオチドを神経細胞に送達する方法は周知されており、Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ＮｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅにＫａｒｒａ ａｎｄ Ｄａｈｍ（５ Ｍａｙ ２０１０，３０（１８）：６１７１－６１７７；ｄｏｉ：１０．１５２３／ＪＮＥＵＲＯＳＣＩ．０１８３－１０．２０１０）によってレビューされている。例としては、電気的形質移入法（電気穿孔、ヌクレオフェクション、および単一細胞電気穿孔など）；化学的形質移入法（Ｃａ２＋リン酸共沈殿およびリポフェクションなど）；ウイルス送達（アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルスおよび単純ヘルペスウイルスなど）；および物理的形質移入法（マイクロインジェクションおよび微粒子銃（ＤＮＡコーティング金粒子など）が挙げられる。これらは全てＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の送達に使用することができるが、リポフェクション法またはウイルス法、特にＡＡＶまたはレンチウイルスが好ましい。
【０２００】
モデル
単一または複数の遺伝子をノックダウンしたモデルが提供される。例は、レット症候群用のげっ歯類モデル、Ｍｅｃｐ２ノックダウンであり得る。他の例としては、Ｄｍｎｔファミリーノックダウン、具体的にはＤｍｎｔ１、３ａおよび３ｂノックダウンが挙げられる。このように、神経学的病態を研究するモデルが提供される。行わなければならないことの全ては、目的の標的遺伝子を同定し、好適な１つまたは複数のガイドを設計し、かつそれらを好適なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系に含めて、それを必要に応じてインビボまたはエキソビボのいずれであろうと１つまたは複数の分裂終了細胞に送達することである。例えば、モデルが変化した樹状突起樹形態および／または棘密度を有し得ることが提供される。
【０２０１】
上述のとおり、オルガノイド（ｏｒａｇａｎｏｉｄ）または例えばチップ上にあるか、または足場に支持されている「オンチップ肝臓」もしくは耳、腎臓および脳組織のその非肝臓等価物など、モデル組織もまた提供される。動物モデルおよびモデル組織が好ましい。これらは、上述のとおり、Ｃａｓ９で既に形質転換されていて、従ってヌクレオチドまたはタンパク質形態でＣａｓ９を含んでいてもよい。これらには、Ｃａｓ９を１つまたは複数のガイドと共に送達する必要がなく、次にはそれによりはるかに高度な（ガイド）多重化を送達ベクター内に収めることが可能となり得るという利点がある。この場合もまた

、ｔｅｔオンまたはｔｅｔオフなどの誘導性または抑制性の系の使用がここで有利となり得る。

【０２０２】

これらのモデルは全て、上記に記載したとおりのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を使用して得ることができる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の多用途性に起因して、可能なモデルの範囲は、ヒト、げっ歯類、哺乳類またはその他のいずれであるかに関わらず、極めて多様であり、これは適切な１つまたは複数のガイドの単純な選択によって確立することができる。かかるモデルの作成方法もまた提供され、含む方法もまた提供される。

【０２０３】

遺伝子療法

実施例３９のデータは、遺伝子摂動、主としてノックダウンに焦点を置いていてる。遺伝子ノックダウンは、遺伝子療法に対するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の可能な適用の総定足数（ｑｕｏｒｕｍ）のうちの、重要であるにしても、ごく僅かな一部である可能性が高い。Ｙｉｎ ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎの論文で既に示されたとおり（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ ２８８４ ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ ３０ Ｍａｒｃｈ ２０１４）、フマリルアセト酢酸ヒドラーゼ（ＦＡＨ）の（エクソン８の最後のヌクレオチドにおけるＧからＡへの）突然変異によって引き起こされる本来致死的な病態であって、スプライシングにおけるエクソン８のスキッピングを引き起こしてトランケート型の不安定なＦＡＨタンパク質の形成をもたらし、毒性代謝産物の蓄積を生じる遺伝性チロシン血症Ｉ型（ＨＴＩ）において、欠損突然変異の補修後に機能表現型が回復し得る。Ａ突然変異を野生型のＧ遺伝子型に戻す補修により、表現型の回復がもたらされる。

【０２０４】

従って、本明細書で取られる手法は、本発明を遺伝子療法に妥当に適用し得ることを実証している。詳細には、デュアルベクター手法、核タグ標識手法、脳送達の特異体（注射の形態、使用されるプロモーターおよび／またはウイルスベクター）、ならびに多重化（同じ遺伝子内または異なる遺伝子内のいずれかの複数の標的に対する複数のガイドの使用）を、例示される遺伝子ノックダウンに関して補修遺伝子療法（すなわちここでは欠損遺伝子型が補修される）に等しく適用することができる。補修遺伝子療法と遺伝子ノックダウンとの主な違いは、欠損遺伝子型、例えば点突然変異（例えば嚢胞性線維症におけるもの、Ｓｃｈｗａｎｋ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ １３，６５３－６５８ ５ Ｄｅｃ ２０１３を参照のこと）を補修するためには、修復テンプレートを提供してＨＤＲ機構を刺激し、理想的には好適なＣａｓ９ニッカーゼも同様に提供することが有利な点である。

【０２０５】

従って、本ベクターは、好ましくは分裂終了細胞をターゲティングする。１つまたは複数のガイドが欠損遺伝子型をターゲティングする場合、好ましくは、修復テンプレート、例えば補修される配列（機能表現型を提供する遺伝子型）に対応するｓｓＤＮＡもまた提供される。修復テンプレートは本明細書に記載される。Ｃａｓ９は１つまたは複数のガイドと同じまたは異なるベクターに提供されてもよい。ベクターは、好ましくはウイルスベクター、より好ましくはアデノウイルスベクター、および最も好ましくはＡＡＶベクターである。細胞への送達は、好ましくは適宜静脈内注射によるか、または定位注入による。プロモーターの選択も重要であってよく、有利な例は本明細書に提供される。

【０２０６】

分裂終了細胞における欠損遺伝子型によって引き起こされるか、またはそれに関連する遺伝性疾患または病態を治療する方法が提供され、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を適切な細胞に送達することを含む。欠損遺伝子型は非野生型遺伝子型であってもよい。詳細には、単一点突然変異および／または単一遺伝子障害が、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を使用した治療に特に適している。複数の遺伝子を編集または補修する必要がある場合、多重手法を用いてそれらを全て同時にターゲティングし得る。あるいは、２ラウンド以上の異なるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を想定することができる。好ましくは、野生型遺伝

子型が補修される。それは必ずしも最も一般的な遺伝子型である必要はなく、但しその表現型において機能が回復し、または向上するものとする。

【０２０７】

表現型の回復の例は、ＶＧＬＵＴ３機能を回復する聴覚の回復、ひいてはマウスの内耳における聴覚の回復である（Ｏｍａｒ Ａｋｉｌ，Ｒｅｂｅｃｃａ Ｐ．Ｓｅａｌ，Ｋｅｖｉｎ Ｂｕｒｋｅ，Ｃｈｕａｎｓｏｎｇ Ｗａｎｇ，Ａｕｒａｓｈ Ａｌｅｍｉ，Ｍａｔｔｈｅｗ Ｄｕｒｉｎｇ，Ｒｏｂｅｒｔ Ｈ．Ｅｄｗａｒｄｓ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ Ｒ．Ｌｕｓｔｉｇ．Ｒｅｓｔｏｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｅａｒｉｎｇ ｉｎ ｔｈｅ ＶＧＬＵＴ３ Ｋｎｏｃｋｏｕｔ Ｍｏｕｓｅ Ｕｓｉｎｇ Ｖｉｒａｌｌｙ Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ．Ｎｅｕｒｏｎ，２０１２；７５（２）：２８３ ＤＯＩ：１０．１０１６／ｊ．ｎｅｕｒｏｎ．２０１２．０５．０１９）。これには、ＶＧＬＵＴ３それ自体のＡＡＶ媒介性送達が用いられたが、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系もまた使用でき、好ましくはＡＡＶベクターもまた使用して、内耳の細胞をターゲティングし、非機能性ＶＧＬＵＴ３遺伝子型を補修して、同様の表現型の帰結、すなわち聴覚の回復を得ることは全く妥当である。従って、内耳へのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の、好ましくはＡＡＶベクターを使用した送達、ひいては難聴の治療が好ましい。実際、網膜を含めた眼、鼻および耳（特に内耳）などの感覚器における遺伝子機能の回復が好ましい。

【０２０８】

分裂終了組織（眼、耳他）における障害の考察を含む比較的最近の概説は、Ｋａｕｆｍａｎｎ ｅｔ ａｌ（ＥＭＢＯ Ｍｏｌ Ｍｅｄ（２０１３（，５，ｐ１６４２－１６６１）である。これは、分裂終了組織の単一遺伝子障害の補修におけるＡＡＶの有用性を確認する。これは、「低炎症活性などの他の特徴と相まって、それらは優れた安全性プロファイルを有し、従ってインビボ遺伝子療法に極めて魅力的なツールであることを示している。実際、Ｇｌｙｂｅｒａ（登録商標）は直接の筋肉内注射用の組換えＡＡＶである……」と述べている。この論文は、引用によって、標的組織としての網膜、中枢神経系、肝臓、骨格および心筋における遺伝子療法をレビューしている。そして、引用によって、「初期研究はプロトタイプＡＡＶ血清型２型ベクターを利用したが、ＡＡＶベクターのポートフォリオは最近、さらなる血清型およびさらにはエンジニアリングされたカプシドを含むまでに拡張されている」ことを示している。ＫａｕｆｍａｎｎおよびＫａｕｆｍａｎｎで引用されている文献は、本明細書によって参照により本明細書に援用される。

【０２０９】

トランスクリプトームのＲＮＡｓｅｑ解析

ＳｐＣａｓ９媒介性ゲノム摂動と集団レベルＲＮＡｓｅｑ解析との組み合わせは、転写調節を特徴付け、かつ考察中の細胞における特定の機能または疾患過程に重要であり得る遺伝子を提案する方法を提供する。詳細には、細胞は脳由来、詳細にはニューロンである。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系などの即効性の技法は、本質的に一過性であるトランスクリプトームの研究において有利である。従って、トランスクリプトームの解析（ＲＮＡｓｅｑ）における本発明に係るＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の使用が提供される。

【０２１０】

核タグ標識方法

ＳｐＣａｓ９を発現するニューロンの免疫蛍光法による同定を促進するため、本発明者らは、ＳｐＣａｓ９をＨＡ－エピトープタグ（ヒトインフルエンザ赤血球凝集素（ｈｅｍａｇｌｕｔｔｉｎｉｎ）に由来する、発現ベクターで広く用いられている一般的なエピトープタグ）でタグ標識した。

【０２１１】

ＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅベクターに関しては、本発明者らはＵ６－ｓｇＲＮＡ発現カセットならびにヒトシナプシンＩプロモーターによって駆動されるＫＡＳＨ核膜貫通ドメインと融合した緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）にパッケージングした。ＧＦＰ－ＫＡＳＨ融合タンパク質はＧＦＰを核外膜に指向させ、ＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅによって形質導入されたインタクトな神経核の蛍光に基づく同定および精製を可能にする。

【０２１２】
従って、本発明のベクターが、好ましくは同じようにして適合される。ひいては、Ｃａｓ９がＨＡ－エピトープタグなどのエピトープタグでタグ標識されるベクターが提供される。Ｃａｓ９は、本明細書に記載される任意のＣａｓ９、例えばＳｐまたはＳａＣａｓ９であってもよく、および任意の変異体（例えばＤ１０Ａ二重ニッカーゼ等）であってもよく、但し、それは適切にタグ標識されているか、またはタグ標識することができるものとする。
【０２１３】
本発明のベクターはまた、ガイドＲＮＡを発現カセット内にパッケージングするように適合されてもよく、この発現カセットは以下を含み：
・　レポータータンパク質；および
・　場合により、Ｕ６などの、ガイドＲＮＡに好適なプロモーター；
ここでレポータータンパク質は、それに好適なプロモーターに作動可能に結合している核膜貫通ドメインと融合される。
【０２１４】
レポータータンパク質は、好ましくは蛍光タンパク質、例えば緑色、赤色または黄色蛍光タンパク質のもの（ＧＦＰ、ＲＦＰ、ＹＦＰ）などである。
【０２１５】
核膜貫通ドメインの例としては、ＫＡＳＨ様ドメイン、Ｓｕｎ２ドメイン、ＬＥＭドメインが挙げられる。一部の好ましい実施形態では、核膜貫通ドメインはＫＡＳＨ核膜貫通である。好ましくは、膜貫通ドメインのプロモーターはヒトシナプシンＩプロモーターである；本明細書に引用される文献も参照のこと。
【０２１６】
このタグ標識手法は、シングルまたはデュアルベクター系内で用いられ得るが、シングルベクター系ではスペースが限られており、かつ小さくした別個のタグがさらに必要になるため、好ましくはデュアルベクター系内で用いられ得る。
【０２１７】
さらに、このタグ標識技法の各態様は、他と独立して用いることができ、従ってＣａｓ９のエピトープタグ標識を単独で用いることができ、またはレポーター／蛍光タンパク質カセット手法を単独で用いることができ、またはより好ましくは両方を一緒に用いることができる。
【０２１８】
Ｋａｎａｓｔｙ ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ（Ｎａｔｕｒｅ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ，Ｖｏｌ １２ Ｎｏｖ ２０１３）は、当初２０１３年3月１１日に提出され、２０１３年１０月２３日にオンラインで発表された、ＲＮＡｉの送達の有用なレビューである。ＲＮＡｉとＣＲＩＳＰＲガイド配列との類似性により、このおよびＲＮＡｉに関する他の技術の教示は、本発明者らのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系におけるガイドの送達機構について情報を与えるものである。記載される教示のいくつかはＣａｓ９の送達にも同様に好適である。場合によっては、本発明者らのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系のガイドをＣａｓ９と別個に送達することが有用であり得る。これは、デュアルベクター送達系の一部としてであってもよく、ここでベクターは、広義の観点では、特にウイルスベクターというよりむしろ、単純に任意の送達手段と考えられる。Ｃａｓ９をウイルスベクターで送達し得ること、およびゲノム標的に特異的なガイドを別個に送達することが想定される。本明細書で考察するとおり、ガイドはＣａｓ９と同じベクタータイプ、例えばデュアルベクター系で送達することができ、ここでＣａｓ９はＡＡＶベクターで送達され、１つまたは複数のガイドは別個のＡＡＶベクターで送達される。これは実質的に同時に行うことができ（すなわち同時送達）、しかしまた、数週間または数ヶ月もの間隔が空いた別個の時点で行われてもよい。例えば、初回のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系ラウンドが送達されていて、しかしながらこのとき続いてさらなるガイドを提供する必要がある場合、恐らくは標的細胞でなおも機能している当初のＣａｓ９を再利用し得る。Ｃａｓ９が誘導性プロモーターの制御下に

ある場合、標的細胞における新しいＣＡｓ９の転写の誘導が好ましい。同様に、本明細書に提供されるＣＡｓ９を発現するモデルが使用される場合、必要となるのはガイドの送達のみである。従って、Ｃａｓ９とは別にガイドの送達が必要な場合、ガイドはＲＮＡｉとほぼ同じように送達し得る。従って、Ｋａｎａｓｔｙによるレビューは、好適な多くの公知の手法を、特に肝臓に着目して示すのに役立つが、しかしこの送達手段は概して広範囲の細胞に適切である。例としては、以下が挙げられる：

・　「リポソーム送達系、ならびに脂溶性分子とコンジュゲートしたｓｉＲＮＡは血清リポタンパク質と相互作用し、続いて肝細胞に侵入して、肝細胞がそれらのリポタンパク質を取り込む」

・　ペグ化；

・　以下のようなコンジュゲート：

ａ．ダイナミックポリコンジュゲート（ＤＰＣ、１０ｎｍナノ粒子）、これはＲＮＡｉを送達してＡｐｏＢを成功裏に抑制することが示されている（これにより、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系によるＡｐｏＢのターゲティングに関する本発明者らの研究とクロスオーバーする）；および

ｂ．三分岐ＧａｌＮＡｃコンジュゲート

ｃ．は「両方ともに極めて有効」である（特にＧａｌＮＡｃ）；

・　以下を含む他のナノ粒子：

ｄ．シクロデキストリンポリマーナノ粒子（ＣＤＰ）、アダマンチン－ＰＥＧ（ＡＤ－ＰＥＧ）およびアダマンチン－ＰＥＧ－トランスフェリン（ＡＤ－ＰＥＧ－Ｔｆ）などのさらなる製剤成分を含む；

ｅ．カチオン性またはイオン性脂質、遮蔽脂質、コレステロールおよび内因性または外因性標的リガンドを含めた、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）。内因性標的リガンドの例は、ＲＢＰ受容体を発現する肝および膵星細胞のターゲティングに有用なレチノール結合タンパク質（ＲＢＰ）である。外因性標的リガンドの例はＧａｌＮａｃであり、これもまた肝細胞上のアシアロ糖タンパク質受容体を介して肝臓をターゲティングする。Ａｎｌｙｌａｍ’ｓ　ＡＬＮ－ＶＳＰでは併用手法が見られる；

・　「肝臓内皮における開窓術によって直径１００～２００ｎｍの分子を血流から拡散させ、肝実質細胞および他の肝細胞に侵入させることが可能になる」；

・　ＧａｌＮＡｃなどのリガンドは、マンノース受容体を発現する非実質肝細胞、および好適なｓｉＲＮＡとＧａｌＮＡｃリガンドとのコンジュゲートがＰＣＳＫ９を成功裏に抑制することが示されている肝細胞への送達に好適である；および

・　予め定義された３Ｄ構造にハイブリダイズするように設計された相補的な（ｃｏｍｐｌｉｍｅｎｔａｒｙ）ＤＮＡ断片で構成されるオリゴヌクレオチドナノ粒子（ＯＮＰ）。好適な３’オーバーハング（ｏｖｅｒｈａｎｄ）配列を使用して６個のｓｉＲＮＡ鎖を各粒子に、指定した位置であっても、結合させることができた。流体力学的径は約２９ｎｍであった。

【０２１９】

これらの手法は、一部の実施形態では少なくともＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系用のガイドの送達に好ましい。特に、ダイナミックポリコンジュゲートまたはレチノール結合タンパク質などの内因性標的リガンドもしくはＧａｌＮａｃなどの外因性標的リガンドの使用が好ましい。

【０２２０】

さらに別の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９媒介性ゲノム編集を用いて疾患突然変異および／または表現型を補修することができる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９媒介性ゲノム編集を用いて肝臓および／またはヘパトサイトにおける疾患突然変異および／または表現型を補修し得ることは、全体として参照により本明細書に援用される、ウェブサイトｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｄｏｉｆｉｎｄｅｒ／１０．１０３８／ｎｂｔ．２８８４で入手可能なＮａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　オンライン刊行　３０　Ｍａｒｃｈ　２０１４；オンライン修正　３１　Ｍａｒｃｈ　２０１４に発表されたＨａｏ　Ｙｉｎ

ｅｔ ａｌ．による“Ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｗｉｔｈ Ｃａｓ９ ｉｎ ａｄｕｌｔ ｍｉｃｅ ｃｏｒｒｅｃｔｓ ａ ｄｉｓｅａｓｅ ｍｕｔａｔｉｏｎ ａｎｄ ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ”と題される論稿に説明される。この論文は、ヒト疾患遺伝性チロシン血症のマウスモデルにおけるヘパトサイトのＦａｈ突然変異のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９媒介性補修に関する。流体力学的注入によるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の成分の送達により、約１／２５０個の肝細胞で野生型Ｆａｈタンパク質の初期発現が生じたことが示された。さらに、Ｆａｈ陽性ヘパトサイトの増加が体重減少の表現型をレスキューしたことが示された。

【０２２１】

本方法の利点は、ＣＲＩＳＰＲ系がオフターゲット結合およびその結果として生じる副作用を回避することである。これは、標的ＤＮＡに対して高度な配列特異性を有するように構成された系を使用して達成される。

【０２２２】

Ｃａｓ９

Ｃａｓ９の最適化を用いて機能を増強しまたは新規機能を開発してもよく、キメラＣａｓ９タンパク質を作成することができる。本出願人らが作成した例を実施例６に提供する。キメラＣａｓ９タンパク質は、異なるＣａｓ９ホモログの断片を組み合わせることにより作製し得る。例えば、本明細書に記載されるＣａｓ９からの２つの例示的なキメラＣａｓ９タンパク質。例えば、本出願人らは、Ｓｔ１Ｃａｓ９のＮ末端（このタンパク質からの断片は太字である）をＳｐＣａｓ９のＣ末端と融合した。キメラＣａｓ９を作製する利益には、以下の一部または全部が含まれる：毒性の低下；真核細胞における発現の向上；特異性の亢進；タンパク質の分子量の低下、例えば、異なるＣａｓ９ホモログの最も小さいドメインを組み合わせてより小さいタンパク質を作製すること；および／またはＰＡＭ配列要件の変更。

【０２２３】

Ｃａｓ９は、汎用ＤＮＡ結合タンパク質として用いられ得る。例えば、および実施例７に示すとおり、本出願人らは、ＤＮＡ標的の両鎖の開裂に関与する２つの触媒ドメイン（Ｄ１０およびＨ８４０）を突然変異させることにより、Ｃａｓ９を汎用ＤＮＡ結合タンパク質として使用した。標的遺伝子座における遺伝子転写を上方制御するため、本出願人らは転写活性化ドメイン（ＶＰ６４）をＣａｓ９と融合した。他の転写活性化ドメインが公知である。実施例１７に示すとおり、転写活性化が可能である。同様に実施例１７に示すとおり、標的遺伝子配列に結合し、ひいてはその活性を抑制するＣａｓ９リプレッサー（ＤＮＡ結合ドメイン）を使用して遺伝子抑制（この場合β－カテニン遺伝子の）が可能である。

【０２２４】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、アデノウイルスまたは他のプラスミドもしくはウイルスベクタータイプを使用して、詳細には、例えば、米国特許第８，４５４，９７２号明細書（アデノウイルス用の配合、用量）、同第８，４０４，６５８号明細書（ＡＡＶ用の配合、用量）および同第５，８４６，９４６号明細書（ＤＮＡプラスミド用の配合、用量）の配合および用量、ならびにレンチウイルス、ＡＡＶおよびアデノウイルスが関わる臨床試験およびそうした臨床試験に関する文献の配合および用量を使用して、Ｃａｓ９および１つ以上のガイドＲＮＡを送達することができる。例えば、ＡＡＶについては、投与経路、配合および用量を米国特許第８，４５４，９７２号明細書にあるとおりとし、およびＡＡＶが関わる臨床試験にあるとおりとすることができる。アデノウイルスについては、投与経路、配合および用量を米国特許第８，４０４，６５８号明細書にあるとおりとし、およびアデノウイルスが関わる臨床試験にあるとおりとすることができる。プラスミド送達については、投与経路、配合および用量を米国特許第５，８４６，９４６号明細書にあるとおりとし、およびプラスミドが関わる臨床試験にあるとおりとすることができる。用量は、平均７０ｋｇの個体に基づくかまたはそれに対して推定してもよく、異なる体重および種の患者、対象、哺乳動物用に調整することができる。投与頻度は、

患者または対象の年齢、性別、全般的な健康、他の状態ならびに対処すべき特定の状態または症状を含めた通常の要因に依存して、医学または獣医学の実務者（例えば、医師、獣医師）の裁量の範囲内にある。

【０２２５】

ウイルスベクターは目的の組織に注入され得る。細胞型に特異的なゲノム改変については、Ｃａｓ９の発現を細胞型特異的プロモーターによってドライブすることができる。例えば、肝臓特異的発現はアルブミンプロモーターを使用してもよく、およびニューロン特異的発現はシナプシンＩプロモーターを使用してもよい。

【０２２６】

トランスジェニック動物および植物

トランスジェニック動物（モデル）もまた提供され、以下は、エキソビボモデル組織および組織集合、例えば、オルガノイド、オンチップ肝臓などにも同様に適用される。好ましい例としては、Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチドまたはタンパク質それ自体という意味においてＣａｓ９を含む動物が挙げられる。マウス、ラットおよびウサギが好ましい。本明細書で例示されるとおり構築物でトランスジェニックマウスを作成するには、純粋な線状ＤＮＡを偽妊娠雌、例えばＣＢ５６雌由来の接合体の前核に注入し得る。次にファウンダーが同定され、遺伝子型が決定され、ＣＢ５７マウスと戻し交配され得る。次に構築物がクローニングされ、場合により、例えばサンガーシーケンシングによって検証され得る。例えばモデルにおいて１つ以上の遺伝子がノックアウトされる場合、ノックアウトが想定される。しかしながらノックインもまた（単独でまたは組み合わせで）想定される。例示的なノックインＣａｓ９マウスを作成しており、これを例示するが、Ｃａｓ９ノックインが好ましい。Ｃａｓ９ノックインマウスを作成するには、本明細書に記載されるとおり（図２５Ａ～図２５Ｂおよび図２６）、同じ構成的および条件的構築物の標的をＲｏｓａ２６遺伝子座に仕向け得る。Ｒｏｓａ遺伝子座の標的化に関するＳａｎｇａｍｏ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願公開第２０１２００１７２９０号明細書および同第２０１１０２６５１９８号明細書の方法を、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系を利用するように改良し得る。別の実施形態において、Ｒｏｓａ遺伝子座の標的化に関するＣｅｌｌｅｃｔｉｓに譲渡された米国特許出願公開第２０１３０２３６９４６号明細書の方法もまた、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系を利用するように改良し得る。

【０２２７】

条件的Ｃａｓ９マウスの有用性：本出願人らは、２９３細胞において、Ｃｒｅとの同時発現によりＣａｓ９条件的発現構築物を活性化し得ることを示している。本出願人らはまた、Ｃｒｅが発現するとき正しくターゲティングされるＲ１　ｍＥＳＣが活性Ｃａｓ９を有し得ることも示す。Ｃａｓ９の後にはＰ２Ａペプチド開裂配列と、次にＥＧＦＰが続くため、本出願人らはＥＧＦＰを観察することにより発現の成功を特定する。本出願人らは、ｍＥＳＣにおけるＣａｓ９活性化を示している。この同じ概念が、条件的Ｃａｓ９マウスを極めて有用にするものである。本出願人らはそれらの条件的Ｃａｓ９マウスを、Ｃｒｅを遍在的に発現するマウス（ＡＣＴＢ－Ｃｒｅ系統）と交配させることができ、あらゆる細胞でＣａｓ９を発現するマウスが得られ得る。胎仔または成体マウスにおいてゲノム編集を誘導するために必要なことはキメラＲＮＡの送達のみであるはずである。興味深いことに、条件的Ｃａｓ９マウスを組織特異的プロモーターの制御下でＣｒｅを発現するマウスと交配させる場合、同様にＣｒｅを発現する組織にのみＣａｓ９が存在するはずである。この手法を用いて正確な組織に限ったゲノムの編集を、同組織にキメラＲＮＡを送達することにより行い得る。

【０２２８】

上述のとおり、トランスジェニック動物もまた、トランスジェニック植物、特に作物および藻類と同様に提供される。トランスジェニック植物は、疾患モデルを提供すること以外の適用で有用であり得る。そうした適用には、例えば通常野生型で見られるより高いタンパク質、炭水化物、栄養素またはビタミンレベルの発現による食糧または飼料生産が含

まれ得る。この点で、トランスジェニック植物、特に豆類および塊茎、および動物、特に家畜（乳牛、ヒツジ、ヤギおよびブタ）などの哺乳動物、また家禽および食用昆虫も好ましい。

【０２２９】

トランスジェニック藻類または他の植物、例えばセイヨウアブラナが、例えば植物油またはアルコール（特にメタノールおよびエタノール）などのバイオ燃料の生産において特に有用であり得る。これらは、油またはバイオ燃料産業で使用される高レベルの油またはアルコールを発現または過剰発現するようにエンジニアリングされ得る。

【０２３０】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）

インビボ送達の点では、ＡＡＶはいくつかの理由で他のウイルスベクターと比べて有利である：

毒性が低い（これは、免疫応答を活性化し得る細胞粒子の超遠心が不要であるという精製方法に起因し得る）

宿主ゲノムにインテグレートされないため挿入突然変異生成を引き起こす可能性が低い。

【０２３１】

ＡＡＶは４．５または４．７５Ｋｂのパッケージング限界を有する。これは、Ｃａｓ９ならびにプロモーターおよび転写ターミネーターを全て同じウイルスベクターに詰め込まなければならないことを意味する。４．５または４．７５Ｋｂより大きい構築物はウイルス産生の著しい低下を引き起こし得る。ＳｐＣａｓ９は非常に大きく、遺伝子それ自体が４．１Ｋｂを超えるため、ＡＡＶにパッケージングすることが難しい。従って本発明の実施形態は、より短いＣａｓ９のホモログを利用することを含む。例えば：

【０２３２】

【表２】

種	Cas9サイズ
コリネバクター・ジフテリア(Corynebacter diphtheriae)	3252
ユーバクテリウム・ベントリオサム(Eubacterium ventriosum)	3321
ストレプトコッカス・パスツリアナス(Streptococcus pasteurianus)	3390
ラクトバシラス・ファーシミニス(Lactobacillus farciminis)	3378
スフェロケタ・グロバス(Sphaerochaeta globus)	3537
アゾスピリラム属種(Azospirillum) B510	3504
グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィカス(Gluconacetobacter diazotrophicus)	3150
ネイセリア・シネレア(Neisseria cinerea)	3246
ロゼブリア・インテスティナリス(Roseburia intestinalis)	3420
パービバキュラム・ラバメンティボランス(Parvibaculum lavamentivorans)	3111
黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)	3159
ニトラティフラクター・サルスギニス(Nitratifractor salsuginis) DSM 16511	3396
カンピロバクター・ラリ(Campylobacter lari) CF89-12	3009
ストレプトコッカス・サーモフィラス(Streptococcus thermophilus) LMD-9	3396

【０２３３】

従ってこれらの種は、概して好ましいＣａｓ９種である。本出願人らは、送達およびインビボマウス脳Ｃａｓ９発現データを示している。

【０２３４】

インビボでゲノム改変を媒介するためＣａｓ９コード核酸分子、例えばＤＮＡをウイルスベクターにパッケージングする２つの方法が好ましい：
ＮＨＥＪ媒介性遺伝子ノックアウトを達成するため：
単一ウイルスベクター：
２つ以上の発現カセットを含むベクター：
プロモーター－Ｃａｓ９コード核酸分子－ターミネーター
プロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター
プロモーター－ｇＲＮＡ２－ターミネーター
プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーター（ベクターのサイズ限界に至るまで）
二重ウイルスベクター：
Ｃａｓ９の発現をドライブするための１つの発現カセットを含むベクター１
プロモーター－Ｃａｓ９コード核酸分子－ターミネーター
１つ以上のガイドＲＮＡの発現をドライブするためのもう１つの発現カセットを含むベクター２
プロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター
プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーター（ベクターのサイズ限界に至るまで）
相同性組換え修復を媒介するため。上記に記載する単一および二重ウイルスベクター手法に加え、さらなるベクターを使用して相同性組換え修復テンプレートが送達される。

【０２３５】

Ｃａｓ９コード核酸分子の発現をドライブするために使用されるプロモーターとしては、以下を挙げることができる：
ＡＡＶ　ＩＴＲはプロモーターとして働き得る：これは、追加的なプロモーターエレメント（これはベクター中でスペースを取り得る）の必要性をなくすのに有利である。空いた追加のスペースは、追加的なエレメント（ｇＲＮＡ等）の発現のドライブに使用することができる。また、ＩＴＲ活性は比較的弱いため、Ｃａｓ９の過剰発現に起因する毒性を低下させるためにも使用することができる。

【０２３６】

遍在的な発現には、以下のプロモーターを使用することができる：ＣＭＶ、ＣＡＧ、ＣＢｈ、ＰＧＫ、ＳＶ４０、フェリチン重鎖または軽鎖等

【０２３７】

脳での発現には、以下のプロモーターを使用することができる：全てのニューロンに対するシナプシンＩ、興奮性ニューロンに対するＣａＭＫＩＩα、ＧＡＢＡ作動性ニューロンに対するＧＡＤ６７またはＧＡＤ６５またはＶＧＡＴ等

【０２３８】

肝臓での発現には、アルブミンプロモーターを使用することができる。

【０２３９】

肺での発現には、ＳＰ－Ｂを使用することができる。

【０２４０】

内皮細胞にはＩＣＡＭを使用することができる。

【０２４１】

造血細胞にはＩＦＮβまたはＣＤ４５を使用することができる。

【０２４２】

骨芽細胞にはＯＧ－２を使用することができる。

【０２４３】

ガイドＲＮＡのドライブに使用されるプロモーターとしては、以下を挙げることができる：
Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター、例えばＵ６またはＨ１
Ｐｏｌ　ＩＩプロモーターおよびイントロンカセットを使用することによるｇＲＮＡの発現
ＡＡＶに関して、ＡＡＶはＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはそれらの任意の組み合

わせであってよい。標的とする細胞に関連するＡＡＶのＡＡＶを選択することができる；例えば、脳または神経細胞を標的にするためＡＡＶ血清型１、２、５またはハイブリッドカプシドＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはそれらの任意の組み合わせを選択することができ；および心臓組織を標的にするためＡＡＶ４を選択することができる。ＡＡＶ８は肝臓への送達に有用である。上記のプロモーターおよびベクターは個々に好ましい。

【０２４４】

ＲＮＡ送達もまた有用なインビボ送達方法である。図２７は送達およびインビボマウス脳Ｃａｓ９発現データを示す。リポソームまたはナノ粒子を使用してＣａｓ９およびｇＲＮＡ（および、例えばＨＲ修復テンプレート）を細胞に送達することが可能である。従ってＣＲＩＳＰＲ酵素、例えばＣａｓ９の送達および／または本発明のＲＮＡの送達は、ＲＮＡ形態で、微小胞、リポソームまたはナノ粒子を介してもよい。例えば、インビボ送達のためＣａｓ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡをリポソーム粒子にパッケージングすることができる。リポソーム形質移入試薬、例えばＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのリポフェクタミンおよび他の市販の試薬は、ＲＮＡ分子を肝臓に有効に送達することができる。

【０２４５】

ＮＨＥＪまたはＨＲ効率を増強させることもまた、送達の助けとなる。ＮＨＥＪ効率は、Ｔｒｅｘ２などの末端プロセシング酵素を同時発現させて増強することが好ましい（Ｄｕｍｉｔｒａｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．２０１１　Ａｕｇｕｓｔ；１８８（４）：７８７－７９７）。ＨＲ効率は、Ｋｕ７０およびＫｕ８６などのＮＨＥＪ機構を一過性に阻害して増加させることが好ましい。ＨＲ効率はまた、ＲｅｃＢＣＤ、ＲｅｃＡなどの原核生物または真核生物相同組換え酵素を同時発現させて増加させることもできる。

【０２４６】

種々の送達手段が本明細書に記載され、本節でさらに考察される。

【０２４７】

ウイルス性送達：ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えばＣａｓ９および／または本ＲＮＡのいずれか、例えばガイドＲＮＡは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、アデノウイルスまたは他のウイルスベクター型、またはそれらの組み合わせを使用して送達することができる。Ｃａｓ９および１つ以上のガイドＲＮＡは１つ以上のウイルスベクターにパッケージングすることができる。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、例えば筋肉内注射によって目的の組織に送達されるが、他の場合にはウイルス性送達は静脈内、経皮的、鼻腔内、経口、粘膜、または他の送達方法による。かかる送達は単回用量によっても、あるいは複数回用量によってもよい。当業者は、本明細書における送達される実際の投薬量が、ベクターの選択、標的細胞、生物、または組織、治療対象の全身状態、求められる形質転換／改変の程度、投与経路、投与方法、求められる形質転換／改変のタイプ等の種々の要因に応じて大幅に異なり得ることを理解する。

【０２４８】

かかる投薬量は、例えば、担体（水、生理食塩水、エタノール、グリセロール、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナッツ油、ゴマ油等）、希釈剤、薬学的に許容可能な担体（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、薬学的に許容可能な賦形剤、および／または当該技術分野において公知の他の化合物をさらに含有し得る。かかる投薬量配合は当業者により容易に確かめられる。投薬量は、１つ以上の薬学的に許容可能な塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等の鉱酸塩；および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等の有機酸塩をさらに含有し得る。加えて、補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝物質、ゲルまたはゲル化材料、香味料、着色料、マイクロスフェア、ポリマー、懸濁剤等もまた本明細書において存在し得る。加えて、１つ以上の他の従来の医薬品成分、例えば保存剤、保湿剤、懸濁剤、界面活性剤、抗酸化剤、固化防止剤、充填剤、キレート剤、コーティング剤、化学的安定剤等もまた、特に剤形が再構成可能な形態である場合に存在し得る。好適な例示的成分としては、微結晶性セルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポ

リソルベート８０、フェニルエチルアルコール、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルバニリン、グリセリン、フェノール、パラクロロフェノール、ゼラチン、アルブミンおよびそれらの組み合わせが挙げられる。薬学的に許容可能な賦形剤の詳細な考察は、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ（Ｍａｃｋ　Ｐｕｂ．Ｃｏ．，Ｎ．Ｊ．１９９１）（参照により本明細書に組み込まれる）を参照することができる。

【０２４９】

本明細書のある実施形態では、送達はアデノウイルスを介し、これは、少なくとも１×１０^{5}粒子（粒子単位、ｐｕとも称される）のアデノウイルスベクターを含有する単回ブースター用量であり得る。本明細書のある実施形態では、用量は好ましくは、少なくとも約１×１０^{6}粒子（例えば、約１×１０^{6}～１×１０^{12}粒子）、より好ましくは少なくとも約１×１０^{7}粒子、より好ましくは少なくとも約１×１０^{8}粒子（例えば、約１×１０^{8}～１×１０^{11}粒子または約１×１０^{8}～１×１０^{12}粒子）、および最も好ましくは少なくとも約１×１０^{0}粒子（例えば、約１×１０^{9}～１×１０^{10}粒子または約１×１０^{9}～１×１０^{12}粒子）、またはさらには少なくとも約１×１０^{10}粒子（例えば、約１×１０^{10}～１×１０^{12}粒子）のアデノウイルスベクターである。あるいは、用量は、約１×１０^{14}粒子以下、好ましくは約１×１０^{13}粒子以下、さらにより好ましくは約１×１０^{12}粒子以下、さらにより好ましくは約１×１０^{11}粒子以下、および最も好ましくは約１×１０^{10}粒子以下（例えば、約１×１０^{9}粒子（ａｒｔｉｃｌｅｓ）以下）を含む。従って、用量は、例えば、約１×１０^{6}粒子単位（ｐｕ）、約２×１０^{6}ｐｕ、約４×１０^{6}ｐｕ、約１×１０^{7}ｐｕ、約２×１０^{7}ｐｕ、約４×１０^{7}ｐｕ、約１×１０^{8}ｐｕ、約２×１０^{8}ｐｕ、約４×１０^{8}ｐｕ、約１×１０^{9}ｐｕ、約２×１０^{9}ｐｕ、約４×１０^{9}ｐｕ、約１×１０^{10}ｐｕ、約２×１０^{10}ｐｕ、約４×１０^{10}ｐｕ、約１×１０^{11}ｐｕ、約２×１０^{11}ｐｕ、約４×１０^{11}ｐｕ、約１×１０^{12}ｐｕ、約２×１０^{12}ｐｕ、または約４×１０^{12}ｐｕのアデノウイルスベクターを含む単回用量のアデノウイルスベクターを含有し得る。例えば、２０１３年６月４日に付与されたＮａｂｅｌ，ｅｔ．ａｌ．に対する米国特許第８，４５４，９７２　Ｂ２号明細書（参照によって本明細書に組み込まれる）のアデノウイルスベクター、およびその第２９欄第３６～５８行にある投薬量を参照のこと。本明細書のある実施形態では、アデノウイルスは複数回用量で送達される。

【０２５０】

本明細書のある実施形態では、送達はＡＡＶを介する。ヒトに対するＡＡＶのインビボ送達についての治療上有効な投薬量は、約１×１０^{10}～約１×１０^{10}の機能性ＡＡＶ／ｍｌ溶液を含有する生理食塩水約２０～約５０ｍｌの範囲であると考えられる。投薬量は、治療利益と、それに対する任意の副作用との均衡をとるように調整され得る。本明細書のある実施形態では、ＡＡＶ用量は、概して、約１×１０^{5}～１×１０^{50}ゲノムのＡＡＶ、約１×１０^{8}～１×１０^{20}ゲノムのＡＡＶ、約１×１０^{10}～約１×１０^{16}ゲノム、または約１×１０^{11}～約１×１０^{16}ゲノムのＡＡＶの濃度範囲である。ヒト投薬量は約１×１０^{13}ゲノムのＡＡＶであってもよい。かかる濃度は、約０．００１ｍｌ～約１００ｍｌ、約０．０５～約５０ｍｌ、または約１０～約２５ｍｌの担体溶液で送達され得る。他の効果的な投薬量が、当業者により、用量反応曲線を作成する常法の試験を介して容易に確立され得る。例えば、２０１３年３月２６日に付与されたＨａｊｊａｒ，ｅｔ　ａｌ．に対する米国特許第８，４０４，６５８　Ｂ２号明細書、第２７欄第４５～６０行を参照のこと。

【０２５１】

本明細書のある実施形態では、送達はプラスミドを介する。かかるプラスミド組成物では、投薬量は、反応を誘発するのに十分な量のプラスミドでなければならない。例えば、プラスミド組成物中のプラスミドＤＮＡの好適な分量は、約０．１～約２ｍｇ、または約１μｇ～約１０μｇであり得る。

【０２５２】

本明細書の用量は平均７０ｋｇの個体に基づく。投与頻度は医学または獣医学の実務者（例えば、医師、獣医師）、または当業の科学者の裁量の範囲内にある。実験に用いられるマウスは約２０ｇである。２０ｇのマウスに投与される当該の用量から、７０ｋｇの個体に対する用量を推定することができる。

【０２５３】

レンチウイルス

レンチウイルスは、有糸分裂細胞および分裂終了細胞の両方において感染してその遺伝子を発現する能力を有する複合レトロウイルスである。最も一般的に知られるレンチウイルスはヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）であり、これは他のウイルスのエンベロープ糖タンパク質を使用して広範囲の細胞型を標的にする。

【０２５４】

レンチウイルスは以下のとおり調製し得る。ｐＣａｓＥＳ１０（これはレンチウイルス移入プラスミド骨格を含む）のクローニング後、１０％ウシ胎仔血清含有および抗生物質不含のＤＭＥＭ中に形質移入前日に５０％コンフルエンスとなるようＴ－７５フラスコにおいて低継代（ｐ＝５）のＨＥＫ２９３ＦＴを播種した。２０時間後、培地をＯｐｔｉＭＥＭ（無血清）培地に交換し、４時間後に形質移入を行った。細胞に１０μｇのレンチウイルス移入プラスミド（ｐＣａｓＥＳ１０）、および以下のパッケージングプラスミド：５μｇのｐＭＤ２．Ｇ（ＶＳＶ－ｇ偽型）、および７．５ｕｇのｐｓＰＡＸ２（ｇａｇ／ｐｏｌ／ｒｅｖ／ｔａｔ）を形質移入した。カチオン性脂質デリバリー剤（５０ｕＬリポフェクタミン２０００および１００ｕｌ　Ｐｌｕｓ試薬）を含有する４ｍＬ　ＯｐｔｉＭＥＭ中で形質移入を行った。６時間後、１０％ウシ胎仔血清を含有する抗生物質不含ＤＭＥＭに培地を交換した。

【０２５５】

レンチウイルスは以下のとおり精製し得る。４８時間後にウイルス上清を回収した。初めに上清から残屑を取り除き、０．４５ｕｍ低タンパク質結合（ＰＶＤＦ）フィルターでろ過した。次にそれを超遠心機において２４，０００ｒｐｍで２時間スピンした。ウイルスペレットを５０ｕｌのＤＭＥＭ中に４℃で一晩再懸濁した。次にそれをアリコートに分け、直ちに－８０℃で凍結した。

【０２５６】

別の実施形態では、ウマ伝染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）をベースとする最小の非霊長類レンチウイルスベクターもまた、特に眼の遺伝子治療について企図される（例えば、Ｂａｌａｇａａｎ，Ｊ　Ｇｅｎｅ　Ｍｅｄ　２００６；８：２７５－２８５、Ｗｉｌｅｙ　ＩｎｔｅｒＳｃｉｅｎｃｅにおいて２００５年１１月２１日にオンラインで発表（ｗｗｗ．ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ．ｗｉｌｅｙ．ｃｏｍ）．ＤＯＩ：１０．１００２／ｊｇｍ．８４５を参照のこと）。別の実施形態では、ＲｅｔｉｎｏＳｔａｔ（登録商標）、滲出型の加齢性黄斑変性症の治療に対する網膜下注入によって送達される血管新生抑制タンパク質エンドスタチン（ｅｎｄｏｓｔａｉｎ）およびアンジオスタチンを発現するウマ伝染性貧血ウイルスベースのレンチウイルス遺伝子治療ベクターもまた企図され（例えば、Ｂｉｎｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，ＨＵＭＡＮ　ＧＥＮＥ　ＴＨＥＲＡＰＹ　２３：９８０－９９１（２０１２年9月）を参照のこと）、本発明のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系用に改良され得る。

【０２５７】

別の実施形態において、ＨＩＶ　ｔａｔ／ｒｅｖにより共有される共通のエクソンを標的にするｓｉＲＮＡと、核小体局在ＴＡＲデコイと、抗ＣＣＲ５特異的ハンマーヘッド型リボザイムとを有する自己不活性化レンチウイルスベクター（例えば、ＤｉＧｉｕｓｔｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０１０）Ｓｃｉ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ　２：３６ｒａ４３を参照）を本発明のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に使用しおよび／または適合させることができる。最低でも患者体重キログラム当たり２．５×１０^{6}個のＣＤ３４＋細胞を採取し、２×１０^{6}細胞／ｍｌの密度で２ｍＭＬ／Ｌ－グルタミン、幹細胞因子（１００ｎｇ／ｍｌ）、Ｆｌｔ－３リガンド（Ｆｌｔ－３Ｌ）（１００ｎｇ／ｍｌ）、およびトロンボポエチン（１

０ｎｇ／ｍｌ）（ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ）を含有するＸ－ＶＩＶＯ　１５培地（Ｌｏｎｚａ）中において１６～２０時間予備的に刺激することができる。予備刺激した細胞は、フィブロネクチン（２５ｍｇ／ｃｍ^2）（ＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎ、タカラバイオ株式会社）でコーティングした７５ｃｍ^{2}組織培養フラスコにおいてレンチウイルスを感染多重度５で１６～２４時間形質導入し得る。

【０２５８】

レンチウイルスベクターはパーキンソン病の治療などで開示されており、例えば、米国特許出願公開第２０１２０２９５９６０号明細書および米国特許第７３０３９１０号明細書および同第７３５１５８５号明細書を参照のこと。レンチウイルスベクターはまた、眼疾患の治療についても開示されており、例えば、米国特許出願公開第２００６０２８１１８０号明細書、同第２００９０００７２８４号明細書、同第２０１１０１１７１８９号明細書；同第２００９００１７５４３号明細書；同第２００７００５４９６１号明細書、同第２０１００３１７１０９号明細書を参照のこと。レンチウイルスベクターはまた、脳への送達についても開示されており、例えば、米国特許出願公開第２０１１０２９３５７１号明細書；同第２０１１０２９３５７１号明細書、同第２００４００１３６４８号明細書、同第２００７００２５９７０号明細書、同第２００９０１１１１０６号明細書および米国特許第７２５９０１５号明細書を参照のこと。

【０２５９】

ＲＮＡ送達

ＲＮＡ送達：ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えばＣａｓ９、および／または本ＲＮＡのいずれか、例えばガイドＲＮＡはまた、ＲＮＡの形態でも送達することができる。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡはインビトロ転写を用いて作成することができる。例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、βグロビン－ポリＡテール（１２０個以上の一連のアデニン）から以下のエレメント：Ｔ７＿プロモーター－コザック配列（ＧＣＣＡＣＣ）－Ｃａｓ９－３’ＵＴＲを含むＰＣＲカセットを使用して合成することができる。このカセットは、Ｔ７ポリメラーゼによる転写に使用することができる。ガイドＲＮＡもまた、Ｔ７＿プロモーター－ＧＧ－ガイドＲＮＡ配列を含むカセットからのインビトロ転写を用いて転写させることができる。

【０２６０】

発現を増強しかつ毒性を低下させるため、ＣＲＩＳＰＲ酵素および／またはガイドＲＮＡを、プソイドＵまたは５－メチル－Ｃを使用して改変することができる。

【０２６１】

ｍＲＮＡ送達方法は、現在、肝臓送達に特に有望である。詳細には、ＡＡＶ８について、肝臓への送達に特に好ましい。

【０２６２】

ナノ粒子

ＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡは、ナノ粒子または脂質エンベロープを使用して同時に送達されてもよい。

【０２６３】

例えば、Ｓｕ　Ｘ，Ｆｒｉｃｋｅ　Ｊ，Ｋａｖａｎａｇｈ　ＤＧ，Ｉｒｖｉｎｅ　ＤＪ（「脂質エンベロープを有するｐＨ応答性ポリマーナノ粒子を使用したインビトロおよびインビボｍＲＮＡ送達（Ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ａｎｄ　ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｍＲＮＡ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｕｓｉｎｇ　ｌｉｐｉｄ－ｅｎｖｅｌｏｐｅｄ　ｐＨ－ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ　ｐｏｌｙｍｅｒ　ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ）」Ｍｏｌ　Ｐｈａｒｍ．２０１１　Ｊｕｎ　６；８（３）：７７４－８７．ｄｏｉ：１０．１０２１／ｍｐ１００３９０ｗ．電子出版２０１１年４月１日）は、ポリ（β－アミノエステル）（ＰＢＡＥ）コアがリン脂質二重層シェルに包まれている被覆されている生分解性のコアーシェル構造を有するナノ粒子について記載する。これらはインビボｍＲＮＡ送達のために開発された。ｐＨ応答性ＰＢＡＥ成分がエンドソーム破壊を促進するように選択された一方、脂質表面層はポリカチオンコアの毒性を最小限に抑えるように選択された。従って、これは本発明のＲＮＡを送達に好ましい。

【０２６４】
一実施形態では、自己集合性生体接着ポリマーをベースとするナノ粒子が企図され、これは、いずれも脳への、ペプチドの経口送達、ペプチドの静脈内送達およびペプチドの経鼻送達に適用され得る。他の実施形態、例えば疎水性薬物の経口吸収および経眼送達もまた企図される。分子エンベロープ技術は、保護されかつ疾患部位に送達されるエンジニアリングされたポリマーエンベロープを含む（例えば、Ｍａｚｚａ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．ＡＣＳＮａｎｏ，２０１３．７（２）：１０１６－１０２６；Ｓｉｅｗ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ，２０１２．９（１）：１４－２８；Ｌａｌａｔｓａ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ，２０１２．１６１（２）：５２３－３６；Ｌａｌａｔｓａ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ，２０１２．９（６）：１６６５－８０；Ｌａｌａｔｓａ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ，２０１２．９（６）：１７６４－７４；Ｇａｒｒｅｔｔ，Ｎ．Ｌ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｂｉｏｐｈｏｔｏｎｉｃｓ，２０１２．５（５－６）：４５８－６８；Ｇａｒｒｅｔｔ，Ｎ．Ｌ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｒａｍａｎ Ｓｐｅｃｔ，２０１２．４３（５）：６８１－６８８；Ａｈｍａｄ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｒｏｙａｌ Ｓｏｃ Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ ２０１０．７：Ｓ４２３－３３；Ｕｃｈｅｇｂｕ，Ｉ．Ｆ．Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ，２００６．３（５）：６２９－４０；Ｑｕ，Ｘ．，ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，２００６．７（１２）：３４５２－９ およびＵｃｈｅｇｂｕ，Ｉ．Ｆ．，ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔ Ｊ Ｐｈａｒｍ，２００１．２２４：１８５－１９９を参照のこと）。標的組織に応じて、単回または複数回用量で約５ｍｇ／ｋｇの用量が企図される。

【０２６５】
一実施形態において、ＭＩＴのＤａｎ Ａｎｄｅｒｓｏｎ研究室により開発された、ＲＮＡを癌細胞に送達して腫瘍成長を止めることができるナノ粒子を、本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に使用しおよび／または適合させることができる。詳細には、Ａｎｄｅｒｓｏｎ研究室は、新規生体材料およびナノ製剤の合成、精製、特徴付け、ならびに配合のための完全に自動化されたコンビナトリアルシステムを開発した。例えば、Ａｌａｂｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１３ Ａｕｇ ６；１１０（３２）：１２８８１－６；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ Ｍａｔｅｒ．２０１３ Ｓｅｐ ６；２５（３３）：４６４１－５；Ｊｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｎｏ Ｌｅｔｔ．２０１３ Ｍａｒ １３；１３（３）：１０５９－６４；Ｋａｒａｇｉａｎｎｉｓ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｎａｎｏ．２０１２ Ｏｃｔ ２３；６（１０）：８４８４－７；Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｎａｎｏ．２０１２ Ａｕｇ ２８；６（８）：６９２２－９およびＬｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１２ Ｊｕｎ ３；７（６）：３８９－９３を参照のこと。

【０２６６】
米国特許出願公開第２０１１０２９３７０３号明細書は、ポリヌクレオチドの投与に特に有用なリピドイド化合物に関し、これは本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系の送達に適用することができる。一態様において、アミノアルコールリピドイド化合物が、細胞または対象に送達される薬剤と組み合わされて、マイクロパーティクル、ナノ粒子、リポソーム、またはミセルを形成する。粒子、リポソーム、またはミセルによって送達される薬剤は、気体、液体、または固体の形態であってもよく、および薬剤はポリヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、または小分子であってもよい。アミノアルコール（ｍｉｎｏａｌｃｏｈｏｌ）リピドイド化合物を他のアミノアルコールリピドイド化合物、ポリマー（合成または天然）、界面活性剤、コレステロール、炭水化物、タンパク質、脂質等と組み合わせて粒子を形成してもよい。これらの粒子は、次に場合により医薬賦形剤と組み合わされて医薬組成物を形成し得る。

【０２６７】
米国特許出願公開第０１１０２９３７０３号明細書はまた、アミノアルコールリピドイド化合物の調製方法も提供する。アミンの１つ以上の等価物を好適な条件下でエポキシド末端化合物の１つ以上の等価物と反応させることにより、本発明のアミノアルコールリピ

ドイド化合物が形成される。特定の実施形態では、アミンの全てのアミノ基がエポキシド末端化合物と完全に反応して第三級アミンを形成する。他の実施形態では、アミンの全てのアミノ基がエポキシド末端化合物と完全には反応せずに第三級アミンを形成し、従ってアミノアルコールリピドイド化合物に第一級または第二級アミンが生じる。これらの第一級または第二級アミンはそのまま残るか、または異なるエポキシド末端化合物などの別の求電子剤と反応し得る。当業者によって理解されるであろうとおり、アミンが過剰量未満のエポキシド末端化合物と反応することにより、種々の数のテイルを有する複数の異なるアミノアルコールリピドイド化合物がもたらされ得る。特定のアミンは２つのエポキシド由来化合物テイルで完全に官能化され得る一方、他の分子はエポキシド由来化合物テイルで完全には官能化されない。例えば、ジアミンまたはポリアミンは分子の種々のアミノ部分の１、２、３、または４個のエポキシド由来化合物テイルを含み、第一級、第二級、および第三級アミンをもたらし得る。特定の実施形態では、全てのアミノ基が完全に官能化されるわけではない。特定の実施形態では、同じ種類のエポキシド末端化合物の２つが使用される。他の実施形態では、２つ以上の異なるエポキシド末端化合物が使用される。アミノアルコールリピドイド化合物の合成は溶媒を伴いまたは伴わずに実施され、および合成は３０～１００℃の範囲の高温、好ましくは約５０～９０℃で実施されてもよい。調製されたアミノアルコールリピドイド化合物は場合により精製されてもよい。例えば、アミノアルコールリピドイド化合物の混合物を精製して特定の数のエポキシド由来化合物テイルを有するアミノアルコールリピドイド化合物を生じさせてもよい。または混合物を精製して特定の立体異性体または位置異性体を生じさせてもよい。アミノアルコールリピドイド化合物はまた、アルキルハロゲン化物（例えばヨウ化メチル）または他のアルキル化剤を使用してアルキル化されてもよく、および／またはアシル化されてもよい。

【０２６８】

米国特許出願公開第０１１０２９３７０３号明細書はまた、本発明の方法によって調製されるアミノアルコールリピドイド化合物のライブラリも提供する。これらのアミノアルコールリピドイド化合物は、液体ハンドラー、ロボット、マイクロタイタープレート、コンピュータ等が関わるハイスループット技術を用いて調製および／またはスクリーニングされ得る。特定の実施形態では、アミノアルコールリピドイド化合物は、ポリヌクレオチドまたは他の作用物質（例えば、タンパク質、ペプチド、小分子）を細胞に形質移入するその能力に関してスクリーニングされる。

【０２６９】

米国特許出願公開第２０１３０３０２４０１号明細書は、コンビナトリアル重合を用いて調製されているポリ（β－アミノアルコール）（ＰＢＡＡ）のクラスに関する。本発明のＰＢＡＡは生命工学的および生物医学的応用において、コーティング（医療器具またはインプラント用の薄膜または多層膜のコーティングなど）、添加剤、材料、賦形剤、非生物付着剤、マイクロパターニング剤、および細胞封入剤として使用され得る。表面コーティングとして使用される場合、これらのＰＢＡＡはインビトロおよびインビボの両方でその化学構造に応じた種々のレベルの炎症を誘発した。この材料クラスの大きい化学的多様性により、インビトロでマクロファージ活性化を阻害するポリマーコーティングを同定することが可能となった。さらに、これらのコーティングは、カルボキシル化ポリスチレンマイクロパーティクルの皮下植え込み後の炎症細胞の動員を低減し、および線維症を低減する。これらのポリマーを使用して細胞封入用の高分子電解質複合カプセルを形成し得る。この発明はまた、抗菌コーティング、ＤＮＡまたはｓｉＲＮＡ送達、および幹細胞組織工学などの他の多くの生物学的応用性も有し得る。米国特許出願公開第２０１３０３０２４０１号明細書の教示は、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適用し得る。

【０２７０】

別の実施形態において、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）が企図される。詳細には、脂質ナノ粒子に封入された抗トランスサイレチン低分子干渉ＲＮＡ（例えば、Ｃｏｅｌｈｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ　２０１３；３６９：８１９－２９を参照のこと）を本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適用し得る。静脈内投与される約０．０１～約１ｍｇ

／ｋｇ体重の用量が企図される。注射関連反応のリスクを低減するための与薬が企図され、デキサメタゾン、アセトアミノフェン（ａｃｅｔａｍｐｉｎｏｐｈｅｎ）、ジフェンヒドラミンまたはセチリジン、およびラニチジンなどが企図される。５用量について４週間おきにキログラム当たり約０．３ｍｇの複数回用量もまた企図される。

【０２７１】

ＬＮＰは、肝臓へのｓｉＲＮＡの送達に極めて有効であることが示されており（例えば、Ｔａｂｅｒｎｅｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，Ａｐｒｉｌ ２０１３，Ｖｏｌ．３，Ｎｏ．４，３６３－４７０頁を参照のこと）、従って肝臓へのＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの送達が企図される。２週間おきの６ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ（またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のＲＮＡ）の約４用量の投薬量が企図され得る。Ｔａｂｅｒｎｅｒｏ ｅｔ ａｌ．は、０．７ｍｇ／ｋｇで投与されるＬＮＰの最初の２サイクル後に腫瘍退縮が観察され、６サイクルが終わるまでに患者が部分奏効を達成して、リンパ節転移が完全に退縮しかつ肝腫瘍が実質的に縮小したことを実証した。この患者では４０用量後に完全奏効が得られ、患者は２６ヶ月間にわたる用量の投与を受けた後にも寛解を保っており、治療を完了させた。ＲＣＣ患者ならびにＶＥＧＦ経路阻害薬による以前の治療後に進行している腎臓、肺、およびリンパ節を含む肝外疾患部位を有する患者の２人は、全ての部位で約８～１２ヶ月間安定であり、ＰＮＥＴおよび肝転移を有する患者は１８ヶ月間（３６用量）の延長試験を継続し、安定であった。

【０２７２】

しかしながら、ＬＮＰの電荷を考慮しなければならない。カチオン性脂質は負電荷脂質と組み合わせると非二重層構造を誘導し、それにより細胞内送達が促進されるためである。荷電したＬＮＰは静脈注射後急速に循環から取り除かれるため、ｐＫａ値が７未満のイオン化可能なカチオン性脂質が開発された（例えば、Ｒｏｓｉｎ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，１２８６－２２００頁，Ｄｅｃ．２０１１を参照のこと）。ｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチドなどの負電荷ポリマーは低いｐＨ値（例えばｐＨ４）でＬＮＰに負荷することができ、ここではイオン化可能な脂質が正電荷を示す。しかしながら、生理学的ｐＨ値では、ＬＮＰは、より長い循環時間と適合する低い表面電荷を呈する。４種のイオン化可能なカチオン性脂質、すなわち１，２－ジリネオイル（ｄｉｌｉｎｅｏｙｌ）－３－ジメチルアンモニウムプロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－ケト－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＫＤＭＡ）、および１，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）に注目が集まっている。これらの脂質を含有するＬＮＰ ｓｉＲＮＡ系は、インビボで肝細胞において顕著に異なる遺伝子サイレンシング特性を呈し、第ＶＩＩ因子遺伝子サイレンシングモデルを用いて順にＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ＞ＤＬｉｎＫＤＭＡ＞ＤＬｉｎＤＭＡ＞＞ＤＬｉｎＤＡＰに従い効力が異なることが示されている（例えば、Ｒｏｓｉｎ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，１２８６－２２００頁，Ｄｅｃ．２０１１を参照のこと）。特にＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡを含有する製剤について、１μｇ／ｍｌレベルの投薬量が企図され得る。

【０２７３】

Ｒｏｓｉｎ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，１２８６－２２００頁，Ｄｅｃ．２０１１）によるＬＮＰの調製およびＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ封入を使用しおよび／または適合させることができる。カチオン性脂質１，２－ジリネオイル（ｄｉｌｉｎｅｏｙｌ）－３－ジメチルアンモニウムプロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシケト－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＫ－ＤＭＡ）、１，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）、（３－ｏ－［２’’－（メトキシポリエチレングリコール２０００）サクシノイル］－１，２－ジミリストイル－ｓｎ

－グリコール（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）、およびＲ－３－［（ω－メトキシ－ポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリスチルオクスルプロピル（ｄｉｍｙｒｉｓｔｙｌｏｘｌｐｒｏｐｙｌ）－３－アミン（ＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ）がＴｅｋｍｉｒａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ、カナダ）によって提供されてもよく、または合成されてもよい。コレステロールはＳｉｇｍａ（Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）から購入することができる。特定のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ　ＲＮＡが、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎＫ－ＤＭＡ、およびＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ（４０：１０：４０：１０モル比のカチオン性脂質：ＤＳＰＣ：ＣＨＯＬ：ＰＥＧＳ－ＤＭＧまたはＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ）を含有するＬＮＰに封入されてもよい。必要な場合、細胞取込み、細胞内送達、および体内分布を評価するため０．２％ＳＰ－ＤｉＯＣ１８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｂｕｒｌｉｎｇｔｏｎ、カナダ）を含めてもよい。封入は、カチオン性脂質：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ（４０：１０：４０：１０モル比）で構成される脂質混合物を最終脂質濃度が１０ｍｍｏｌ／ｌとなるようにエタノール中に溶解することにより実施され得る。脂質のこのエタノール溶液を、３０％エタノールｖｏｌ／ｖｏｌの最終濃度が生じるように５０ｍｍｏｌ／ｌクエン酸塩、ｐＨ４．０に滴下しながら添加して多重膜小胞を形成し得る。エクストルーダー（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　Ｌｉｐｉｄｓ、Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ、カナダ）を使用して２つの積み重ねた８０ｎｍ　Ｎｕｃｌｅｐｏｒｅポリカーボネートフィルターに通して多重膜小胞を押し出した後、大きい単層小胞が形成され得る。封入は、３０％エタノールｖｏｌ／ｖｏｌを含有する５０ｍｍｏｌ／ｌクエン酸塩、ｐＨ４．０中に２ｍｇ／ｍｌで溶解したＲＮＡを、押し出した予成形された大きい単層小胞に滴下しながら添加し、かつ最終ＲＮＡ／脂質重量比が０．０６／１ｗｔ／ｗｔとなるまで常に混合しながら３１℃で３０分間インキュベートすることにより達成され得る。エタノールの除去および製剤緩衝液の中和は、Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ　２再生セルロース透析膜を使用してリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、ｐＨ７．４に対して１６時間透析することにより実施された。ＮＩＣＯＭＰ　３７０粒度測定器、小胞／強度モード、およびガウスフィッティング（Ｎｉｃｏｍｐ　Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｓｉｚｉｎｇ，Ｓａｎｔａ　Ｂａｒｂａｒａ，ＣＡ）を使用した動的光散乱によりナノ粒度分布を決定し得る。３つ全てのＬＮＰ系の粒度は直径約７０ｎｍであり得る。透析前および透析後に収集した試料からＶｉｖａＰｕｒｅＤ　ＭｉｎｉＨカラム（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｓｔｅｄｉｍ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して遊離ｓｉＲＮＡを除去することにより、ｓｉＲＮＡ封入効率を決定し得る。封入されたＲＮＡを溶出ナノ粒子から抽出し、２６０ｎｍで定量化し得る。ｓｉＲＮＡと脂質との比は、Ｗａｋｏ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　ＵＳＡ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ、ＶＡ）のＣｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ　Ｅ酵素アッセイを使用して小胞中のコレステロール含量を計測することにより決定された。ＰＥＧ化リポソーム（またはＬＮＰ）もまた送達に使用することができる。

【０２７４】

Ｒｏｓｉｎ　ｅｔ　ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，１２８６－２２００頁，Ｄｅｃ．２０１１による大きいＬＮＰの調製を使用しおよび／または適合させることができる。ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、およびコレステロールを５０：１０：３８．５モル比で含有するエタノール中に、脂質プレミックス溶液（２０．４ｍｇ／ｍｌ総脂質濃度）を調製し得る。その脂質プレミックスに酢酸ナトリウムを０．７５：１（酢酸ナトリウム：ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）のモル比で添加し得る。続いて混合物を１．８５容積のクエン酸緩衝液（１０ｍｍｏｌ／ｌ、ｐＨ３．０）と激しく撹拌しながら合わせることにより脂質を水和させると、３５％エタノールを含有する水性緩衝液中で自発的なリポソーム形成が生じ得る。このリポソーム溶液を３７℃でインキュベートして粒度を時間依存的に増加させ得る。インキュベーション中種々の時点でアリコートを取り出し、動的光散乱（Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ、Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ、英国）によってリポソーム粒度の変化を調べ得る。所望の粒度に達したら、総脂質の３．５％の最終ＰＥＧモル濃度が得られるようにリポソーム混合物にＰＥＧ脂質水溶液（ストック＝３５％（ｖｏｌ

／ｖｏｌ）エタノール中１０ｍｇ／ｍｌ　ＰＥＧ－ＤＭＧ）を添加し得る。ＰＥＧ－脂質の添加時、リポソームはその粒度であるはず、さらなる成長は有効に抑えられる。次に空のリポソームにＲＮＡを約１：１０（ｗｔ：ｗｔ）のｓｉＲＮＡ対総脂質比で添加し、続いて３７℃で３０分間インキュベートすると、ロードされたＬＮＰが形成され得る。続いてこの混合物をＰＢＳ中で一晩透析し、０．４５μｍシリンジフィルターでろ過し得る。

【０２７５】

球状核酸（Ｓｐｈｅｒｉｃａｌ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ：ＳＮＡ（商標））構築物および他のナノ粒子（特に金ナノ粒子）もまた、意図する標的にＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を送達する手段として企図される。多量のデータにより、核酸で機能化された金ナノ粒子をベースとするＡｕｒａＳｅｎｓｅ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓの球状核酸（ＳＮＡ（商標））構築物が、以下のような複数の成功の鍵に基づき代替的なプラットフォームより優れていることが示されている：

高い生体内安定性。その高密度のローディングにより、大部分のカーゴ（ＤＮＡまたはｓｉＲＮＡ）は細胞内部で構築物に結合したまま留まり、核酸安定性および酵素分解に対する抵抗性が付与される。

【０２７６】

送達性。研究された全ての細胞型について（例えば、ニューロン、腫瘍細胞系等）、この構築物は担体または形質移入剤の必要なしに９９％の形質移入効率を実証している。

【０２７７】

治療的ターゲティング。構築物のユニークな標的結合親和性および特異性により、一致する標的配列への精巧な特異性が実現される（すなわち、限られたオフターゲット効果）。

【０２７８】

優れた有効性。この構築物は、先行する従来の形質移入試薬（リポフェクタミン２０００およびシトフェクチン）より性能が著しく優れている。

【０２７９】

低毒性。この構築物は、明らかな毒性なしに種々の培養細胞、初代細胞、および組織に侵入することができる。

【０２８０】

顕著な免疫応答がない。全ゲノムマイクロアレイ試験およびサイトカイン特異的タンパク質アッセイによって計測したとき、この構築物が誘発する全般的な遺伝子発現の変化は最小限である。

【０２８１】

化学的調整可能性。いかなる単一の薬剤または組み合わせによる薬剤（例えば、タンパク質、ペプチド、小分子）を使用しても、構築物の表面を合うように調整することができる。

【０２８２】

核酸ベースの治療薬向けのこのプラットフォームは、炎症および感染症、癌、皮膚障害および心血管疾患を含めた多数の病状に適用可能であり得る。

【０２８３】

引用可能文献としては、以下が挙げられる：Ｃｕｔｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，．Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１１　１３３：９２５４－９２５７、Ｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｍａｌｌ．２０１１　７：３１５８－３１６２、Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＡＣＳ　Ｎａｎｏ．２０１１　５：６９６２－６９７０、Ｃｕｔｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１２　１３４：１３７６－１３９１、Ｙｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，．Ｎａｎｏ　Ｌｅｔｔ．２０１２　１２：３８６７－７１、Ｚｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０１２　１０９：１１９７５－８０、Ｍｉｒｋｉｎ，Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ　２０１２　７：６３５－６３８、Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１２　１３４：１６４８８－１６９１、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｎａｔｕｒｅ　２０１３　４９５：Ｓ１４－Ｓ１６、Ｃ

ｈｏｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０１３ １１０（１９）：７６２５－７６３０、Ｊｅｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．５，２０９ｒａ１５２（２０１３）およびＭｉｒｋｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｍａｌｌ，ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１００２／ｓｍｌｌ．２０１３０２１４３。

【０２８４】

ｓｉＲＮＡを含む自己集合性ナノ粒子は、例えば腫瘍血管新生発現インテグリンを標的化する手段としてポリエチレングリコール（ＰＥＧ）の遠位端にＡｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ（ＲＧＤ）ペプチドリガンドが結合したＰＥＧ化されているポリエチレンイミン（ＰＥＩ）と共に構成され、血管内皮増殖因子受容体２（ＶＥＧＦ Ｒ２）の発現、従って腫瘍血管新生を阻害するｓｉＲＮＡの送達に用いられ得る（例えば、Ｓｃｈｉｆｆｅｌｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００４，Ｖｏｌ．３２，Ｎｏ．１９を参照のこと）。２～６の範囲にわたるリン酸（核酸）に対する正味モル過剰のイオン化可能窒素（ポリマー）を与えるようにカチオン性ポリマーと核酸との等容積の水溶液を混合することにより、ナノプレックスを調製し得る。カチオン性ポリマーと核酸との間の静電相互作用により、約１００ｎｍの平均粒度分布を有するポリプレックスの形成がもたらされ、ひいてはここではナノプレックスと称される。Ｓｃｈｉｆｆｅｌｅｒｓ ｅｔ ａｌの自己集合性ナノ粒子での送達には、約１００～２００ｍｇのＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの投薬量が想定される。

【０２８５】

Ｂａｒｔｌｅｔｔ ｅｔ ａｌ．（ＰＮＡＳ，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ ２５，２００７，ｖｏｌ．１０４，ｎｏ．３９）のナノプレックスもまた本発明に適用することができる。Ｂａｒｔｌｅｔｔ ｅｔ ａｌ．のナノプレックスは、２～６の範囲にわたるリン酸（核酸）に対する正味モル過剰のイオン化可能な窒素（ポリマー）を与えるようにカチオン性ポリマーと核酸との等容積の水溶液を混合することにより調製される。カチオン性ポリマーと核酸との間の静電相互作用により、約１００ｎｍの平均粒度分布を有するポリプレックスの形成がもたらされ、ひいてはここではナノプレックスと称される。Ｂａｒｔｌｅｔｔ ｅｔ ａｌ．のＤＯＴＡ－ｓｉＲＮＡは以下のとおり合成された：１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸モノ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）（ＤＯＴＡ－ＮＨＳエステル）がＭａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓ（Ｄａｌｌａｓ、ＴＸ）から注文された。アミン改変ＲＮＡセンス鎖が、炭酸緩衝液（ｐＨ９）中の１００倍モル過剰のＤＯＴＡ－ＮＨＳ－エステルと共に微量遠心管に加えられた。室温で４時間撹拌することにより内容物を反応させた。ＤＯＴＡ－ＲＮＡセンスコンジュゲートをエタノール沈殿させ、水中に再懸濁し、非改変アンチセンス鎖とアニールさせてＤＯＴＡ－ｓｉＲＮＡが得られた。液体は全てＣｈｅｌｅｘ－１００（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）で前処理され、微量金属汚染が除去された。シクロデキストリン含有ポリカチオンを使用することによりＴｆ標的化および非標的化ｓｉＲＮＡナノ粒子を形成し得る。典型的には、ナノ粒子は水中に３（±）の電荷比および０．５ｇ／リットルのｓｉＲＮＡ濃度で形成された。標的化ナノ粒子の表面上にあるアダマンタン－ＰＥＧ分子の１パーセントがＴｆで改変された（アダマンタン－ＰＥＧ－Ｔｆ）。ナノ粒子は注入用に５％（ｗｔ／ｖｏｌ）グルコース担体溶液中に懸濁された。

【０２８６】

Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ，Ｖｏｌ ４６４，１５ Ａｐｒｉｌ ２０１０）は、標的化ナノ粒子送達系を使用するｓｉＲＮＡ臨床試験を行った（臨床試験登録番号ＮＣＴ００６８９０６５）。標準治療の治療法に不応性の固形癌患者が２１日サイクルの１、３、８および１０日目に３０分間の静脈内注入によって標的化ナノ粒子の用量の投与を受ける。ナノ粒子は、以下を含有する合成送達系からなる：（１）線状シクロデキストリン系ポリマー（ＣＤＰ）、（２）癌細胞の表面上のＴＦ受容体（ＴＦＲ）と会合するようにナノ粒子の外側に提示されるヒトトランスフェリンタンパク質（ＴＦ）標的リガンド、（３）親水性ポリマー（生体液中でのナノ粒子の安定性を促進するために使用されるポリエチレングリコール（ＰＥＧ））、および（４）ＲＲＭ２（臨床で使用される配列

は旧称ｓｉＲ２Ｂ＋５であった）の発現を低下させるようにに設計されたｓｉＲＮＡ。ＴＦＲは長い間悪性細胞で上方制御されることが知られており、ＲＲＭ２は確立された抗癌標的である。これらのナノ粒子（臨床バージョンは名称ＣＡＬＡＡ－０１）は、非ヒト霊長類における反復投与試験において良好な忍容性があることが示されている。リポソーム送達によりｓｉＲＮＡを投与されたのは一人の慢性骨髄性白血病患者であるが、Ｄａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．の臨床試験は、標的化送達系でｓｉＲＮＡを全身的に送達して固形癌患者を治療する最初の人体試験である。この標的化送達系がヒト腫瘍に機能性ｓｉＲＮＡの有効な送達を提供できるかどうかを確かめるため、Ｄａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．は、３つの異なる投与コホートの３人の患者；患者Ａ、ＢおよびＣの生検を調べた（全患者が転移性黒色腫を有し、それぞれ１８、２４および３０ｍｇ　ｍ$^{-2}$　ｓｉＲＮＡのＣＡＬＡＡ－０１用量を受けていた）。本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系にも同様の用量を企図し得る。本発明の送達は、線状シクロデキストリン系ポリマー（ＣＤＰ）、癌細胞の表面上でＴＦ受容体（ＴＦＲ）と会合するようにナノ粒子の外側に提示されるヒトトランスフェリンタンパク質（ＴＦ）標的リガンドおよび／または親水性ポリマー（例えば、生体液中でのナノ粒子の安定性を促進するために使用されるポリエチレングリコール（ＰＥＧ））を含有するナノ粒子によって実現し得る。

【０２８７】

エキソソーム

エキソソームは、ＲＮＡおよびタンパク質を輸送する内因性ナノ小胞であり、マウスにおいて低分子干渉（ｓｉ）ＲＮＡを脳に送達することができる。免疫原性を低下させるため、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２９：３４１）はエキソソーム産生に自己由来の樹状細胞を使用した。ターゲティングは、ニューロン特異的ＲＶＧペプチドに融合したＬａｍｐ２ｂ（エキソソーム膜タンパク質）を発現するように樹状細胞をエンジニアリングすることにより実現された。エレクトロポレーションによって精製エキソソームに外来性ｓｉＲＮＡを負荷した。静脈内注入したＲＶＧ標的化エキソソームはＧＡＰＤＨ　ｓｉＲＮＡを脳内のニューロン、ミクログリア、オリゴデンドロサイトに特異的に送達し、特異的遺伝子ノックダウンをもたらした。ＲＶＧエキソソームに対する前曝露はノックダウンを減弱せず、他の組織における非特異的な取り込みは観察されなかった。エキソソーム媒介性ｓｉＲＮＡ送達の治療可能性は、アルツハイマー病の治療標的であるＢＡＣＥ１の強力なｍＲＮＡ（６０％）およびタンパク質（６２％）ノックダウンによって実証された。

【０２８８】

免疫学的に不活性なエキソソームのプールを得るため、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．は同種の主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）ハプロタイプを有する近交系Ｃ５７ＢＬ／６マウスから骨髄を採取した。未成熟樹状細胞は、ＭＨＣ－ＩＩおよびＣＤ８６などのＴ細胞活性化因子を欠くエキソソームを多量に産生するため、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．は７日間にわたり顆粒球／マクロファージ－コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）で樹状細胞を選択した。翌日、十分に確立された超遠心プロトコルを用いて培養上清からエキソソームを精製した。産生されたエキソソームは物理的に均質であり、ナノ粒子トラッキング解析（ＮＴＡ）および電子顕微鏡法によって決定するときサイズ分布のピークが直径８０ｎｍであった。Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．は、10^{6}細胞当たり６～１２μｇのエキソソーム（タンパク質濃度に基づき計測）を得た。

【０２８９】

次に、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．は、ナノスケール適用に適合させたエレクトロポレーションプロトコルを用いて改変エキソソームに外来性カーゴを負荷する可能性を調べた。ナノメートルスケールでの膜粒子のエレクトロポレーションは十分に特徴付けられていないことに伴い、エレクトロポレーションプロトコルの実験最適化のため非特異的Ｃｙ５標識ｓｉＲＮＡが使用された。エキソソームの超遠心および溶解後、封入されたｓｉＲＮＡの量がアッセイされた。４００Ｖおよび１２５μＦでのエレクトロポ

レーションがｓｉＲＮＡの最も大きい保持率をもたらし、これが後続の全ての実験に使用された。

【０２９０】

Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．は、１５０μｇのＲＶＧエキソソームに封入された各ＢＡＣＥ１ ｓｉＲＮＡ１５０μｇを正常Ｃ５７ＢＬ／６マウスに投与し、４つの対照：未治療マウス、ＲＶＧエキソソームのみを注入したマウス、インビボカチオン性リポソーム試薬と複合体形成したＢＡＣＥ１ ｓｉＲＮＡを注入したマウス、およびｓｉＲＮＡに静電的に結合する９個のＤ－アルギニンとコンジュゲートしたＲＶＧペプチドであるＲＶＧ－９Ｒと複合体形成したＢＡＣＥ１ ｓｉＲＮＡを注入したマウスとノックダウン効率を比較した。投与３日後に皮質組織試料を分析し、ｓｉＲＮＡ－ＲＶＧ－９Ｒ治療マウスおよびｓｉＲＮＡＲＶＧエキソソーム治療マウスの両方で、ＢＡＣＥ１ ｍＲＮＡレベルの有意な低下（それぞれ６６％±１５％、Ｐ＜０．００１および６１％±１３％、Ｐ＜０．０１）によってもたらされた有意なタンパク質ノックダウン（４５％、Ｐ＜０．０５、対して６２％、Ｐ＜０．０１）が観察された。さらに、出願人らは、ＲＶＧ－エキソソーム治療動物において、アルツハイマー病理におけるアミロイド斑の主成分である全β－アミロイド１－４２レベルの有意な低下（５５％、Ｐ＜０．０５）を実証した。観察された低下は、正常マウスでＢＡＣＥ１阻害薬の脳室内注射後に実証されたβ－アミロイド１－４０の低下より大きかった。Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．は、ＢＡＣＥ１開裂産物に対する５’－ｃＤＮＡ末端迅速増幅（ＲＡＣＥ）を実施し、これがｓｉＲＮＡによるＲＮＡｉ媒介性ノックダウンのエビデンスを提供した。

【０２９１】

最後に、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．は、ＩＬ－６、ＩＰ－１０、ＴＮＦαおよびＩＦＮ－α血清濃度を評価することにより、ｓｉＲＮＡ－ＲＶＧエキソソームがインビボで免疫応答を誘導したかどうかを調べた。ｓｉＲＮＡ－ＲＶＧエキソソーム処置後、ＩＬ－６分泌を強力に刺激したｓｉＲＮＡ－ＲＶＧ－９Ｒとは対照的に、ｓｉＲＮＡ－形質移入試薬治療と同様、全てのサイトカインで有意な変化は示されなかったことから、エキソソーム治療の免疫学的に不活性なプロファイルが確認された。エキソソームが僅か２０％のｓｉＲＮＡしか封入しないことを所与とすれば、ＲＶＧ－エキソソームによる送達は、同等のｍＲＮＡノックダウンおよびより高いタンパク質ノックダウンが対応する免疫刺激レベルなしに５分の１のｓｉＲＮＡで達成されたことから、ＲＶＧ－９Ｒ送達と比べて効率が高いものと見られる。この実験は、ＲＶＧ－エキソソーム技術の治療可能性を実証したもので、潜在的に神経変性疾患に関連する遺伝子の長期サイレンシングに適している。Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．のエキソソーム送達系は、治療標的、特に神経変性疾患に対する本発明のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の送達に適用することができる。約１００～１０００ｍｇのＲＶＧエキソソームに封入された約１００～１０００ｍｇのＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの投薬量が本発明について企図され得る。

【０２９２】

Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ７，２１１２－２１２６（２０１２））は、培養細胞に由来するエキソソームをどのようにインビトロおよびインビボでのｓｉＲＮＡ送達に利用することができるかを開示している。このプロトコルは、初めに、ペプチドリガンドと融合したエキソソームタンパク質を含む、発現ベクターの形質移入による標的化エキソソームの作成を記載する。次に、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．は、エキソソームを形質移入細胞上清からどのように精製し特徴付けるかを説明する。次に、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．は、ｓｉＲＮＡをエキソソームに負荷するための決定的に重要なステップを詳述する。最後に、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．は、どのようにエキソソームを使用してｓｉＲＮＡをインビトロおよびインビボでマウス脳に効率的に送達するかを概説する。予想される結果の例においては、エキソソーム媒介性ｓｉＲＮＡ送達が機能アッセイにより評価され、イメージングもまた提供される。プロトコル全体は約３週間かかる。自己由来の樹状細胞から産生されたエキソソームを使用して本発明に係る送達または投与が実施さ

れてもよい。

【０２９３】

別の実施形態において、Ｗａｈｌｇｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．の血漿エキソソーム（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１２，Ｖｏｌ．４０，Ｎｏ．１７　ｅ１３０）が企図される。エキソソームは、樹状細胞（ＤＣ）、Ｂ細胞、Ｔ細胞、マスト細胞、上皮細胞および腫瘍細胞を含む多くの細胞型によって産生されるナノサイズの小胞（３０～９０ｎｍのサイズ）である。これらの小胞は、後期エンドソームの内側への出芽によって形成され、次に細胞膜との融合時に細胞外環境に放出される。エキソソームは天然では細胞間にＲＮＡを運び、この特性は遺伝子治療において有用であり得る。

【０２９４】

血漿からのエキソソームの調製は、バフィーコートを９００ｇで２０分間遠心して血漿を単離し、続いて細胞上清を回収し、３００ｇで１０分間遠心して細胞を除去しおよび１６　５００ｇで３０分間遠心し、続いて０．２２ｍｍフィルターでろ過することにより行われる。エキソソームを１２０　０００ｇで７０分間超遠心することによりペレット化する。エキソソームへのｓｉＲＮＡの化学的形質移入を、ＲＮＡｉヒト／マウススターターキット（Ｑｕｉａｇｅｎ、Ｈｉｌｄｅｎ、ドイツ）で製造者の指示に従い実施する。１００ｍｌ　ＰＢＳにｓｉＲＮＡを２ｍｍｏｌ／ｍｌの最終濃度で添加する。ＨｉＰｅｒＦｅｃｔ形質移入試薬の添加後、混合物を室温で１０分間インキュベートする。過剰のミセルを除去するため、アルデヒド／硫酸塩ラテックスビーズを使用してエキソソームを再単離する。エキソソームへのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの化学的形質移入もｓｉＲＮＡと同様に行い得る。エキソソームは健常ドナーの末梢血から単離された単球およびリンパ球と共培養され得る。従って、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓを含有するエキソソームをヒトの単球およびリンパ球に導入し、再びヒトに自家導入し得ることが企図され得る。このように、本発明に係る送達または投与は血漿エキソソームを使用して実施し得る。

【０２９５】

リポソーム

本発明に係る送達または投与はリポソームで実施することができる。リポソームは、内側の水性区画を取り囲む単層膜または多重膜脂質二重層、および比較的不透過性の外側の親油性リン脂質二重層で構成される球形小胞構造である。リポソームは生体適合性で非毒性であり、親水性および親油性の両方の薬物分子を送達し、そのカーゴを血漿酵素による分解から保護し、かつそのロードを生体膜および血液脳関門（ＢＢＢ）を越えて輸送することができるため、薬物送達担体として大きな注目を集めている（例えば、レビューについてはＳｐｕｃｈ　ａｎｄ　Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ　ＩＤ　４６９６７９，１２　ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照のこと）。

【０２９６】

リポソームは、いくつかの異なる種類の脂質から作製することができる；しかしながら、薬物担体としてのリポソームの作成にはリン脂質が最も一般的に用いられる。リポソームの形成は脂質薄膜を水溶液と混合すると自発的に起こるが、また、ホモジナイザー、ソニケーター、または押出し機器を使用して振盪の形態の力を加えることにより促進することもできる（例えば、レビューについてはＳｐｕｃｈ　ａｎｄ　Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ　ＩＤ　４６９６７９，１２　ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照のこと）。

【０２９７】

リポソームに、その構造および特性を改良するためいくつかの他の添加剤を添加してもよい。例えば、リポソームの構造の安定化を助けるため、およびリポソーム内部のカーゴの漏出を防ぐため、リポソーム混合物にコレステロールまたはスフィンゴミエリンのいずれかを添加してもよい。さらに、リポソームは水素化卵ホスファチジルコリンまたは卵ホスファチジルコリン、コレステロール、およびジセチルリン酸から調製され、その平均小

胞サイズは約５０および１００ｎｍに調整された（例えば、レビューについてはＳｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照のこと）。

【０２９８】

従来のリポソーム製剤は、主に、天然リン脂質ならびに１，２－ジステアロイル（ｄｉｓｔｅａｒｏｒｙｌ）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、スフィンゴミエリン、卵ホスファチジルコリンおよびモノシアロガングリオシドなどの脂質で構成される。この製剤はリン脂質のみで出来ているため、リポソーム製剤は多くの難題に直面しており、その一つが血漿中での不安定性である。これらの難題を解消しようとするいくつかの試みが、特に脂質膜の操作において行われている。これらの試みの一つはコレステロールの操作に重点を置いたものであった。従来の製剤にコレステロールを加えると、封入された生物活性化合物の血漿中への急速な放出が抑えられ、または１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の安定性が増す（例えば、レビューについてはＳｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照のこと）。

【０２９９】

特に有利な実施形態では、トロイの木馬リポソーム（分子トロイの木馬としても知られる）が望ましく、プロトコルはｈｔｔｐ：／／ｃｓｈｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．ｃｓｈｌｐ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／２０１０／４／ｐｄｂ．ｐｒｏｔ５４０７．ｌｏｎｇで見ることができる。これらの粒子は、導入遺伝子を血管内注入後に脳全体に送達することを可能にする。制約により拘束されるものではないが、特異抗体が表面にコンジュゲートした中性脂質粒子はエンドサイトーシスによって血液脳関門を通過することが可能であると考えられる。本出願人は、トロイの木馬リポソームを利用してＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼファミリーを血管内注入で脳に送達することは、胚を操作する必要なしに全脳トランスジェニック動物を可能にし得るものと仮定する。リポソームでの生体内投与には約１～５ｇの核酸分子、例えばＤＮＡまたはＲＮＡが企図され得る。

【０３００】

別の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系が安定核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）などのリポソームで投与されてもよい（例えば、Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２３，Ｎｏ．８，Ａｕｇｕｓｔ ２００５を参照のこと）。ＳＮＡＬＰ中の標的化された約１、３または５ｍｇ／ｋｇ／日の特定のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓを毎日静脈注射することが企図される。毎日の治療は約３日間にわたり、次に毎週、約５週間にわたり得る。別の実施形態において、約（ａｂｐｉｔ）１または２．５ｍｇ／ｋｇの用量で静脈注射によって投与される特定のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓが封入されたＳＮＡＬＰ）もまた企図される（例えば、Ｚｉｍｍｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｌｅｔｔｅｒｓ，Ｖｏｌ．４４１，４ Ｍａｙ ２００６を参照のこと）。ＳＮＡＬＰ製剤は、脂質３－Ｎ－［（ωメトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－！，２－ジミリスチルオキシプロピルアミン（ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）およびコレステロールを２：４０：１０：４８モルパーセント比で含有し得る（例えば、Ｚｉｍｍｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｌｅｔｔｅｒｓ，Ｖｏｌ．４４１，４ Ｍａｙ ２００６を参照のこと）。

【０３０１】

別の実施形態において、安定核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）は、高度に血管新生したＨｅｐＧ２由来肝腫瘍に対する分子の送達に有効であるが、血管新生に乏しいＨＣＴ－１１６由来肝腫瘍では有効でないことが分かっている（例えば、Ｌｉ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐ

ｙ（２０１２）１９，７７５－７８０を参照のこと）。ＳＮＡＬＰリポソームは、Ｄ－Ｌｉｎ－ＤＭＡおよびＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡをジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、コレステロールおよびｓｉＲＮＡと、２５：１脂質／ｓｉＲＮＡ比および４８／４０／１０／２モル比のコレステロール／Ｄ－Ｌｉｎ－ＤＭＡ／ＤＳＰＣ／ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡを用いて配合することにより調製され得る。得られたＳＮＡＬＰリポソームは約８０～１００ｎｍのサイズである。

【０３０２】

さらに別の実施形態において、ＳＮＡＬＰは、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、米国）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ、Ａｌａｂａｓｔｅｒ、ＡＬ、米国）、３－Ｎ－［（ｗ－メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリスチルオキシプロピルアミン（ｄｉｍｙｒｅｓｔｙｌｏｘｙｐｒｏｐｙｌａｍｉｎｅ）、およびカチオン性１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎジメチルアミノプロパンを含み得る（例えば、Ｇｅｉｓｂｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ　２０１０；３７５：１８９６－９０５を参照のこと）。例えばボーラス静脈内注入として、投与用量当たり約２ｍｇ／ｋｇの総ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ投薬量が企図され得る。

【０３０３】

さらに別の実施形態において、ＳＮＡＬＰは、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ；Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ　Ｉｎｃ．）、ＰＥＧ－ｃＤＭＡ、および１，２－ジリノレイルオキシ－３－（Ｎ；Ｎ－ジメチル）アミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）を含み得る（例えば、Ｊｕｄｇｅ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１９：６６１－６７３（２００９）を参照のこと）。インビボ試験に使用される製剤は、約９：１の最終的な脂質／ＲＮＡ質量比を含み得る。

【０３０４】

ＲＮＡｉナノ医薬の安全性プロファイルがＡｌｎｙｌａｍ　ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＢａｒｒｏｓ　ａｎｄ　Ｇｏｌｌｏｂによりレビューされている（例えば、Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　６４（２０１２）１７３０－１７３７を参照のこと）。安定核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）は、４個の異なる脂質－低ｐＨでカチオン性のイオン化可能な脂質（ＤＬｉｎＤＭＡ）、中性ヘルパー脂質、コレステロール、および拡散性ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）－脂質で構成される。この粒子は直径が約８０ｎｍであり、生理的ｐＨで電荷的に中性である。製剤化の間、イオン化可能な脂質が粒子形成中に脂質をアニオン性ｓｉＲＮＡと縮合させる働きをする。徐々に酸性になるエンドソーム条件下で正に荷電すると、イオン化可能な脂質はまたＳＮＡＬＰとエンドソーム膜との融合も媒介し、ｓｉＲＮＡが細胞質中に放出されることが可能となる。ＰＥＧ脂質は粒子を安定化させ、形成中の凝集を抑え、続いて薬物動態特性を向上させる中性の親水性外面を提供する。

【０３０５】

現在までにＳＮＡＬＰｓｉＲＮＡ製剤を使用した２つの臨床プログラムが開始されている。Ｔｅｋｍｉｒａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓは最近、高ＬＤＬコレステロールの成人ボランティアにおけるＳＮＡＬＰ－ＡｐｏＢの第Ｉ相単回投与試験を完了した。ＡｐｏＢは主に肝臓および空腸で発現し、ＶＬＤＬおよびＬＤＬの集合および分泌に必須である。ＡｐｏＢは本発明者らのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系によっても成功裏にターゲティングされ、実施例３７～３８を参照のこと。１７人の対象者が単一用量のＳＮＡＬＰ－ＡｐｏＢ（７用量レベルにわたり用量漸増）を受けた。肝毒性（前臨床試験に基づき潜在的な用量制限毒性として予想された）のエビデンスはなかった。１人（２人のうち）の対象者は最も高い用量で免疫系刺激と一致するインフルエンザ様症状を起こし、試験を終了させる決断がなされた。

【０３０６】

Ａｌｎｙｌａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓも同様にＡＬＮ－ＴＴＲ０１を進め

ており、ＡＬＮ－ＴＴＲ０１は上記に記載されるＳＮＡＬＰ技術を用いるもので、突然変異体ＴＴＲおよび野生型ＴＴＲの両方の肝細胞産生を標的にしてＴＴＲアミロイドーシス（ＡＴＴＲ）を治療する。３つのＡＴＴＲ症候群：家族性アミロイド神経障害（ＦＡＰ）および家族性アミロイド心筋症（ＦＡＣ）－いずれもＴＴＲにおける常染色体優性突然変異により引き起こされる；および野生型ＴＴＲにより引き起こされる老人性全身性アミロイドーシス（ＳＳＡ）が記載されている。ＡＴＴＲ患者においてＡＬＮ－ＴＴＲ０１のプラセボ対照単回用量漸増第Ｉ相試験が最近完了した。ＡＬＮ－ＴＴＲ０１が１５分間の静脈内注入として３１人の患者（２３人が治験薬および８人がプラセボ）に０．０１～１．０ｍｇ／ｋｇ（ｓｉＲＮＡ基準）の用量範囲内で投与された。治療は十分な忍容性があり、肝機能検査値の有意な増加はなかった。２３人中３人の患者において≧０．４ｍｇ／ｋｇで注入関連反応が認められた；全患者とも注入速度を下げたことに応答し、全員が試験を続行した。２人の患者において１ｍｇ／ｋｇの最も高い用量で最小限かつ一過性の血清サイトカインＩＬ－６、ＩＰ－１０およびＩＬ－１ｒａの上昇が（前臨床試験およびＮＨＰ試験から予想されたとおり）認められた。ＡＬＮ－ＴＴＲ０１の期待される薬力学的効果である血清ＴＴＲの低下が１ｍｇ／ｋｇで観察された。

【０３０７】

さらに別の実施形態において、ＳＮＡＬＰは、カチオン性脂質、ＤＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ－脂質を可溶化することにより作製されてもよく、それらがエタノール中にそれぞれ４０：１０：４０：１０のモル比で溶解された（Ｓｅｍｐｌｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｎｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ ２８ Ｎｕｍｂｅｒ ２ Ｆｅｂｒｕａｒｙ ２０１０，ｐｐ．１７２－１７７を参照）。この脂質混合物が、それぞれ３０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）および６．１ｍｇ／ｍｌの最終エタノールおよび脂質濃度となるように水性緩衝液（５０ｍＭクエン酸塩、ｐＨ４）に混合しながら添加され、２２℃で２分間平衡させた後、押し出された。水和した脂質が、動的光散乱分析によって決定するとき７０～９０ｎｍの小胞直径が得られるまで、Ｌｉｐｅｘエクストルーダー（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｌｉｐｉｄｓ）を使用して２２℃で２つの積み重ねた８０ｎｍ孔径フィルター（Ｎｕｃｌｅｐｏｒｅ）に通して押し出された。これは概して１～３回通過させることが必要であった。ｓｉＲＮＡ（３０％エタノールを含有する５０ｍＭクエン酸塩、ｐＨ４水溶液中に可溶化されている）が、予め平衡化させた（３５℃）小胞に約５ｍｌ／分の速度で混合しながら添加された。０．０６（ｗｔ／ｗｔ）の最終的な標的ｓｉＲＮＡ／脂質比に達した後、混合物を３５℃でさらに３０分間インキュベートすることにより小胞の再構成およびｓｉＲＮＡの封入が可能にされた。次にエタノールが除去され、透析によるかあるいはタンジェンシャルフローダイアフィルトレーションにより外側緩衝液がＰＢＳ（１５５ｍＭ ＮａＣｌ、３ｍＭ Ｎａ２ＨＰＯ４、１ｍＭ ＫＨ２ＰＯ４、ｐＨ７．５）に交換された。制御された段階希釈法プロセスを用いてｓｉＲＮＡがＳＮＡＬＰに封入された。ＫＣ２－ＳＮＡＬＰの脂質成分は、５７．１：７．１：３４．３：１．４のモル比で使用されるＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ（カチオン性脂質）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ；Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ）、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ）およびＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡであった。負荷済みの粒子が形成されたところで、ＳＮＡＬＰがＰＢＳに対して透析され、使用前に０．２μｍフィルターでろ過滅菌された。平均粒度は７５～８５ｎｍであり、ｓｉＲＮＡの９０～９５％が脂質粒子内に封入された。インビボ試験に使用される製剤の最終的なｓｉＲＮＡ／脂質比は、約０．１５（ｗｔ／ｗｔ）であった。第ＶＩＩ因子ｓｉＲＮＡを含有するＬＮＰ－ｓｉＲＮＡ系は使用直前に滅菌ＰＢＳ中に適切な濃度に希釈され、製剤は１０ｍｌ／ｋｇの総容積で外側尾静脈から静脈内投与された。この方法は本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に敷衍することができる。

【０３０８】

他の脂質

他のカチオン性脂質、例えばアミノ脂質２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）を利用してＣＲＩＳＰＲ

ＣａｓをＳｉＲＮＡと同様に封入し得る（例えば、Ｊａｙａｒａｍａｎ，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．２０１２，５１，８５２９－８５３３を参照のこと）。以下の脂質組成を有する予め形成された小胞が企図され得る：それぞれモル比４０／１０／４０／１０、および約０．０５（ｗ／ｗ）のＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡ／総脂質比のアミノ脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、コレステロールおよび（Ｒ）－２，３－ビス（オクタデシルオキシ）プロピル－１－（メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）プロピルカルバメート（ＰＥＧ－脂質）。７０～９０ｎｍの範囲の狭い粒度分布および０．１１～０．０４の低い多分散性指数（ｎ＝５６）を確実にするため、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ　ＲＮＡを添加する前に、粒子を最大３回まで８０ｎｍ膜に通して押し出すことができる。極めて強力なアミノ脂質１６を含有する粒子が使用されてもよく、ここでは４つの脂質成分１６、ＤＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ－脂質（５０／１０／３８．５／１．５）のモル比がインビボ活性を増強するようにさらに最適化され得る。

【０３０９】

Ｍｉｃｈａｅｌ　Ｓ　Ｄ　Ｋｏｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（「マウスにおける化学改変ｍＲＮＡ送達後の治療用タンパク質の発現（Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｆ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ａｆｔｅｒ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｏｆ　ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ｍＲＮＡ　ｉｎ　ｍｉｃｅ）：Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ：２９，Ｐａｇｅｓ：１５４－１５７（２０１１）、オンライン発行２０１１年１月９日）は、脂質エンベロープを使用したＲＮＡの送達を記載している。脂質エンベロープの使用もまた本発明において好ましい。

【０３１０】

別の実施形態において、脂質を本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系と配合して脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を形成してもよい。脂質としては、限定はされないが、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ４、Ｃ１２－２００およびコリピド（ｃｏｌｉｐｉｄ）ジステアロイルホスファチジルコリン（ｄｉｓｔｅｒｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌ　ｃｈｏｌｉｎｅ）、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＭＧが挙げられ、自発的小胞形成手法を用いてｓｉＲＮＡの代わりにＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓと配合され得る（例えば、Ｎｏｖｏｂｒａｎｔｓｅｖａ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ－Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ（２０１２）１，ｅ４；ｄｏｉ：１０．１０３８／ｍｔｎａ．２０１１．３を参照のこと）。成分モル比は約５０／１０／３８．５／１．５（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡまたはＣ１２－２００／ジステアロイルホスファチジルコリン（ｄｉｓｔｅｒｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌ　ｃｈｏｌｉｎｅ）／コレステロール／ＰＥＧ－ＤＭＧ）であり得る。最終的な脂質：ｓｉＲＮＡ重量比はＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡおよびＣ１２－２００脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の場合にそれぞれ約１２：１および９：１であり得る。製剤は約８０ｎｍの平均粒子直径を有し、９０％超の捕捉効率であり得る。３ｍｇ／ｋｇ用量が企図され得る。

【０３１１】

Ｔｅｋｍｉｒａは、米国および米国外に、ＬＮＰおよびＬＮＰ製剤の種々の態様に関する約９５件のパテントファミリーのポートフォリオを有し（例えば、米国特許第７，９８２，０２７号明細書；同第７，７９９，５６５号明細書；同第８，０５８，０６９号明細書；同第８，２８３，３３３号明細書；同第７，９０１，７０８号明細書；同第７，７４５，６５１号明細書；同第７，８０３，３９７号明細書；同第８，１０１，７４１号明細書；同第８，１８８，２６３号明細書；同第７，９１５，３９９号明細書；同第８，２３６，９４３号明細書および同第７，８３８，６５８号明細書ならびに欧州特許第１７６６０３５号明細書；同第１５１９７１４号明細書；同第１７８１５９３号明細書および同第１６６４３１６号明細書を参照のこと）、それらは全て本発明に使用しおよび／または適合させることができる。

【０３１２】

ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系は、タンパク質、タンパク質前駆体、または部分的にもしくは完全にプロセシングされた形態のタンパク質もしくはタンパク質前駆体をコードし得る改変核酸分子を含む組成物の製剤化の態様に関する米国特許出願公開第２０１３０２５２２

８１号明細書および同第２０１３０２４５１０７号明細書および同第２０１３０２４４２７９号明細書（Ｍｏｄｅｒｎａ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓに譲渡された）にさらに記載されるものなどのＰＬＧＡマイクロスフェアに封入されて送達されてもよい。この製剤は、モル比５０：１０：３８．５：１．５～３．０（カチオン性脂質：膜融合性脂質：コレステロール：ＰＥＧ脂質）を有し得る。ＰＥＧ脂質は、限定はされないが、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧから選択され得る。膜融合性脂質はＤＳＰＣであってもよい。Ｓｃｈｒｕｍ　ｅｔ　ａｌ．，「エンジニアリングされた核酸の送達および製剤化（Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ａｎｄ　Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ）」、米国特許出願公開第２０１２０２５１６１８号明細書も参照のこと。

【０３１３】

Ｎａｎｏｍｅｒｉｃｓの技術は、低分子量疎水性薬物、ペプチド、および核酸ベースの治療薬（プラスミド、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ）を含めた広範囲の治療薬のバイオアベイラビリティの課題に対処する。この技術が明らかな利点を実証している特定の投与経路としては、経口経路、血液脳関門を通る輸送、固形腫瘍ならびに眼への送達が挙げられる。例えば、Ｍａｚｚａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３，ＡＣＳ　Ｎａｎｏ．２０１３　Ｆｅｂ　２６；７（２）：１０１６－２６；Ｕｃｈｅｇｂｕ　ａｎｄ　Ｓｉｅｗ，２０１３，Ｊ　Ｐｈａｒｍ　Ｓｃｉ．１０２（２）：３０５－１０およびＬａｌａｔｓａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２，Ｊ　Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｒｅｌｅａｓｅ．２０１２　Ｊｕｌ　２０；１６１（２）：５２３－３６を参照のこと。

【０３１４】

米国特許出願公開第２００５００１９９２３号明細書は、生理活性分子、例えばポリヌクレオチド分子、ペプチドおよびポリペプチドおよび／または医薬品を哺乳類の体に送達するためのカチオン性デンドリマーについて記載している。このデンドリマーは、生理活性分子の送達を、例えば肝臓、脾臓、肺、腎臓または心臓に標的化するのに好適である。デンドリマーは、単純な分枝状単量体単位から段階的な方式で調製される合成三次元巨大分子であり、その性質および機能性を容易に制御し、変えることができる。デンドリマーは、構成要素を多官能性コアに繰り返し加えることによるか（ダイバージェント合成手法）、または多官能コアに向かって繰り返し加える（コンバージェント合成手法）ことにより合成され、構成要素の三次元シェルを加える毎に、より高い世代のデンドリマーの形成がもたらされる。ポリプロピレンイミンデンドリマーはジアミノブタンコアから開始され、それに対して、第一級アミンに対するアクリロニトリルの二重マイケル付加と、続くニトリルの水素化により、２倍の数のアミノ基が付加される。その結果アミノ基の倍加が生じる。ポリプロピレンイミンデンドリマーは１００％プロトン化可能な窒素および最大６４個の末端アミノ基を含有する（第５世代、ＤＡＢ　６４）。プロトン化可能な基は、通常、中性ｐＨでプロトンを受容可能なアミン基である。遺伝子送達剤としてのデンドリマーの使用は、大部分が、それぞれコンジュゲーション単位としてアミン／アミドの混合物またはＮ－Ｐ（O_2）Ｓを有するポリアミドアミンおよび亜リン酸含有化合物の使用に主眼が置かれており、遺伝子送達のためのより低世代のポリプロピレンイミンデンドリマーの使用に関する研究は報告されていない。ポリプロピレンイミンデンドリマーはまた、薬物デリバリーおよび周辺のアミノ酸基によって化学的に改変されるときのゲスト分子のその封入のためのｐＨ感受性制御放出系としても研究されている。ポリプロピレンイミンデンドリマーの細胞毒性およびＤＮＡとの相互作用ならびにＤＡＢ　６４の形質移入有効性もまた研究されている。

【０３１５】

米国特許出願公開第２００５００１９９２３号明細書は、先行の報告に反して、カチオン性デンドリマー、例えばポリプロピレンイミンデンドリマーが、特異的標的化および低毒性など、遺伝物質などの生理活性分子の標的化デリバリーにおける使用に好適な特性を示すという観察に基づいている。加えて、カチオン性デンドリマーの誘導体もまた生理活性分子の標的化デリバリーに好適な特性を示す。「生理活性ポリマー（Ｂｉｏａｃｔｉｖ

ｅ　Ｐｏｌｙｍｅｒｓ）」、米国特許出願公開第２００８０２６７９０３号明細書も参照されたく、これは以下を開示している「カチオン性ポリアミンポリマーおよびデンドリマーポリマーを含む種々のポリマーが抗増殖活性を有する、従って新生物および腫瘍、炎症性障害（自己免疫障害を含む）、乾癬およびアテローム性動脈硬化症などの、望ましくない細胞増殖によって特徴付けられる障害の治療に有用であり得ることが示される。こうしたポリマーは単独で活性薬剤として、または他の治療剤、例えば薬物分子または遺伝子治療用核酸の送達媒体として使用され得る。そのような場合、ポリマーそれ自体の固有の抗腫瘍活性は、送達される薬剤の活性を補完し得る」。

【０３１６】

超荷電タンパク質（ｓｕｐｅｒｃｈａｒｇｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ）

超荷電タンパク質は、通常高い正または負の正味理論電荷を有するエンジニアリングされたまたは天然に存在するタンパク質の一クラスである。極度に負に荷電したタンパク質および極度に正に荷電したタンパク質の両方が、熱的または化学的に引き起こされる凝集に耐える顕著な能力を呈する。極度に正に荷電したタンパク質はまた、哺乳類細胞に侵入することも可能である。カーゴをこれらのタンパク質、例えばプラスミドＤＮＡ、ｓｉＲＮＡ、または他のタンパク質と会合させることにより、インビトロおよびインビボの両方でこれらの巨大分子を哺乳類細胞に機能的に送達することが可能となり得る。Ｄａｖｉｄ　Ｌｉｕの研究室は、２００７年に超荷電タンパク質の作成および特徴付けを報告した（Ｌａｗｒｅｎｃｅ　ｅｔ　ａｌ．，２００７，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｓｏｃｉｅｔｙ　１２９，１０１１０－１０１１２）。

【０３１７】

哺乳類細胞に対するｓｉＲＮＡおよびプラスミドＤＮＡの非ウイルス性送達は、研究および治療の双方の適用に価値がある（Ａｋｉｎｃ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２６，５６１－５６９）。精製＋３６ＧＦＰタンパク質（または他の極度に正に荷電したタンパク質）を適切な無血清培地中でｓｉＲＮＡと混合し、細胞を加える前に複合体を形成させる。この段階で血清を含めると、超荷電タンパク質－ｓｉＲＮＡ複合体の形成が阻害され、治療の有効性が低下する。以下のプロトコルが種々の細胞系に有効であることが分かっている（ＭｃＮａｕｇｈｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１０６，６１１１－６１１６）。しかしながら、手順を特定の細胞系に最適化するため、タンパク質およびｓｉＲＮＡの用量を変化させるパイロット実験を実施すべきである。

【０３１８】

（１）治療前日、４８ウェルプレートにウェル当たり1×10^5細胞をプレーティングする。

【０３１９】

（２）治療当日、精製＋３６ＧＦＰタンパク質を最終濃度が２００ｎＭとなるように無血清培地中に希釈する。最終濃度が５０ｎＭとなるようにｓｉＲＮＡを添加する。ボルテックスして混合し、室温で１０分間インキュベートする。

【０３２０】

（３）インキュベーション中、細胞から培地を吸引し、ＰＢＳで１回洗浄する。

【０３２１】

（４）＋３６ＧＦＰおよびｓｉＲＮＡのインキュベーション後、タンパク質－ｓｉＲＮＡ複合体を細胞に添加する。

【０３２２】

（５）細胞を複合体と共に３７℃で４時間インキュベートする。

【０３２３】

（６）インキュベーション後、培地を吸引し、２０Ｕ／ｍＬヘパリンＰＢＳで３回洗浄する。細胞を血清含有培地と共に、ノックダウンのアッセイに応じてさらに４８時間またはそれより長くインキュベートする。

【０３２４】

（７）免疫ブロット、ｑＰＣＲ、表現型アッセイ、または他の適切な方法によって細胞を分析する。

【０３２５】

＋３６　ＧＦＰが様々な細胞における有効なプラスミド送達試薬であることが見出されている。プラスミドＤＮＡはｓｉＲＮＡより大きいカーゴであるため、プラスミドを有効に複合体化するには、比例してさらなる＋３６　ＧＦＰタンパク質が必要となる。有効なプラスミド送達のため、出願人らは、インフルエンザウイルスヘマグルチニンタンパク質由来の既知のエンドソーム破壊ペプチドであるＣ末端ＨＡ２ペプチドタグを有する＋３６ＧＦＰの変異体を開発している。種々の細胞において以下のプロトコルが有効となっているが、上記のとおりプラスミドＤＮＡおよび超荷電タンパク質の用量を特定の細胞系および送達用途に最適化することが勧められる。

【０３２６】

（１）治療前日、４８ウェルプレートにウェル当たり1×10^{5}をプレーティングする。

【０３２７】

（２）治療当日、精製ｐ３６　ＧＦＰタンパク質を最終濃度が２ｍＭとなるように無血清培地中に希釈する。１ｍｇのプラスミドＤＮＡを添加する。ボルテックスして混合し、室温で１０分間インキュベートする。

【０３２８】

（３）インキュベーション中、細胞から培地を吸引し、ＰＢＳで１回洗浄する。

【０３２９】

（４）ｐ３６　ＧＦＰおよびプラスミドＤＮＡのインキュベーション後、細胞にタンパク質－ＤＮＡ複合体を穏やかに添加する。

【０３３０】

（５）細胞を複合体と共に３７℃で４時間インキュベートする。

【０３３１】

（６）インキュベーション後、培地を吸引し、ＰＢＳで洗浄する。血清含有培地中で細胞をインキュベートし、さらに２４～４８時間インキュベートする。

【０３３２】

（７）必要に応じてプラスミド送達を（例えばプラスミドドライブ遺伝子発現により）分析する。

【０３３３】

例えば、ＭｃＮａｕｇｈｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１０６，６１１１－６１１６（２００９）；Ｃｒｏｎｉｃａｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＡＣＳ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　５，７４７－７５２（２０１０）；Ｃｒｏｎｉｃａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　＆　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１８，８３３－８３８（２０１１）；Ｔｈｏｍｐｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　５０３，２９３－３１９（２０１２）；Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，Ｄ．Ｂ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　＆　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１９（７），８３１－８４３（２０１２）も参照のこと。この超荷電タンパク質の方法を、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系の送達に使用しおよび／または適合させることができる。

【０３３４】

細胞透過性ペプチド

さらに別の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系の送達に細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）が企図される。ＣＰＰは、様々な分子カーゴ（ナノサイズ粒子から化学的小分子および大型ＤＮＡ断片まで）の細胞取込みを促進する短鎖ペプチドである。用語「カーゴ」は、本明細書で使用されるとき、限定はされないが、治療剤、診断プローブ、ペプチド、核酸、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プラスミド、タンパク質、ナノ粒子、リポソーム、発色団、小分子および放射性物質からなる群を含む。本発明の態様では、カーゴにはまた、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系の任意の成分または機能性のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系全体も

含まれ得る。本発明の態様は、所望のカーゴを対象に送達する方法をさらに提供し、この方法は、（ａ）本発明の細胞透過性ペプチドと所望のカーゴとを含む複合体を調製するステップと、（ｂ）複合体を対象に経口的に、関節内に、腹腔内に、髄腔内に、動脈内に（ｉｎｔｒａｒｔｅｒｉａｌｌｙ）、鼻腔内に、実質内に、皮下に、筋肉内に、静脈内に、経皮的に、直腸内に、または局所的に投与するステップとを含む。カーゴは、共有結合による化学的結合を介するか、あるいは非共有結合性の相互作用を介してペプチドと会合する。

【０３３５】

ＣＰＰの機能はカーゴを細胞に送達することであり、一般に、哺乳類生細胞のエンドソームに送達されたカーゴでエンドサイトーシスを通じて起こるプロセスである。細胞透過性ペプチドはサイズ、アミノ酸配列、および電荷が様々であるが、しかしＣＰＰは全てが、細胞膜を移行させて細胞質または細胞小器官への様々な分子カーゴの送達を促進する能力という１つの特徴的な特性を有する。ＣＰＰ移行は３つの主要な侵入機構に分類され得る：膜における直接の侵入、エンドサイトーシス媒介性の侵入、および一過性の構造の形成による移行。ＣＰＰは、医薬において癌およびウイルス阻害薬を含めた種々の疾患の治療における薬物デリバリー剤として、ならびに細胞標識用の造影剤として、数多くの適用が見出されている。造影剤の例には、ＧＦＰの担体、ＭＲＩ造影剤、または量子ドットとして働くことが含まれる。ＣＰＰは、インビトロおよびインビボ送達ベクターとして研究および医薬での使用に多大な可能性を秘めている。ＣＰＰは、典型的には、高い相対存在量の正電荷アミノ酸、例えばリジンまたはアルギニンを含有するか、あるいは極性／荷電アミノ酸と非極性、疎水性アミノ酸との交互のパターンを含有する配列を有するアミノ酸組成を有する。これらの２つのタイプの構造は、それぞれポリカチオン性または両親媒性と称される。第３のＣＰＰクラスは、低い正味電荷で非極性残基のみを含有するか、または細胞取込みに決定的に重要な疎水性アミノ酸基を有する疎水性ペプチドである。発見当初のＣＰＰの１つはヒト免疫不全ウイルス１型（ＨＩＶ－１）由来のトランス活性化転写活性化因子（Ｔａｔ）であり、これは培養下で数多くの細胞型によって周囲の培地から効率的に取り込まれることが見出された。それ以降、既知のＣＰＰの数は大幅に増加しており、より有効なタンパク質形質導入特性を有する小分子合成類似体が作成されている。ＣＰＰには、限定はされないが、ペネトラチン、Ｔａｔ（４８－６０）、トランスポータン、および（Ｒ－ＡｈＸ－Ｒ４）（Ａｈｘ＝アミノヘキサノイル）が含まれる。

【０３３６】

米国特許第８，３７２，９５１号明細書は、高度な細胞透過効率および低毒性を呈する好酸球陽イオンタンパク質（ＥＣＰ）に由来するＣＰＰを提供する。そのカーゴを有するＣＰＰを脊椎動物対象に送達する態様もまた提供される。ＣＰＰおよびその送達のさらなる態様は、米国特許第８，５７５，３０５号明細書；同第８，６１４，１９４号明細書および同第８，０４４，０１９号明細書にあり得る。

【０３３７】

ＣＰＰを用いてＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を送達し得ることはまた、全体として参照により援用されるＳｕｒｅｓｈ Ｒａｍａｋｒｉｓｈｎａ，Ａｂｕ－Ｂｏｎｓｒａｈ Ｋｗａｋｕ Ｄａｄ，Ｊａｇａｄｉｓｈ Ｂｅｌｏｏｒ，ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．２０１４ Ａｐｒ ２．［Ｅｐｕｂ ａｈｅａｄ ｏｆ ｐｒｉｎｔ］による論稿「Ｃａｓ９タンパク質およびガイドＲＮＡの細胞透過性ペプチド媒介性送達による遺伝子破壊（Ｇｅｎｅ ｄｉｓｒｕｐｔｉｏｎ ｂｙ ｃｅｌｌ－ｐｅｎｅｔｒａｔｉｎｇ ｐｅｐｔｉｄｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｃａｓ９ ｐｒｏｔｅｉｎ ａｎｄ ｇｕｉｄｅ ＲＮＡ）」に提供され、ここではＣＰＰコンジュゲート組換えＣａｓ９タンパク質およびＣＰＰ複合体化ガイドＲＮＡによる治療がヒト細胞系において内在性遺伝子破壊を引き起こすことが実証されている。この論文では、Ｃａｓ９タンパク質はチオエーテル結合を介してＣＰＰにコンジュゲートされ、一方でガイドＲＮＡはＣＰＰと複合体化されて凝縮正電荷ナノ粒子を形成した。改変Ｃａｓ９およびガイドＲＮＡによる胚性幹細胞、皮膚線維芽細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＨｅＬａ細胞、および胚性癌腫細胞を含

めたヒト細胞の同時のおよび逐次的な治療が効率的な遺伝子破壊をもたらし、プラスミド形質移入と比べてオフターゲット突然変異が低下したことが示された。

【０３３８】

植込み型装置

別の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系の送達に植込み型装置もまた企図される。例えば、米国特許出願公開第２０１１０１９５１２３号明細書は、薬物を局所的に長時間溶出させる植込み型医療器具が、いくつかの種類のかかる装置、治療の実施態様および植え込み方法を含め、提供されることを開示する。この装置は、例えばマトリックスなどの、装置本体として使用されるポリマー基材と、薬物と、ある場合にはさらなる足場材料、例えば金属または別のポリマー、ならびに可視性およびイメージングを増強する材料とで構成される。薬物の選択は、薬物を局所的に長時間放出するという利点に基づき、ここで薬物は直接的に腫瘍、炎症、変性などの患部の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）に対して、または対症目的で、または損傷した平滑筋細胞に対して、または予防のため放出される。ある種の薬物は、限定はされないが、ｓｉ　ＲＮＡ、ｓｈ　ＲＮＡ、またはアンチセンスＲＮＡ／ＤＮＡ、リボザイムおよびヌクレオシド類似体を含めた、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）に基づく遺伝子サイレンシング薬である。従って、このシステムは、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に使用しおよび／または適合させることができる。一部の実施形態における植え込み方法は、小線源照射療法および針生検を含め、現在開発され、他の治療に使用されている既存の植え込み手技である。そのような場合、この発明に記載される新規インプラントの寸法は、元のインプラントと同様である。典型的には同じ治療手技の中で数個の装置が植え込まれる。

【０３３９】

米国特許出願公開第２０１１０１９５１２３号明細書に記載されるとおり、腹腔などの体腔に適用可能なシステム、および／または薬物送達系が繋ぎ止められたりまたは取り付けられたりしない、生体安定性および／または分解性および／または生体吸収性ポリマー基材（例えば場合によりマトリックスであってもよい）を含む任意の他の種類の投与を含めた、薬物送達植込み型または挿入型システムが提供される。用語「挿入」には植え込みも含まれることに留意しなければならない。この薬物送達系は、好ましくは米国特許出願公開第２０１１０１９５１２３号明細書に記載されるとおりの「Ｌｏｄｅｒ」として植え込まれる。

【０３４０】

１つまたは複数のポリマーは生体適合性で、１つおよび／または複数の薬剤を組み込み、制御された速度での薬剤の放出を可能にし、ここで例えばマトリックスなどのポリマー基材の総容積は、一部の実施形態では場合により、および好ましくは、薬剤の治療レベルに達することを可能にする最大容積以下である。非限定的な例として、かかる容積は、薬剤を負荷するための容積によって必要とされるところに応じて、好ましくは０．１mm^3～１０００mm^3の範囲内である。Ｌｏｄｅｒは場合により、例えば、サイズが機能性によって決まる装置、例えばおよび限定なしに、膝関節、子宮内または子宮頸部リングなどで取り込まれる場合、さらに大きくてもよい。

【０３４１】

薬物送達系（組成物の送達用）は、一部の実施形態では、好ましくは分解性ポリマーを用いるように設計され、ここで主となる放出機構はバルク浸食である；または一部の実施形態では、非分解性の、または分解が遅いポリマーが使用され、ここで主となる放出機構はバルク浸食よりむしろ拡散であって、外側部分が膜として機能し、かつその内側部分が、長期間にわたり（例えば約１週間～約数ヵ月間）実質的に周囲の影響を受けない薬物リザーバとして機能する。異なる放出機構を備える異なるポリマーの組み合わせもまた場合により用いられ得る。表面における濃度勾配は、好ましくは全薬物放出期間のうちかなりの期間において事実上一定に維持され、従って拡散速度は事実上一定である（「ゼロモード」拡散と称される）。用語「一定」とは、拡散速度が好ましくは治療有効性の下限閾値より高く維持されるが、それでもなお、場合により初期バーストを特徴としおよび／また

は例えばある程度増減して変動し得ることが意味される。拡散速度は好ましくは長期間にわたりそのように維持され、それは、治療上有効な期間、例えば有効なサイレンシング期間を最適化するのにある程度一定であると考えられる。

【０３４２】

薬物送達系は場合により、および好ましくは、ヌクレオチドベースの治療剤を、化学的性質であるか、それとも酵素からの攻撃および対象の体における他の要因に起因するかに関わらず、分解から保護するように設計される。

【０３４３】

米国特許出願公開第２０１１０１９５１２３号明細書に記載されるとおりの薬物送達系は、例えば場合により、限定はされないが熱的加熱および冷却、レーザービーム、ならびに集束超音波を含む超音波および／またはＲＦ（高周波）方法または装置を含めた、非侵襲性および／または最小侵襲性の作動および／または加速／減速方法によって、その装置の植え込み時および／または植え込み後に動作する検知および／または作動器具を場合により伴う。

【０３４４】

米国特許出願公開第２０１１０１９５１２３号明細書の一部の実施形態によれば、局所送達部位には、場合により、細胞の高度な異常増殖、および抑制されたアポトーシスによって特徴付けられる標的部位、例えば腫瘍、活動性および／または慢性炎症および感染症、例えば自己免疫病状、変性した組織、例えば筋肉および神経組織、慢性痛、変性部位、ならびに骨折箇所および組織再生が増強される他の創傷箇所、ならびに損傷した心筋、平滑筋および横紋筋が含まれ得る。局所送達部位にはまた、場合により、妊娠、感染症および加齢の予防を含めた予防的活動を果たすことを可能にする部位も含まれる。

【０３４５】

組成物の植え込み部位、すなわち標的部位は、好ましくは標的化された局所送達に十分に小さい半径、面積および／または容積を特徴とする。例えば、標的部位は場合により約０．１ｍｍ～約５ｃｍの範囲の直径を有する。

【０３４６】

標的部位の位置は、好ましくは治療有効性が最大となるように選択される。例えば、薬物送達系の組成物（場合により上記に記載したとおりの植え込み用装置を伴う）は、場合により、および好ましくは、腫瘍環境、またはその関連する血液供給源の内部もしくはそれに近接して植え込まれる。

【０３４７】

例えば組成物（場合により装置を伴う）は、場合により膵臓、前立腺、乳房、肝臓の内部もしくはそれに近接して、ニップルを用いて血管系の中などに植え込まれる。

【０３４８】

標的位置は、場合により以下からなる群から選択される（Ｌｏｄｅｒの植え込みには場合により体内の任意の部位が好適であり得るため、あくまでも非限定的な例として）：１．基底核、白質および灰白質におけるパーキンソン病またはアルツハイマー病などにおける変性部位の脳；２．筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）などにおける脊椎；３．ＨＰＶ感染症を予防するための子宮頸部；４．活動性および慢性炎症関節；５．乾癬などにおける真皮；６．鎮痛効果のための交感神経および感覚（ｓｅｎｓｏｒｉｃ）神経部位；７．骨内埋込み；８．急性および慢性感染症部位；９．腔内；１０．内耳－聴覚系、内耳の迷路、前庭系；１１．気管内；１２．心内；冠動脈、心外膜；１３．膀胱；１４．胆管系；１５．実質組織、例えば、限定はされないが、腎臓、肝臓、脾臓；１６．リンパ節；１７．唾液腺；１８．歯肉；１９．関節内（関節の中）；２０．眼内；２１．脳組織；２２．脳室；２３．体腔、例えば腹腔（例えば、限定はしないが、卵巣癌）；２４．食道内および２５．直腸内。

【０３４９】

場合により、システム（例えば組成物を入れた装置）の挿入は標的部位および当該部位の近傍におけるＥＣＭへの材料の注入を伴い、標的部位およびかかる部位の近傍の局所的

ｐＨおよび／または温度および／またはＥＣＭにおける薬物の拡散および／または薬物動態に影響を及ぼす他の生物学的な要因に影響が及ぼされる。

【０３５０】

場合により、一部の実施形態によれば、前記薬剤の放出は、レーザービーム、放射線、熱的加熱および冷却、および超音波、例えば集束超音波および／またはＲＦ（高周波）方法または装置、および化学的活性化因子を含めた、非侵襲性および／または最小侵襲性のおよび／または他の作動および／または加速／減速方法によって、挿入前および／または挿入時および／または挿入後に動作する検知および／または作動器具を伴い得る。

【０３５１】

米国特許出願公開第２０１１０１９５１２３号明細書の他の実施形態によれば、薬物は好ましくは、以下に記載するとおり、例えば乳房、膵臓、脳、腎臓、膀胱、肺、および前立腺における限局した癌の症例のための、遺伝子サイレンシング生物学的ＲＮＡｉ薬物を含む。さらに、ｓｉＲＮＡ以外の多くの薬物がＬｏｄｅｒにおける封入に適用可能であり、かかる薬物を例えばマトリックスなどのＬｏｄｅｒ基材で封入し得る限り、この発明に関連して使用することができる。かかる薬物には、背痛の場合に脊椎の近傍に植え込まれるＬｏｄｅｒ内の真菌感染症用のアムホテリシンＢ；骨髄炎などでの抗生物質；麻酔薬などの鎮痛薬；アルツハイマー病またはパーキンソン病などにおける抗変性薬を含め、現在この発明以外の方法によって送達されている承認済みの薬物が含まれる。かかるシステムは、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系の送達に使用しおよび／または適合させることができる。

【０３５２】

例えば、平滑筋細胞（ステント留置手技中に損傷し、結果として増殖する傾向があるもの）の成長または再成長の防止などの特定の適用について、薬物は、場合により、Ｈ１９サイレンシングを含め、平滑筋細胞をサイレンシングするｓｉＲＮＡであるか、またはタキソール、ラパマイシンおよびラパマイシン類似体からなる群から選択される薬物であってもよい。その場合、Ｌｏｄｅｒは好ましくは、一定の速度で長時間放出する薬物溶出性ステント（ＤＥＳ）か、あるいはステントに関連する、別途植え込まれる専用の装置である。この全てについて、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に使用しおよび／または適合させることができる。

【０３５３】

特定の適用の別の例として、異常な遺伝子発現に起因して神経および筋肉の変性疾患が発症する。サイレンシングＲＮＡの局所送達は、かかる異常な遺伝子発現に干渉するための治療特性を有し得る。小分子薬物および巨大分子を含めた抗アポトーシス薬、抗炎症薬および抗変性薬の局所送達もまた場合により効果があり得る。その場合、Ｌｏｄｅｒは一定速度での長時間放出用に適用されおよび／または別途植え込まれる専用の装置を介して適用される。この全てについて、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に使用しおよび／または適合させることができる。

【０３５４】

特定の適用のさらに別の例として、精神障害および認知障害が遺伝子改変因子で治療される。サイレンシングＲＮＡによる遺伝子ノックダウンが治療選択肢である。ヌクレオチドベースの薬剤を中枢神経系部位に局所送達するＬｏｄｅｒが、限定はされないが、精神病、双極性疾患、神経症性障害および行動性の病気を含めた精神障害および認知障害に対する治療選択肢である。Ｌｏｄｅｒはまた、特定の脳部位に植え込まれると、小分子薬物および巨大分子を含めた薬物も局所送達することができる。この全てについて、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に使用しおよび／または適合させることができる。

【０３５５】

特定の適用の別の例として、局所部位での自然免疫および／または適応免疫メディエーターのサイレンシングにより、移植臓器拒絶反応を予防することが可能となる。移植臓器および／または移植部位に植え込まれたＬｏｄｅｒによるサイレンシングＲＮＡおよび免疫調節試薬の局所送達は、ＣＤ８などの免疫細胞を寄せ付けないことによる局所的な免疫

抑制が移植臓器に対して活性化された状態にする。この全てについて、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に使用しおよび／または適合させることができる。

【０３５６】

特定の適用の別の例として、ＶＥＧＦおよびアンジオゲニンなどを含めた血管成長因子が血管新生に必須である。因子、ペプチド、ペプチドミメティクスの局所送達、またはそれらのリプレッサーの抑制は、重要な治療モダリティである；Ｌｏｄｅｒによる血管新生を刺激する因子、ペプチド、巨大分子および小分子薬物の局所送達およびそれらのリプレッサーのサイレンシングは、末梢性、全身性および心臓の血管疾患に治療効果がある。

【０３５７】

挿入、例えば植え込みの方法は、場合によりかかる方法を変更することなしに、あるいは場合により軽微な変更のみを伴い、場合により他の種類の組織移植および／または挿入および／または組織採取に既に用いられているものであってもよい。かかる方法には、場合により、限定はされないが、小線源照射療法、生検、超音波を伴うおよび／または伴わない内視鏡検査、例えばＥＲＣＰ、脳組織への定位的方法、腹腔鏡検査、例えば関節、腹部器官、膀胱壁および体腔への腹腔鏡の植え込みが含まれる。

【０３５８】

ＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡ

ＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡはまた個別に送達されてもよい。ＣＲＩＳＰＲ酵素が発現する時間を与えるため、ＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡはガイドＲＮＡより先に送達され得る。ＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡはガイドＲＮＡ投与の１～１２時間前（好ましくは約２～６時間前）に投与され得る。

【０３５９】

あるいは、ＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡは共に投与することができる。有利には、ガイドＲＮＡの第２のブースター用量を、ＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡ＋ガイドＲＮＡの初回投与の１～１２時間後（好ましくは約２～６時間後）に投与することができる。

【０３６０】

最も効率的なゲノム改変レベルを達成するために、ＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡおよび／またはガイドＲＮＡのさらなる投与が有用であり得る。

【０３６１】

毒性およびオフターゲット効果を最小限に抑えるためには、送達されるＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡの濃度を制御することが重要となる。ＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡの最適濃度は、細胞または動物モデルで種々の濃度を試験し、ディープシーケンシングを使用して潜在的なオフターゲットゲノム遺伝子座における改変の程度を分析することにより決定し得る。例えば、ヒトゲノムのＥＭＸ１遺伝子の５’－ＧＡＧＴＣＣＧＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＡＡ－３’を標的化するガイド配列について、ディープシーケンシングを使用して以下の２つのオフターゲット遺伝子座、すなわち１：５’－ＧＡＧＴＣＣＴＡＧＣＡＧＧＡＧＡＡＧＡＡ－３’および２：５’－ＧＡＧＴＣＴＡＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＡＡ－３’における改変レベルを評価することができる。オフターゲット改変レベルを最小限に抑えながら最も高いオンターゲット改変レベルが得られる濃度をインビボ送達に選択するべきである。

【０３６２】

あるいは、毒性レベルおよびオフターゲット効果を最小限に抑えるため、ＣＲＩＳＰＲ酵素ニッカーゼｍＲＮＡ（例えばＤ１０Ａ突然変異を有する化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９）を目的の部位を標的化するガイドＲＮＡのペアと共に送達することができる。２つのガイドＲＮＡは以下のとおり隔てられていなければならない。それぞれ赤色（一重下線）および青色（二重下線）のガイド配列（これらの例は化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９のＰＡＭ要件に基づく）。

【０３６３】

【表３】

オーバーハング長さ(bp)	ガイドRNA設計(色分けしたガイド配列およびPAM)
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNN-3′
14	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNN-3′
13	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNN-3′
12	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNN-3′
11	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNN-3′
10	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNN-3′
9	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNN-3′
8	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNN-5′

【０３６４】

【表４】

	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
7	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
6	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
5	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
4	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
3	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
2	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
1	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
平滑末端	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
1	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
2	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
3	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
4	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′

【０３６５】

【表５】

5	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
6	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
7	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
8	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
12	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
13	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
14	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
15	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
16	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
	5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
17	3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′

【０３６６】

この系をさらに調べることにより、出願人らは５’オーバーハングのエビデンスを得ている（例えば、Ｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２０１３ Ｓｅｐ １２；１５４（６）：１３８０－９および２０１３年８月２８日に出願された米国仮特許出願第６１／８７１，３０１号明細書を参照のこと）。出願人らは、２つのガイドＲＮＡと組み合わせたときのＣａｓ９ニッカーゼ突然変異体による効率的な開裂に関連するパラメータをさらに同定しており、それらのパラメータには、限定はされないが５’オーバーハングの長さが含まれる。本発明の実施形態において５’オーバーハングは高々２００塩基対、好ましくは高々１００塩基対、またはより好ましくは高々５０塩基対である。本発明の実施形態において５’オーバーハングは少なくとも２６塩基対、好ましくは少なくとも３０塩基対またはより好ましくは３４～５０塩基対または１～３４塩基対である。本発明の他の好ましい方法では、第１のガイド配列が第１の標的配列の近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、かつ第２のガイド配列が第２の標的配列の近傍で他方の鎖の開裂を指向することにより、平滑末端または３’オーバーハングが生じる。本発明の実施形態において３’オーバーハングは高々１５０、１００または２５塩基対または少なくとも１５、１０または１塩基対である。好ましい実施形態において３’オーバーハングは１～１００塩基対である。

【０３６７】

本発明の態様は、遺伝子産物の発現を低下させること、または遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子にテンプレートポリヌクレオチドがさらに導入されること、または２つの５’オーバーハングをリアニーリングおよびライゲートさせることにより介在配列が正確に切り出されること、または遺伝子産物の活性または機能を変化させること、または遺伝子産物の発現を増加させることに関する。本発明のある実施形態において、遺伝子産物はタンパク質である。

【０３６８】

ガイド配列間に８ｂｐ未満のオーバーラップ（－８ｂｐより大きいオフセット）を有する５’オーバーハングを作り出すｓｇＲＮＡペアのみが、検出可能なインデル形成を媒介することが可能であった。重要なことには、これらのアッセイで使用される各ガイドは、野生型Ｃａｓ９とペアになるとインデルを効率的に誘導することが可能であり、二重ニッキング活性を予測する際にガイドペアの相対位置が最も重要なパラメータであることが示される。

【０３６９】

Ｃａｓ９ｎとＣａｓ９Ｈ８４０ＡとはＤＮＡの逆の鎖にニックを入れるため、所与のｓｇＲＮＡペアを有するＣａｓ９Ｈ８４０ＡによるＣａｓ９ｎの置換によってオーバーハング型の逆位が生じるはずである。例えば、Ｃａｓ９ｎで５’オーバーハングを生成し得るｓｇＲＮＡのペアは、原則的には代わりに対応する３’オーバーハングを生成するはずである。従って、Ｃａｓ９ｎで３’オーバーハングの生成を生じさせるｓｇＲＮＡペアを、Ｃａｓ９Ｈ８４０Ａで５’オーバーハングを生成するために使用し得る。予想外にも、本出願人らは、５’および３’オーバーハングの両方（オフセット範囲－２７８～＋５８ｂｐ）を生成するように設計された一組のｓｇＲＮＡペアでＣａｓ９Ｈ８４０Ａを試験したが、インデル形成を観察することはできなかった。Ｃａｓ９Ｈ８４０Ａによる二重ニッキングが可能となるようにｓｇＲＮＡペアを組み合わせるのに必要な設計基準を特定するには、さらなる研究が必要であり得る。

【０３７０】

肝臓、プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン９（ＰＣＳＫ９）

データは表現型の変換を示す。

【０３７１】

プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン９（ＰＣＳＫ９）はサブチリシンセリンプロテアーゼファミリーのメンバーである。ＰＣＳＫ９は主に肝臓により発現され、肝細胞ＬＤＬ受容体発現の下方制御に決定的に重要である。血漿中ＬＤＬ－Ｃレベルは、ＰＣＳＫ９の機能獲得型突然変異を有する人において極めて高く、それらの人は重度の高コレステロール血症を有するものとして分類される。従って、ＰＣＳＫ９はＣＲＩＳＰＲの魅力的な標的である。ＰＣＳ９Ｋを標的化するＣＲＩＳＰＲは、脂質粒子に製剤化し、例えば約１５、４５、９０、１５０、２５０および４００μｇ／ｋｇで静脈内投与されてもよい（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｌｎｙｌａｍ．ｃｏｍ／ｃａｐｅｌｌａ／ｗｐ－ｃｏｎｔｅｎｔ／ｕｐｌｏａｄｓ／２０１３／０８／ＡＬＮ－ＰＣＳ０２－００１－Ｐｒｏｔｏｃｏｌ－Ｌａｎｃｅｔ．ｐｄｆを参照のこと）。

【０３７２】

Ｂａｉｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ（Ｂｅｒｌ）．１９９９ Ｊａｎ；７７（１）：２４４－９）は、エキソビボ体細胞遺伝子治療によるインスリン送達を開示し、これには糖尿病患者から非Ｂ細胞体細胞（例えば線維芽細胞）を取り出すこと、およびそれらの細胞を、インスリンを産生し分泌するようにインビトロで遺伝的に変化させることが関わる。細胞は培養下で成長させて、インスリン補充源としてドナーに戻すことができる。このようにして改変された細胞は移植前に評価することができ、予備ストックは凍結保存され得る。患者自身の細胞を使用するため、この手順によれば免疫抑制が不要となり、組織供給の問題が解消される一方で、細胞破壊の繰り返しが回避されるはずである。エキソビボ体細胞遺伝子治療には、複数回の形質移入に適したかつ制御された増殖を起こし易い接触可能でかつロバストな細胞型が必要である。非Ｂ細胞体細胞の使用に関連す

る特別な問題としては、プロインスリンからインスリンへのプロセシング、ならびにグルコース刺激性プロインスリン生合成に対する感受性の付与および調節されたインスリン放出が挙げられる。線維芽細胞、下垂体細胞、腎臓（ＣＯＳ）細胞および卵巣（ＣＨＯ）細胞を使用した予備的研究からは、これらの課題に対処し得ること、およびエキソビボ体細胞遺伝子治療がインスリン補充療法の実現可能な手法を提供することが示唆される。Ｂａｉｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．のシステムは、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系の肝臓への送達に使用しおよび／または適合させることができる。

【０３７３】

Ｓａｔｏ　ｅｔ　ａｌ．の方法（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｖｏｌｕｍｅ　２６　Ｎｕｍｂｅｒ　４　Ａｐｒｉｌ　２００８，Ｐａｇｅｓ　４３１－４４２）は、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系の肝臓への送達に適用することができる。Ｓａｔｏ　ｅｔ　ａｌ．は、ｓｉＲＮＡを有するビタミンＡ結合リポソームによる治療が、本来致死性のジメチルニトロソアミンによって誘発された肝硬変を有するラットにおいて用量依存的および持続時間依存的に肝線維症をほぼ完全に消散させて生存期間を延長させたことを見出した。カチオン性脂質としてのＯ，Ｏ’－ジテトラデカノイル－Ｎ－（α－トリメチルアンモニオアセチル）ジエタノールアミンクロリド（ＤＣ－６－１４）と、コレステロールと、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンとを４：３：３のモル比（インビトロおよびインビボ遺伝子送達に関して血清添加条件下で高い形質移入効率が示されている）で含有するカチオン性リポソーム（Ｌｉｐｏｔｒｕｓｔ）が北海道システム・サイエンスから購入された。このリポソームは凍結乾燥させた空のリポソームの方法を用いて製造され、使用前に凍結乾燥脂質混合物に再蒸留水（ＤＤＷ）をボルテックス下で添加することにより１ｍＭ（ＤＣ－１６－４）の濃度で調製された。ＶＡ結合リポソームを調製するため、ＤＭＳＯ中に溶解した２００ｎｍｏｌのビタミンＡ（レチノール、Ｓｉｇｍａ）がリポソーム懸濁液（ＤＣ－１６－４として１００ｎｍｏｌ）と、１．５ｍｌチューブにおいて２５　１℃でボルテックスすることにより混合された。ｓｉＲＮＡｇｐ４６を有するＶＡ結合リポソーム（ＶＡ－ｌｉｐ－ｓｉＲＮＡｇｐ４６）を調製するため、ｓｉＲＮＡｇｐ４６の溶液（ＤＤＷ中５８０ｐｍｏｌ／ｍｌ）がレチノール結合リポソーム溶液に２５℃で撹拌しながら添加された。ｓｉＲＮＡとＤＣ－１６－４との比は１：１１．５（ｍｏｌ／ｍｏｌ）であり、ｓｉＲＮＡとリポソームとの比（ｗｔ／ｗｔ）は１：１であった。リポソームによって取り込まれなかった任意の遊離ビタミンＡまたはｓｉＲＮＡが、マイクロ分配システム（ＶＩＶＡＳＰＩＮ　２濃縮機　３０，０００ＭＷＣＯ　ＰＥＳ、ＶＩＶＡＳＣＩＥＮＣＥ）を使用してリポソーム調製物と分離された。リポソーム懸濁液がフィルターに添加され、２５　１℃において１，５００ｇで５分間、３回遠心された。画分が回収され、フィルターに捕捉された材料が、インビトロまたはインビボ使用に対する所望の用量に達するようにＰＢＳで再構成された。ラットに０．７５ｍｇ／ｋｇ　ｓｉＲＮＡの３回の注射が隔日で投与された。Ｓａｔｏ　ｅｔ　ａｌ．のシステムは、ヒトに対してＳａｔｏ　ｅｔ　ａｌ．により記載されるとおりリポソーム中約０．５～１ｍｇ／ｋｇのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ　ＲＮＡを送達することにより、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系の肝臓への送達に使用しおよび／または適合させることができる。

【０３７４】

インビトロおよびインビボの両方でｓｉＲＮＡを肝細胞に送達するためのビヒクルに関するＲｏｚｅｍａ　ｅｔ　ａｌ．の方法（ＰＮＡＳ，Ａｕｇｕｓｔ　７，２００７，ｖｏｌ．１０４，ｎｏ．３２）（Ｒｏｚｅｍａ　ｅｔ　ａｌ．がｓｉＲＮＡダイナミックポリコンジュゲートと命名しているもの）もまた本発明に適用することができる。このダイナミックポリコンジュゲート技術の重要な特徴としては膜作用性ポリマー、このポリマーの活性をそれがエンドソームの酸性環境に達するまで可逆的に遮蔽する能力、および単純な低圧静脈内注入後にインビボでこの改変ポリマーおよびそのｓｉＲＮＡカーゴを肝細胞に特異的に標的化させる能力が挙げられる。５’アミン改変ｓｉＲＮＡを１重量当量（ｗｔ　ｅｑ）のＮスクシンイミジル－Ｓ－アセチルチオアセテート（ＳＡＴＡ）試薬（Ｐｉｅｒｃｅ）および０．３６ｗｔ　ｅｑのＮａＨＣＯ$_3$と水中において４℃で１６時間反応さ

せることにより、ＳＡＴＡ改変ｓｉＲＮＡが合成される。次に９容積のエタノールを添加することにより改変ｓｉＲＮＡを沈殿させ、これが８０℃で２時間インキュベートされる。沈殿物が１×ｓｉＲＮＡ緩衝液（Ｄｈａｒｍａｃｏｎ）中に再懸濁され、２６０ｎｍ波長で吸光度を計測することにより定量化される。１．５ｗｔ％　ＳＭＰＴ（Ｐｉｅｒｃｅ）を添加することによりＰＢＡＶＥ（５ｍＭＴＡＰＳ、ｐＨ９中３０ｍｇ／ｍｌ）が改変される。１時間のインキュベーション後、５ｍＭ　ＴＡＰＳ（ｐＨ９）を含有する４００μｌの等張性グルコース溶液に０．８ｍｇのＳＭＰＴ－ＰＢＡＶＥが添加された。この溶液に５０μｇのＳＡＴＡ改変ｓｉＲＮＡが添加された。［ＰＢＡＶＥ］を一定とした用量反応実験について、種々の量のｓｉＲＮＡが添加される。次に混合物が１６時間インキュベートされる。次にこの溶液に、５．６ｍｇのＨｅｐｅｓ遊離塩基が添加され、続いて３．７ｍｇのＣＤＭ－ＮＡＧと１．９ｍｇのＣＤＭ－ＰＥＧとの混合物が添加される。次にこの溶液が室温で少なくとも１時間インキュベートされた後、注射される。ＣＤＭ－ＰＥＧおよびＣＤＭ－ＮＡＧは、塩化オキサリルを使用することにより生成される酸塩化物から合成される。この酸塩化物に１．１モル当量のポリエチレングリコールモノメチルエーテル（平均分子量４５０）を添加することによりＣＤＭ－ＰＥＧが生成され、または（アミノエトキシ）エトキシ－２－（アセチルアミノ）－２－デオキシ－β－Ｄ－グルコピラノシドを添加することによりＣＤＭ－ＮＡＧが生成される。最終生成物は、０．１％ＴＦＡ水／アセトニトリル勾配の逆相ＨＰＬＣを用いることにより精製される。約２５～５０μｇのｓｉＲＮＡがマウスに送達された。Ｒｏｚｅｍａ　ｅｔ　ａｌ．のシステムは、例えば、ヒトに対する送達について約５０～約２００ｍｇのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの投薬量を想定することにより、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系の肝臓への送達に適用することができる。

【０３７５】

骨

Ｏａｋｅｓ　ａｎｄ　Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ（Ｃｌｉｎ　Ｏｒｔｈｏｐ　Ｒｅｌａｔ　Ｒｅｓ．２０００　Ｏｃｔ；（３７９　Ｓｕｐｐｌ）：Ｓ１０１－１２）は、骨への遺伝子の送達を考察している。遺伝子を特定の解剖学的部位で細胞に移入させることにより、成長因子の骨誘導特性を生理学的用量で持続時間にわたり使用して、より有意な治癒反応を促進することができる。特定の解剖学的部位、骨質、および軟部組織エンベロープが、局部遺伝子治療の標的細胞の選択に影響する。骨誘導性担体で治療部位に送達される遺伝子治療ベクターが、有望な結果をもたらしている。複数の研究者が、動物モデルにおいてエキソビボおよびインビボ局部遺伝子治療を使用して面白い結果を示している。かかるシステムは、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系の骨への送達に使用しおよび／または適合させることができる。

【０３７６】

脳

脳に関する送達の選択肢としては、ＤＮＡまたはＲＮＡのいずれかの形態のＣＲＩＳＰＲ酵素およびガイドＲＮＡをリポソームに封入し、分子トロイの木馬にコンジュゲートして血液脳関門（ＢＢＢ）を通過させて送達することが含まれる。分子トロイの木馬は、Ｂ－ｇａｌ発現ベクターを非ヒト霊長類の脳に送達するのに有効であることが示されている。同じ手法を用いて、ＣＲＩＳＰＲ酵素とガイドＲＮＡとを含有するベクターを送達することができる。例えば、Ｘｉａ　ＣＦ　ａｎｄ　Ｂｏａｄｏ　ＲＪ，Ｐａｒｄｒｉｄｇｅ　ＷＭ（「アビジン－ビオチン技術を用いたヒトインスリン受容体を介するｓｉＲＮＡの抗体媒介性ターゲティング（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　ｏｆ　ｓｉＲＮＡ　ｖｉａ　ｔｈｅ　ｈｕｍａｎ　ｉｎｓｕｌｉｎ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｕｓｉｎｇ　ａｖｉｄｉｎ－ｂｉｏｔｉｎ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）」Ｍｏｌ　Ｐｈａｒｍ．２００９　Ｍａｙ－Ｊｕｎ；６（３）：７４７－５１．ｄｏｉ：１０．１０２１／ｍｐ８００１９４）は、受容体特異的モノクローナル抗体（ｍＡｂ）およびアビジン－ビオチン技術の併用によって、培養下、およびインビボでの細胞に対する低分子干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）の送達がどのように可能になるかを記載している。この著者らはまた、

標的化するｍＡｂとｓｉＲＮＡとの間の結合がアビジン－ビオチン技術で安定しており、標的化ｓｉＲＮＡの静脈内投与後にインビボで脳などの遠隔部位でのＲＮＡｉ効果が観察されることも報告する。

【０３７７】

Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．（Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２００３ Ｊａｎ；７（１）：１１－８））は、ヒトインスリン受容体（ＨＩＲ）に対するモノクローナル抗体（ＭＡｂ）によってインビボでアカゲザル脳に標的化させた、８５ｎｍペグ化免疫リポソームで構成される「人工ウイルス」の内部にルシフェラーゼなどのレポーターをコードする発現プラスミドがどのように封入されたかを記載している。ＨＩＲＭＡｂは、静脈注射後に、外来性遺伝子を担持するリポソームが血液脳関門にわたるトランスサイトーシスおよび神経細胞膜にわたるエンドサイトーシスを受けることを可能にする。脳におけるルシフェラーゼ遺伝子発現のレベルはラットと比較してアカゲザルにおいて５０倍高かった。霊長類脳におけるβ－ガラクトシダーゼ遺伝子の広範なニューロン発現が、組織化学および共焦点顕微鏡法の両方によって実証された。この著者らは、この手法によって２４時間で可逆的な成体トランスジェニックが実現可能になることを示している。従って、免疫リポソームの使用が好ましい。それらが抗体と併せて用いられることにより、特定の組織または細胞表面タンパク質が標的化される。

【０３７８】

ナノ粒子（Ｃｈｏ，Ｓ．，Ｇｏｌｄｂｅｒｇ，Ｍ．，Ｓｏｎ，Ｓ．，Ｘｕ，Ｑ．，Ｙａｎｇ，Ｆ．，Ｍｅｉ，Ｙ．，Ｂｏｇａｔｙｒｅｖ，Ｓ．，Ｌａｎｇｅｒ，Ｒ．ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｄ．，「低分子干渉ＲＮＡを内皮細胞に送達するための脂質様ナノ粒子（Ｌｉｐｉｄ－ｌｉｋｅ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｓｍａｌｌ ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ ＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｔｏ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ）」，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ，１９：３１１２－３１１８，２０１０）またはエキソソーム（Ｓｃｈｒｏｅｄｅｒ，Ａ．，Ｌｅｖｉｎｓ，Ｃ．，Ｃｏｒｔｅｚ，Ｃ．，Ｌａｎｇｅｒ，Ｒ．，ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｄ．，「ｓｉＲＮＡ送達用の脂質ベースのナノ治療薬（Ｌｉｐｉｄ－ｂａｓｅｄ ｎａｎｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ｆｏｒ ｓｉＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ）」，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２６７：９－２１，２０１０，ＰＭＩＤ：２００５９６４１）を介するなど、他の送達手段またはＲＮＡもまた好ましい。

【０３７９】

実際、エキソソームは、いくらかＣＲＩＳＰＲ系と似たところがある系であるｓｉＲＮＡの送達において特に有用であることが示されている。例えば、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ Ｓ，ｅｔ ａｌ．（「インビトロおよびインビボでのｓｉＲＮＡのエキソソーム媒介性送達（Ｅｘｏｓｏｍｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｓｉＲＮＡ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｎｄ ｉｎ ｖｉｖｏ）」Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１２ Ｄｅｃ；７（１２）：２１１２－２６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２０１２．１３１．電子出版２０１２年１１月１５日）は、如何にエキソソームが種々の生物学的関門を越える薬物送達に有望なツールであるか、およびそれをインビトロおよびインビボでのｓｉＲＮＡの送達に利用することができるかについて記載している。この著者らの手法は、発現ベクターの形質移入によって標的化エキソソームを生成することであり、ペプチドリガンドと融合したエキソソームタンパク質が含まれる。次にエキソソームが形質移入細胞上清から精製されて特徴付けられ、次にそのエキソソームにｓｉＲＮＡが負荷される。本発明に係る送達または投与をエキソソームで、詳細には限定はされないが脳に実施することができる。

【０３８０】

ビタミンＥ（α－トコフェロール）をＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓとコンジュゲートし、高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）と共に脳に送達することが、例えばＵｎｏ ｅｔ ａｌ．（ＨＵＭＡＮ ＧＥＮＥ ＴＨＥＲＡＰＹ ２２：７１１－７１９（Ｊｕｎｅ ２０１１））によって低分子干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）を脳に送達するために行われた方法と同様

に行われ得る。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）または遊離ＴｏｃｓｉＢＡＣＥもしくはＴｏｃ－ｓｉＢＡＣＥ／ＨＤＬが充填され、かつ脳注入キット３（Ａｌｚｅｔ）と接続された浸透圧ミニポンプ（モデル１００７Ｄ；Ａｌｚｅｔ、Ｃｕｐｅｒｔｉｎｏ、ＣＡ）を用いてマウスが注入された。脳注入カニューレは背側第三脳室に注入するため正中線上ブレグマの約０．５ｍｍ後側に留置された。Ｕｎｏ ｅｔ ａｌ．は、ＨＤＬを伴うＴｏｃ－ｓｉＲＮＡが３ｎｍｏｌ程の少なさで、同じＩＣＶ注入方法によるのと同程度の目標の低下を誘導し得ることを見出した。α－トコフェロールにコンジュゲートしかつ脳に標的化されるＨＤＬと共投与されるＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの同程度の投薬量が本発明においてヒトに対して企図されてもよく、例えば、脳に標的化される約３ｎｍｏｌ～約３μｍｏｌのＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓが企図され得る。

【０３８１】

Ｚｏｕ ｅｔ ａｌ．（（ＨＵＭＡＮ ＧＥＮＥ ＴＨＥＲＡＰＹ ２２：４６５－４７５（Ａｐｒｉｌ ２０１１））は、ラットの脊髄におけるインビボ遺伝子サイレンシングのためのＰＫＣγを標的化するショートヘアピンＲＮＡのレンチウイルス媒介性送達方法を記載している。Ｚｏｕ ｅｔ ａｌ．は、髄腔内カテーテルによって１×１０^{9}形質導入単位（ＴＵ）／ｍｌの力価を有する約１０μｌの組換えレンチウイルスを投与した。脳に標的化されるレンチウイルスベクターで発現するＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの同程度の投薬量が本発明においてヒトに対して企図され得る、例えば、１×１０^{9}形質導入単位（ＴＵ）／ｍｌの力価を有するレンチウイルスにおける脳に標的化される約１０～５０ｍｌのＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓが企図され得る。

【０３８２】

標的欠失、治療適用

遺伝子の標的欠失が好ましい。例を実施例１８に示す。従って、数ある障害の中でも特に、コレステロール生合成、脂肪酸生合成、および他の代謝疾患に関与する遺伝子、アミロイド病および他の疾患に関与する誤って折り畳まれたタンパク質をコードする遺伝子、細胞形質転換を生じさせる癌遺伝子、潜伏ウイルス遺伝子、およびドミナントネガティブな障害を生じさせる遺伝子が好ましい。ここで例示するとおり、本出願人らによれば、ウイルスまたはナノ粒子のいずれかの送達系を使用した、代謝疾患、アミロイドーシスおよびタンパク質凝集関連疾患、遺伝子突然変異および転座によって生じる細胞形質転換、遺伝子突然変異のドミナントネガティブ効果、潜伏ウイルス感染症、および他の関連症状に罹患している必要性がある対象または患者の肝臓、脳、眼、上皮、造血、または別の組織に対するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の遺伝子送達が好ましい。

【０３８３】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の治療適用としては、緑内障、アミロイドーシス、およびハンチントン病が挙げられる。これらは実施例２０に例示し、そこに記載される特徴は単独で、または組み合わせで、好ましい。

【０３８４】

本発明によって治療し得るポリグルタミン伸長病の別の例としては、脊髄小脳失調症１型（ＳＣＡ１）が挙げられる。低分子ヘアピンＲＮＡを発現する組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターが小脳内注入されると、運動協調性が大きく改善し、小脳形態が回復し、かつＳＣＡ１マウスのプルキンエ細胞における特徴的なアタキシン－１封入体が消散する（例えば、Ｘｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｖｏｌ．１０，Ｎｏ．８，Ａｕｇ．２００４を参照のこと）。詳細には、ＡＡＶ１およびＡＡＶ５ベクターが好ましく、約１×１０^{12}ベクターゲノム／ｍｌのＡＡＶ力価が望ましい。

【０３８５】

例として、ＨＩＶ－１による慢性感染症が治療または予防され得る。これを達成するため、有効範囲および有効性を最大化するようにＨＩＶ－１株変異体を考慮しながら、大多数のＨＩＶ－１ゲノムを標的化するＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓガイドＲＮＡを作成し得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の送達は、従来どおり宿主免疫系のアデノウイルスまたはレンチウイルス媒介性感染により達成し得る。手法に応じて、宿主免疫細胞は、ａ）単離され、Ｃ

ＲＩＳＰＲ－Ｃａｓが形質導入され、選択され、および宿主に再導入されてもよく、またはｂ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の全身送達によりインビボで形質導入されてもよい。第１の手法は、抵抗性免疫集団の作成を可能にする一方、第２の手法は宿主内の潜伏ウイルスリザーバを標的化する傾向が強い。これは実施例の節でさらに詳細に考察する。

【０３８６】

別の例において、Ｓａｎｇａｍｏ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願公開第２０１３０１７１７３２号明細書は、ゲノムへの抗ＨＩＶ導入遺伝子の挿入に関し、この方法は本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適用し得る。別の実施形態において、ＣＸＣＲ４遺伝子が標的化されてもよく、Ｓａｎｇａｍｏ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願公開第２０１００２９１０４８号明細書のＴＡＬＥ系を、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に合わせて改良し得る。Ｓａｎｇａｍｏ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願公開第２０１３０１３７１０４号明細書および同第２０１３０１２２５９１号明細書ならびにＣｅｌｌｅｃｔｉｓに譲渡された米国特許出願公開第２０１００１４６６５１号明細書の方法は、遺伝子改変頻度を増加させるためのヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ）遺伝子座の改変に関するため、導入遺伝子の発現にさらに一般的に適用可能であり得る。

【０３８７】

また、本発明が遺伝子ノックアウト細胞ライブラリを作成することも想定される。各細胞が単一遺伝子のノックアウトを有し得る。これは実施例２３に例示する。

【０３８８】

ＥＳ細胞のライブラリを作製してもよく、ここでは各細胞が単一遺伝子のノックアウトを有し、かつＥＳ細胞のライブラリ全体はその中のあらゆる遺伝子が一つ一つノックアウトされている。このライブラリは、細胞プロセスならびに疾患における遺伝子機能のスクリーニングに有用である。この細胞ライブラリを作製するには、誘導性プロモーター（例えばドキシサイクリン誘導性プロモーター）によりドライブされるＣａｓ９をＥＳ細胞にインテグレートし得る。加えて、特異的遺伝子を標的化する単一のガイドＲＮＡをＥＳ細胞にインテグレートし得る。ＥＳ細胞ライブラリを作製するには、単純に、ヒトゲノムにおける各遺伝子を標的化するガイドＲＮＡをコードする遺伝子のライブラリとＥＳ細胞を混合し得る。初めに単一のＢｘＢ１　ａｔｔＢ部位をヒトＥＳ細胞のＡＡＶＳ１遺伝子座に導入し得る。次にＢｘＢ１インテグラーゼを使用してＡＡＶＳ１遺伝子座のＢｘＢ１　ａｔｔＢ部位に対する個々のガイドＲＮＡ遺伝子のインテグレーションを促進し得る。インテグレーションを促進するため、各ガイドＲＮＡ遺伝子が、単一のａｔｔＰ部位を担持するプラスミド上に含まれてもよい。このようにしてＢｘＢ１がゲノムのａｔｔＢ部位をガイドＲＮＡ含有プラスミド上のａｔｔＰ部位と組み換え得る。細胞ライブラリを作成するため、インテグレートされた単一のガイドＲＮＡを有しかつＣａｓ９発現を誘導する細胞のライブラリを取り得る。誘導後、ガイドＲＮＡによって指定された部位でＣａｓ９が二本鎖切断を媒介する。

【０３８９】

タンパク質治療薬の慢性投与は、特異的タンパク質に対する許容し難い免疫応答を誘発し得る。タンパク質薬物の免疫原性は、いくつかの免疫優性ヘルパーＴリンパ球（ＨＴＬ）エピトープに起因し得る。これらのタンパク質内に含まれるこれらのＨＴＬエピトープのＭＨＣ結合親和性を低下させると、免疫原性がより低い薬物を作成することができる（Ｔａｎｇｒｉ　Ｓ，ｅｔ　ａｌ．（「免疫原性が低い合理的にエンジニアリングされた治療用タンパク質（Ｒａｔｉｏｎａｌｌｙ　ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｗｉｔｈ　ｒｅｄｕｃｅｄ　ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｉｃｉｔｙ）」Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００５　Ｍａｒ　１５；１７４（６）：３１８７－９６）。本発明では、ＣＲＩＳＰＲ酵素の免疫原性は、詳細には、初めにＴａｎｇｒｉ　ｅｔ　ａｌにおいてエリスロポエチンに関連して示され、続いて展開された手法に従い低下させることができる。従って、定向進化または合理的設計を使用して、宿主種（ヒトまたは他の種）

におけるＣＲＩＳＰＲ酵素（例えばＣａ９）の免疫原性を低下させることができる。
【０３９０】
実施例２８において、本出願人らは３つの目的とするガイドＲＮＡを使用し、ごく一部の細胞においてのみ起こるインビボでの効率的なＤＮＡ開裂を可視化することができた。本質的に、本出願人らがここで示しているものは、標的化したインビボ開裂である。詳細にはこれは、哺乳動物などの高等生物における特異的標的化もまた達成し得るという概念実証を提供する。またこれは、複数のガイド配列（すなわち別個の標的）を（共送達という意味で）同時に使用することができる点で多重的側面も強調する。換言すれば、本出願人らは、いくつかの異なる配列が同時に、しかし独立して標的化される、多重的手法を使用した。
【０３９１】
本発明の好ましいベクターであるＡＡＶの作製プロトコルの好適な例を、実施例３４に提供する。
【０３９２】
トリヌクレオチドリピート障害は、治療するのに好ましい病態である。これらもまた本明細書において例示する。
【０３９３】
例えば、米国特許出願公開第２０１１００１６５４０号明細書は、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用したトリヌクレオチドリピート伸長障害に関連する細胞、動物およびタンパク質の遺伝子改変を記載する。トリヌクレオチドリピート伸長障害は、発生神経生物学が関与しかつ多くの場合に認知ならびに感覚運動機能に影響を及ぼす複合的な進行性障害である。
【０３９４】
トリヌクレオチドリピート伸長タンパク質は、トリヌクレオチドリピート伸長障害の発症に対する感受性、トリヌクレオチドリピート伸長障害の存在、トリヌクレオチドリピート伸長障害の重症度またはそれらの任意の組み合わせに関連する多様な一組のタンパク質である。トリヌクレオチドリピート伸長障害は、リピートのタイプにより決定される２つの種類に分けられる。最も一般的なリピートはトリプレットＣＡＧであり、これは、遺伝子のコード領域に存在するとき、アミノ酸グルタミン（Ｑ）をコードするものである。従って、これらの障害はポリグルタミン（ｐｏｌｙＱ）障害と称され、以下の疾患を含む：ハンチントン病（ＨＤ）；球脊髄性筋萎縮症（ＳＢＭＡ）；脊髄小脳失調症（ＳＣＡ１型、２型、３型、６型、７型、および１７型）；および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（ＤＲＰＬＡ）。残りのトリヌクレオチドリピート伸長障害はＣＡＧトリプレットが関与しないか、あるいはＣＡＧトリプレットが遺伝子のコード領域になく、従って非ポリグルタミン障害と称される。非ポリグルタミン障害には、脆弱Ｘ症候群（ＦＲＡＸＡ）；脆弱ＸＥ精神遅滞（ＦＲＡＸＥ）；フリードライヒ失調症（ＦＲＤＡ）；筋強直性ジストロフィー（ＤＭ）；および脊髄小脳失調症（ＳＣＡ８型、および１２型）が含まれる。
【０３９５】
トリヌクレオチドリピート伸長障害に関連するタンパク質は、典型的には、トリヌクレオチドリピート伸長障害に関連するタンパク質とトリヌクレオチドリピート伸長障害との実験的関連性に基づき選択される。例えば、トリヌクレオチドリピート伸長障害を有する集団では、トリヌクレオチドリピート伸長障害を有しない集団と比べてトリヌクレオチドリピート伸長障害に関連するタンパク質の産生速度または循環中濃度が上昇しまたは低下し得る。タンパク質レベルの差は、限定はされないが、ウエスタンブロット、免疫組織化学染色、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、および質量分析を含むプロテオミクス技術を用いて評価し得る。あるいは、トリヌクレオチドリピート伸長障害に関連するタンパク質は、限定はされないが、ＤＮＡマイクロアレイ解析、遺伝子発現連鎖解析（ＳＡＧＥ）、および定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Ｑ－ＰＣＲ）を含むゲノム技術を用いて、それらのタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子発現プロファイルを得ることにより同定され得る。

【０３９６】
トリヌクレオチドリピート伸長障害に関連するタンパク質の非限定的な例としては、ＡＲ（アンドロゲン受容体）、ＦＭＲ１（脆弱Ｘ精神遅滞１）、ＨＴＴ（ハンチンチン）、ＤＭＰＫ（筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ）、ＦＸＮ（フラタキシン）、ＡＴＸＮ２（アタキシン２）、ＡＴＮ１（アトロフィン１）、ＦＥＮ１（フラップ構造特異的エンドヌクレアーゼ１）、ＴＮＲＣ６Ａ（トリヌクレオチドリピート含有６Ａ）、ＰＡＢＰＮ１（ポリ（Ａ）結合タンパク質、核１）、ＪＰＨ３（ジャンクトフィリン３）、ＭＥＤ１５（メディエーター複合体サブユニット１５）、ＡＴＸＮ１（アタキシン１）、ＡＴＸＮ３（アタキシン３）、ＴＢＰ（ＴＡＴＡボックス結合タンパク質）、ＣＡＣＮＡ１Ａ（カルシウムチャネル、電位依存性、Ｐ／Ｑ型、α１Ａサブユニット）、ＡＴＸＮ８０Ｓ（ＡＴＸＮ８逆鎖（非タンパク質コード））、ＰＰＰ２Ｒ２Ｂ（タンパク質ホスファターゼ２、調節性サブユニットＢ、β）、ＡＴＸＮ７（アタキシン７）、ＴＮＲＣ６Ｂ（トリヌクレオチドリピート含有６Ｂ）、ＴＮＲＣ６Ｃ（トリヌクレオチドリピート含有６Ｃ）、ＣＥＬＦ３（ＣＵＧＢＰ、Ｅｌａｖ様ファミリーメンバー３）、ＭＡＢ２１Ｌ１（ｍａｂ－２１様１（Ｃ．エレガンス（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ））、ＭＳＨ２（ｍｕｔＳホモログ２、結腸癌、非ポリポーシス１型（大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））、ＴＭＥＭ１８５Ａ（膜貫通タンパク質１８５Ａ）、ＳＩＸ５（ＳＩＸホメオボックス５）、ＣＮＰＹ３（キャノピー３ホモログ（ゼブラフィッシュ））、ＦＲＡＸＥ（脆弱部位、葉酸型、まれ、ｆｒａ（Ｘ）（ｑ２８）Ｅ）、ＧＮＢ２（グアニンヌクレオチド結合タンパク質（Ｇタンパク質）、βポリペプチド２）、ＲＰＬ１４（リボソームタンパク質Ｌ１４）、ＡＴＸＮ８（アタキシン８）、ＩＮＳＲ（インスリン受容体）、ＴＴＲ（トランスサイレチン）、ＥＰ４００（Ｅ１Ａ結合タンパク質ｐ４００）、ＧＩＧＹＦ２（ＧＲＢ１０相互作用ＧＹＦタンパク質２）、ＯＧＧ１（８－オキソグアニンＤＮＡグリコシラーゼ）、ＳＴＣ１（スタニオカルシン１）、ＣＮＤＰ１（カルノシンジペプチダーゼ１（メタロペプチダーゼＭ２０ファミリー））、Ｃ１０ｏｒｆ２（染色体１０オープンリーディングフレーム２）、ＭＡＭＬ３マスターマインド様３（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））、ＤＫＣ１（先天性角化異常症１、ジスケリン）、ＰＡＸＩＰ１（ＰＡＸ（転写活性化ドメインとの）相互作用タンパク質１）、ＣＡＳＫ（カルシウム／カルモジュリン依存性セリンプロテインキナーゼ（ＭＡＧＵＫファミリー））、ＭＡＰＴ（微小管結合タンパク質τ）、ＳＰ１（Ｓｐ１転写因子）、ＰＯＬＧ（ポリメラーゼ（ＤＮＡ指向性）、γ）、ＡＦＦ２（ＡＦ４／ＦＭＲ２ファミリー、メンバー２）、ＴＨＢＳ１（トロンボスポンジン１）、ＴＰ５３（腫瘍タンパク質ｐ５３）、ＥＳＲ１（エストロゲン受容体１）、ＣＧＧＢＰ１（ＣＧＧトリプレットリピート結合タンパク質１）、ＡＢＴ１（基礎転写のアクチベータ１）、ＫＬＫ３（カリクレイン関連ペプチダーゼ３）、ＰＲＮＰ（プリオンタンパク質）、ＪＵＮ（ｊｕｎ癌遺伝子）、ＫＣＮＮ３（カリウム中間体／小コンダクタンスカルシウム活性化チャネル、サブファミリーＮ、メンバー３）、ＢＡＸ（ＢＣＬ２関連Ｘタンパク質）、ＦＲＡＸＡ（脆弱部位、葉酸型、まれ、ｆｒａ（Ｘ）（ｑ２７．３）Ａ（巨精巣症、精神遅滞））、ＫＢＴＢＤ１０（ケルヒリピートおよびＢＴＢ（ＰＯＺ）ドメイン含有１０）、ＭＢＮＬ１（マッスルブラインド様（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））、ＲＡＤ５１（ＲＡＤ５１ホモログ（ＲｅｃＡホモログ、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））（Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ））、ＮＣＯＡ３（核内受容体コアクチベーター３）、ＥＲＤＡ１（伸長リピートドメイン、ＣＡＧ／ＣＴＧ １）、ＴＳＣ１（結節性硬化症１）、ＣＯＭＰ（軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質）、ＧＣＬＣ（グルタミン酸－システインリガーゼ、触媒サブユニット）、ＲＲＡＤ（糖尿病に付随するＲａｓ関連）、ＭＳＨ３（ｍｕｔＳホモログ３（大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））、ＤＲＤ２（ドーパミン受容体Ｄ２）、ＣＤ４４（ＣＤ４４分子（インド人血液型））、ＣＴＣＦ（ＣＣＣＴＣ結合因子（ジンクフィンガータンパク質））、ＣＣＮＤ１（サイクリンＤ１）、ＣＬＳＰＮ（クラスピンホモログ（アフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ ｌａｅｖｉｓ））、ＭＥＦ２Ａ（筋細胞エンハンサー因子２Ａ）、ＰＴＰＲＵ（タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体型、Ｕ）、ＧＡＰＤＨ（グリセルアルデヒド－３－リン酸

デヒドロゲナーゼ）、ＴＲＩＭ２２（トリパルタイトモチーフ含有２２）、ＷＴ１（ウィルムス腫瘍１）、ＡＨＲ（アリール炭化水素受容体）、ＧＰＸ１（グルタチオンペルオキシダーゼ１）、ＴＰＭＴ（チオプリンＳ－メチルトランスフェラーゼ）、ＮＤＰ（ノリエ病（偽膠腫））、ＡＲＸ（アリスタレス関連ホメオボックス）、ＭＵＳ８１（ＭＵＳ８１エンドヌクレアーゼホモログ（Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ））、ＴＹＲ（チロシナーゼ（眼皮膚白皮症ＩＡ））、ＥＧＲ１（初期増殖応答１）、ＵＮＧ（ウラシル－ＤＮＡグリコシラーゼ）、ＮＵＭＢＬ（ｎｕｍｂホモログ（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））様）、ＦＡＢＰ２（脂肪酸結合タンパク質２、腸）、ＥＮ２（エングレイルドホメオボックス２）、ＣＲＹＧＣ（クリスタリン、γＣ）、ＳＲＰ１４（シグナル認識粒子１４ｋＤａ（相同Ａｌｕ　ＲＮＡ結合タンパク質））、ＣＲＹＧＢ（クリスタリン、γＢ）、ＰＤＣＤ１（プログラム細胞死１）、ＨＯＸＡ１（ホメオボックスＡ１）、ＡＴＸＮ２Ｌ（アタキシン２様）、ＰＭＳ２（ＰＭＳ２減数分裂後分離増加型２（Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ））、ＧＬＡ（ガラクトシダーゼ、α）、ＣＢＬ（Ｃａｓ－Ｂｒ－Ｍ（マウス）エコトロピックレトロウイルス形質転換配列）、ＦＴＨ１（フェリチン、ヘビーポリペプチド１）、ＩＬ１２ＲＢ２（インターロイキン１２受容体、β２）、ＯＴＸ２（オルトデンティクルホメオボックス２）、ＨＯＸＡ５（ホメオボックスＡ５）、ＰＯＬＧ２（ポリメラーゼ（ＤＮＡ指向性）、γ２、アクセサリーサブユニット）、ＤＬＸ２（ディスタルレスホメオボックス２）、ＳＩＲＰＡ（シグナル調節タンパク質α）、ＯＴＸ１（オルトデンティクルホメオボックス１）、ＡＨＲＲ（アリール炭化水素受容体リプレッサー）、ＭＡＮＦ（中脳星状細胞由来神経栄養因子）、ＴＭＥＭ１５８（膜貫通タンパク質１５８（遺伝子／偽遺伝子））、およびＥＮＳＧ０００００００７８６８７が挙げられる。

【０３９７】

トリヌクレオチドリピート伸長障害に関連するタンパク質の好ましいものとしては、ＨＴＴ（ハンチンチン）、ＡＲ（アンドロゲン受容体）、ＦＸＮ（フラタキシン）、Ａｔｘｎ３（アタキシン）、Ａｔｘｎ１（アタキシン）、Ａｔｘｎ２（アタキシン）、Ａｔｘｎ７（アタキシン）、Ａｔｘｎ１０（アタキシン）、ＤＭＰＫ（筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ）、Ａｔｎ１（アトロフィン１）、ＣＢＰ（ＣＲＥＢ結合タンパク質）、ＶＬＤＬＲ（超低密度リポタンパク質受容体）、およびそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【０３９８】

別の態様によれば、ＣＦＴＲ遺伝子に突然変異を有する対象を治療するための遺伝子治療方法が提供され、これは、治療有効量のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子治療粒子を、場合により生体適合性医薬担体を介して、対象の細胞に投与することを含む。好ましくは、標的ＤＮＡは突然変異ΔＦ５０８を含む。一般に、突然変異が野生型に修復されることが好ましい。この場合、突然変異は、５０８位にフェニルアラニン（Ｆ）のコドンを含む3つのヌクレオチドの欠失である。従って、この場合における修復は、欠損したコドンを突然変異体に再導入することが必要である。

【０３９９】

この遺伝子修復戦略を実現するため、宿主細胞、細胞または患者にアデノウイルス／ＡＡＶベクター系が導入されることが好ましい。好ましくは、この系は、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９ニッカーゼ）およびガイドＲＮＡを、Ｆ５０８残基を含有する相同性修復テンプレートを含むアデノウイルス／ＡＡＶベクター系と共に含む。これは、先に考察した送達方法の一つによって対象に導入され得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系はＣＦＴＲΔ５０８キメラガイドＲＮＡによりガイドされ得る。これは、ニックを入れられまたは開裂されるＣＦＴＲゲノム遺伝子座の特定の部位を標的にする。開裂後、修復テンプレートは、嚢胞性線維症をもたらしまたは嚢胞性線維症関連症状を引き起こす欠失を補修する相同組換えによって開裂部位に挿入される。適切なガイドＲＮＡでＣＲＩＳＰＲ系の送達を導きその全身的な導入をもたらすこの戦略を用いて遺伝子突然変異を標的化することにより、表Ｂにあるような代謝、肝臓、腎臓およびタンパク質の疾患および障害を引き起こす遺伝子を編

集しまたは他の形で操作することができる。
【０４００】
ゲノム編集
本発明のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系を使用して、これまでＴＡＬＥＮおよびＺＦＮを使用して試みられたが成功は限られていた遺伝子突然変異を補修することができる。例えば、デューク大学（Ｄｕｋｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ）の公開出願である国際公開第２０１３１６３６２８　Ａ２号パンフレット、「変異遺伝子の遺伝子補修（Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｃｏｒｒｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｍｕｔａｔｅｄ　Ｇｅｎｅｓ）」は、例えば、ジストロフィン遺伝子の突然変異に起因して筋肉変性を生じる劣性遺伝の致死性Ｘ連鎖性障害であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー（「ＤＭＤ」）に関与するものなど、ヌクレアーゼ媒介性非相同末端結合で補修することのできる未成熟終止コドンおよびトランケート遺伝子産物を生じさせるフレームシフト突然変異を補修する試みを記載している。ＤＭＤを引き起こすジストロフィン突然変異の大多数はエクソンの欠失であり、これがリーディングフレームを破壊し、ジストロフィン遺伝子の中途での翻訳終結を引き起こす。ジストロフィンは、筋細胞の完全性および機能の調節に関与する細胞膜のジストログリカン複合体に構造的安定性をもたらす細胞質タンパク質である。本明細書で同義的に使用されるとおりのジストロフィン遺伝子または「ＤＭＤ遺伝子」は、２．２メガベースで、遺伝子座Ｘｐ２１にある。一次転写は約２，４００ｋｂあり、成熟ｍＲＮＡは約１４ｋｂである。７９個のエクソンがタンパク質をコードし、このタンパク質は３５００アミノ酸を上回る。多くの場合にＤＭＤ患者においてフレーム破壊型欠失にエクソン５１が隣接し、これはオリゴヌクレオチドベースのエクソンスキッピングに関する臨床試験において標的化されている。エクソン５１スキッピング化合物エテプリルセンに関する臨床試験は、最近になって、４８週間にわたる有意な機能上の利益を報告しており、ベースラインと比較して平均４７％のジストロフィン陽性線維であった。エクソン５１の突然変異は、理想的にはＮＨＥＪベースのゲノム編集による永久的な補修に適している。
【０４０１】
ヒトジストロフィン遺伝子（ＤＭＤ）から標的配列を開裂するメガヌクレアーゼ変異体に関する方法である、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓに譲渡された米国特許出願公開第２０１３０１４５４８７号明細書の方法もまた、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に合わせて改良することができる。
【０４０２】
血液
本発明はまた、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を血液に送達することも企図する。
【０４０３】
Ｗａｈｌｇｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．の血漿エキソソーム（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１２，Ｖｏｌ．４０，Ｎｏ．１７　ｅ１３０）が以前記載されており、これを利用してＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系を血液に送達し得る。
【０４０４】
本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系は、異常ヘモグロビン症、例えばサラセミアおよび鎌状赤血球症を治療することも企図される。例えば、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系により標的化し得る潜在的標的については、国際公開第２０１３／１２６７９４号パンフレットを参照のこと。
【０４０５】
Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓに譲渡された米国特許出願公開第２０１１０２２５６６４号明細書、同第２０１１００９１４４１号明細書、同第２０１００２２９２５２号明細書、同第２００９０２７１８８１号明細書および同第２００９０２２２９３７号明細書は、ＣＲＥＩ変異体に関し、ここでは２つのＩ－ＣｒｅＩ単量体のうちの少なくとも一方が、Ｉ－ＣｒｅＩのそれぞれ２６位～４０位および４４位～７７位に位置するＬＡＧＬＩＤＡＤＧコアドメインの２つの機能性サブドメインの各々に１つずつ、少なくとも２つの置換を有し、前記変異体は、共通サイトカイン受容体γ鎖遺伝子またはγＣ遺伝子とも呼ばれるヒトイ

ンターロイキン－２受容体γ鎖（ＩＬ２ＲＧ）遺伝子からＤＮＡ標的配列を開裂することができる。米国特許出願公開第２０１１０２２５６６４号明細書、同第２０１１００９１４４１号明細書、同第２０１００２２９２５２号明細書、同第２００９０２７１８８１号明細書および同第２００９０２２２９３７号明細書で同定される標的配列を、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に利用することができる。

【０４０６】

重症複合型免疫不全症（ＳＣＩＤ）は、リンパ球Ｂの機能的欠陥に常に関連したリンパ球Ｔ成熟の欠陥により生じる（Ｃａｖａｚｚａｎａ－Ｃａｌｖｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２００５，５６，５８５－６０２；Ｆｉｓｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．，２００５，２０３，９８－１０９）。全発生率は出生７万５０００人につき１人と推定される。未治療のＳＣＩＤ患者は複数の日和見微生物感染を起こし易く、概して１年を超えて生きることはない。ＳＣＩＤは、家族ドナーからの同種造血幹細胞移植により治療することができる。ドナーとの組織適合性は幅広く異なり得る。ＳＣＩＤ形態の一つであるアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）欠損症の場合、患者は組換えアデノシンデアミナーゼ酵素を注入することにより治療され得る。

【０４０７】

ＡＤＡ遺伝子がＳＣＩＤ患者で突然変異することが示されて以来（Ｇｉｂｌｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ，１９７２，２，１０６７－１０６９）、ＳＣＩＤに関与するいくつかの他の遺伝子が同定されている（Ｃａｖａｚｚａｎａ－Ｃａｌｖｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２００５，５６，５８５－６０２；Ｆｉｓｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．，２００５，２０３，９８－１０９）。ＳＣＩＤには４つの主要な原因がある：（ｉ）最も高頻度の形態のＳＣＩＤ、ＳＣＩＤ－Ｘ１（Ｘ連鎖ＳＣＩＤまたはＸ－ＳＣＩＤ）は、ＩＬ２ＲＧ遺伝子の突然変異により引き起こされ、成熟Ｔリンパ球およびＮＫ細胞が存在しなくなる。ＩＬ２ＲＧは、少なくとも５つのインターロイキン受容体複合体に共通する成分であるγＣタンパク質をコードする（Ｎｏｇｕｃｈｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１９９３，７３，１４７－１５７）。これらの受容体はＪＡＫ３キナーゼを介していくつかの標的を活性化し（Ｍａｃｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１９９５，３７７，６５－６８）、このＪＡＫ３キナーゼの不活性化はγＣ不活性化と同じ症候群をもたらす；（ｉｉ）ＡＤＡ遺伝子の突然変異は、リンパ球前駆細胞にとって致死的なプリン代謝の欠損をもたらし、ひいてはＢ、ＴおよびＮＫ細胞の擬似的欠如がもたらされる；（ｉｉｉ）Ｖ（Ｄ）Ｊ組換えは、免疫グロブリンおよびＴリンパ球受容体（ＴＣＲ）の成熟に必須のステップである。このプロセスに関与する３つの遺伝子である組換え活性化遺伝子１および２（ＲＡＧ１およびＲＡＧ２）およびＡｒｔｅｍｉｓの突然変異は、成熟ＴおよびＢリンパ球の欠如をもたらす；および（ｉｖ）ＣＤ４５など、Ｔ細胞特異的シグナル伝達に関与する他の遺伝子の突然変異もまた報告されているが、それらは少数例に相当する（Ｃａｖａｚｚａｎａ－Ｃａｌｖｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２００５，５６，５８５－６０２；Ｆｉｓｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．，２００５，２０３，９８－１０９）。

【０４０８】

その遺伝的基礎が特定されて以来、主に２つの理由で種々のＳＣＩＤ形態が遺伝子治療手法のパラダイムとなってきた（Ｆｉｓｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．，２００５，２０３，９８－１０９）。第一に、あらゆる血液疾患と同様に、エキソビボ治療を想定することができる。造血幹細胞（ＨＳＣ）は骨髄から回収し、数回の細胞分裂にわたりその多能性特性を保つことができる。従って、ＨＳＣはインビトロで処理し、次に患者に再注入することができ、ここでＨＳＣは骨髄で再増殖する。第二に、ＳＣＩＤ患者ではリンパ球の成熟が損なわれているため、補修された細胞が選択的な優位性を有する。従って、少数の補修された細胞が機能性の免疫系を回復することができる。この仮説は、（ｉ）ＳＣＩＤ患者における突然変異の復帰に伴う免疫機能の部分的回復（Ｈｉｒｓｃｈｈｏｒｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．，１９９６，１３，２９０－２９５；Ｓｔｅｐｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．，１９９６，３３５，

１５６３－１５６７；Ｂｏｕｓｓｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．，Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，２０００，９７，２７４－２７８；Ｗａｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，２００１，９８，８６９７－８７０２；Ｎｉｓｈｉｋｏｍｏｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２００４，１０３，４５６５－４５７２）、（ｉｉ）造血細胞におけるインビトロでのＳＣＩＤ－Ｘ１欠損の補修（Ｃａｎｄｏｔｔｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１９９６，８７，３０９７－３１０２；Ｃａｖａｚｚａｎａ－Ｃａｌｖｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１９９６，Ｂｌｏｏｄ，８８，３９０１－３９０９；Ｔａｙｌｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１９９６，８７，３１０３－３１０７；Ｈａｃｅｉｎ－Ｂｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１９９８，９２，４０９０－４０９７）、（ｉｉｉ）動物モデルにおけるインビボでのＳＣＩＤ－Ｘ１（Ｓｏｕｄａｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２０００，９５，３０７１－３０７７；Ｔｓａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２００２，１００，７２－７９）、ＪＡＫ－３（Ｂｕｎｔｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．，１９９８，４，５８－６４；Ｂｕｎｔｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，２０００，１１，２３５３－２３６４）およびＲＡＧ２（Ｙａｔｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，２００２，１００，３９４２－３９４９）欠損の補修により、および（ｉｖ）遺伝子治療臨床試験の結果により（Ｃａｖａｚｚａｎａ－Ｃａｌｖｏ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２０００，２８８，６６９－６７２；Ａｉｕｔｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．，２００２；８，４２３－４２５；Ｇａｓｐａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ，２００４，３６４，２１８１－２１８７）何度も検証されている。

【０４０９】

Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ＣｏｒｐｏｒａｔｉｏｎおよびＰｒｅｓｉｄｅｎｔ ａｎｄ Ｆｅｌｌｏｗｓ ｏｆ Ｈａｒｖａｒｄ Ｃｏｌｌｅｇｅに譲渡された米国特許出願公開第２０１１０１８２８６７号明細書は、ＲＮＡｉおよび抗体などの、ＢＣＬ１１Ａ発現または活性の阻害薬によって造血前駆細胞における胎児ヘモグロビン発現（ＨｂＦ）を調節する方法および使用に関する。米国特許出願公開第２０１１０１８２８６７号明細書に開示される標的、例えばＢＣＬ１１Ａは、胎児ヘモグロビン発現を調節するため本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系により標的化し得る。さらなるＢＣＬ１１Ａ標的に関しては、Ｂａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．（Ｓｃｉｅｎｃｅ １１ Ｏｃｔｏｂｅｒ ２０１３：Ｖｏｌ．３４２ ｎｏ．６１５５ ｐｐ．２５３－２５７）およびＸｕ ｅｔ ａｌ．（Ｓｃｉｅｎｃｅ １８ Ｎｏｖｅｍｂｅｒ ２０１１：Ｖｏｌ．３３４ ｎｏ．６０５８ ｐｐ．９９３－９９６）も参照のこと。

【０４１０】

耳

本発明はまた、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を一方または両方の耳に送達することも企図する。

【０４１１】

研究者は、遺伝子治療を用いて現在の難聴治療、すなわち人工内耳を補助し得るかどうかを調べている。難聴は多くの場合に有毛細胞が失われまたは損傷してシグナルを聴覚ニューロンに中継できないことにより引き起こされる。その場合、人工内耳を使用して音に反応し、電気信号を神経細胞に伝達し得る。しかしこれらのニューロンは、多くの場合に損なわれた有毛による成長因子の放出が減ることに伴い変性し、蝸牛から後退している。

【０４１２】

米国特許出願公開第２０１２０３２８５８０号明細書は、シリンジ、例えば単回投与シリンジを例えば使用した、医薬組成物の耳への注入（例えば、耳介投与）、例えば蝸牛の管腔（例えば、中央階、前庭階、および鼓室階）への注入を記載している。例えば、本明細書に記載される化合物の１つ以上を、鼓室内注入により（例えば中耳に）、および／または外耳、中耳、および／または内耳への注入により投与することができる。かかる方法は当該技術分野では常法として、例えばヒト耳に対するステロイドおよび抗生物質の投与に用いられている。注入は、例えば、耳の正円窓からであっても、または蝸牛嚢からであ

ってもよい。他の内耳投与方法は当該技術分野において公知である（例えば、Ｓａｌｔ ａｎｄ Ｐｌｏｎｔｋｅ，Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｔｏｄａｙ，１０：１２９９－１３０６，２００５を参照のこと）。

【０４１３】

別の投与方法では、医薬組成物はカテーテルまたはポンプによってインサイチュー投与することができる。カテーテルまたはポンプは、例えば、医薬組成物を蝸牛管腔または耳の正円窓および／または結腸の管腔に仕向けることができる。本明細書に記載される化合物の１つ以上を耳、例えば、ヒトの耳に投与するのに好適な例示的薬物送達器具および方法が、ＭｃＫｅｎｎａ ｅｔ ａｌ．（米国特許出願公開第２００６／００３０８３７号明細書）およびＪａｃｏｂｓｅｎ ｅｔ ａｌ．（米国特許第７，２０６，６３９号明細書）により記載される。一部の実施形態では、カテーテルまたはポンプは外科手技中に例えば患者の耳（例えば、外耳、中耳、および／または内耳）に配置され得る。一部の実施形態では、カテーテルまたはポンプは外科手技を必要とすることなく例えば患者の耳（例えば、外耳、中耳、および／または内耳）に配置され得る。

【０４１４】

あるいはまたは加えて、本明細書に記載される化合物の１つ以上を、人工内耳または補聴器などの、外耳に装着される機械的装置と組み合わせて投与することができる。本発明で使用するのに好適な例示的人工内耳が、Ｅｄｇｅ ｅｔ ａｌ．（米国特許出願公開第２００７／００９３８７８号明細書）により記載される。

【０４１５】

一部の実施形態では、上記に記載する投与方法はいずれの順序で組み合わせてもよく、同時であってもまたは分散させてもよい。

【０４１６】

あるいはまたは加えて、本発明は、例えばＣＤＥＲ Ｄａｔａ Ｓｔａｎｄａｒｄｓ Ｍａｎｕａｌ、第００４版（ｆｄａ．ｇｉｖｅ／ｃｄｅｒ／ｄｓｍ／ＤＲＧ／ｄｒｇ００３０１．ｈｔｍにおいて利用可能）に記載されるとおりの、食品医薬品局（Ｆｏｏｄ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）によって承認された方法のいずれかに従い投与されてもよい。

【０４１７】

一般に、米国特許出願公開第２０１２０３２８５８０号明細書に記載される細胞治療方法を使用して、インビトロでの成熟細胞型の内耳（例えば有毛細胞）となるまたはそれに向けた細胞の完全なまたは部分的な分化を促進することができる。かかる方法により生じる細胞を、次にかかる治療を必要とする患者に移植しまたは植え込むことができる。このような方法を実施するために必要な細胞培養方法について、好適な細胞型の同定および選択方法、選択された細胞の完全なまたは部分的な分化を促進する方法、完全なまたは部分的に分化した細胞型を同定する方法、および完全なまたは部分的に分化した細胞を植え込む方法を含め、以下に記載する。

【０４１８】

本発明での使用に好適な細胞としては、限定はされないが、本明細書に記載される化合物の１つ以上と例えばインビトロで接触させたときに、完全にまたは部分的に内耳の成熟細胞、例えば有毛細胞（例えば内有毛細胞および／または外有毛細胞）に分化する能力を有する細胞が挙げられる。有毛細胞に分化する能力を有する例示的細胞としては、限定はされないが、幹細胞（例えば、内耳幹細胞、成体幹細胞、骨髄由来幹細胞、胚性幹細胞、間葉系幹細胞、皮膚幹細胞、ｉＰＳ細胞、および脂肪由来幹細胞）、前駆細胞（例えば、内耳前駆細胞）、支持細胞（例えば、ダイテルス細胞、柱細胞、内指節細胞、視蓋細胞およびヘンゼン細胞）、および／または生殖細胞が挙げられる。内耳感覚細胞を補充するための幹細胞の使用が、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（米国特許出願公開第２００５／０２８７１２７号明細書）およびＬｉ ｅｔ ａｌ．（米国特許出願第１１／９５３，７９７号明細書）に記載されている。内耳感覚細胞を補充するための骨髄由来幹細胞の使用が、Ｅｄｇｅ ｅｔ ａｌ．、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２００７／０８４６５４号明細書に記載さ

れている。ｉＰＳ細胞については、例えば、Ｃｅｌｌ，Ｖｏｌｕｍｅ　１３１，Ｉｓｓｕｅ　５，Ｐａｇｅｓ　８６１－８７２（２００７）；Ｔａｋａｈａｓｈｉ　ａｎｄ　Ｙａｍａｎａｋａ，Ｃｅｌｌ　１２６，６６３－７６（２００６）；Ｏｋｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　４４８，２６０－２６２（２００７）；Ｙｕ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　３１８（５８５８）：１９１７－１９２０（２００７）；Ｎａｋａｇａｗａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２６：１０１－１０６（２００８）；およびＺａｅｈｒｅｓ　ａｎｄ　Ｓｃｈｏｌｅｒ，Ｃｅｌｌ　１３１（５）：８３４－８３５（２００７）に記載されている。

【０４１９】

かかる好適な細胞は、１つ以上の組織特異的遺伝子の存在を（例えば定性的にまたは定量的に）分析することにより同定し得る。例えば、１つ以上の組織特異的遺伝子のタンパク質産物を検出することにより遺伝子発現を検出し得る。タンパク質検出技術には、適切な抗原に対する抗体を使用してタンパク質を（例えば細胞抽出物または全細胞を使用して）染色することが含まれる。この場合、適切な抗原は、組織特異的遺伝子発現のタンパク質産物である。原則的には一次抗体（すなわち、抗原と結合する抗体）を標識し得るが、一次抗体を標的とする二次抗体（例えば抗ＩｇＧ）を使用することがより一般的である（そして可視化が向上する）。この二次抗体は、蛍光色素と、あるいは適切な酵素と比色反応用に、または金ビーズ（電子顕微鏡法用に）、またはビオチン－アビジン系とコンジュゲートされ、これにより一次抗体、ひいては抗原の位置を認識することができるようになる。

【０４２０】

本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ分子は、米国特許出願公開第２０１１０１４２９１７号明細書から改良される組成物によって、医薬組成物を外耳に直接塗布することにより耳に送達し得る。一部の実施形態では医薬組成物は外耳道に塗布される。耳への送達は、耳送達（ａｕｒａｌ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ）または耳送達（ｏｔｉｃ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ）とも称され得る。

【０４２１】

一部の実施形態では本発明のＲＮＡ分子はリポソーム製剤またはリポフェクチン製剤などで送達され、当業者に周知の方法により調製され得る。かかる方法は、例えば、米国特許第５，５９３，９７２号明細書、同第５，５８９，４６６号明細書および同第５，５８０，８５９号明細書（これらは参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０４２２】

哺乳類細胞に対するｓｉＲＮＡの送達の増強および向上を特に目標とする送達系が開発されており（例えば、Ｓｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ　ＦＥＢＳ　Ｌｅｔ．２００３，５３９：１１１－１１４；Ｘｉａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２００２，２０：１００６－１０１０；Ｒｅｉｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｖｉｓｉｏｎ．２００３，９：２１０－２１６；Ｓｏｒｅｎｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２００３，３２７：７６１－７６６；Ｌｅｗｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｇｅｎ．２００２，３２：１０７－１０８およびＳｉｍｅｏｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，ＮＡＲ　２００３，３１，１１：２７１７－２７２４を参照のこと）、本発明に適用し得る。ｓｉＲＮＡは、最近、霊長類における遺伝子発現を阻害するための使用が成功している（例えばＴｏｌｅｎｔｉｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｒｅｔｉｎａ　２４（４）：６６０を参照されたく、これもまた本発明に適用することができる。

【０４２３】

Ｑｉ　ｅｔ　ａｌ．は、新規タンパク質性の（ｐｒｏｔｅｉｄｉｃ）送達技術によるインタクトな正円窓からの内耳に対する効率的なｓｉＲＮＡ形質移入方法を開示しており、これは本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適用し得る（例えば、Ｑｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ（２０１３），１－９を参照のこと）。詳細には、ＴＡＴ二本鎖ＲＮＡ結合ドメイン（ＴＡＴ－ＤＲＢＤ）が（これは、内耳の細胞、例えば内有毛細胞および外有毛細胞、膨大部稜、卵形嚢斑および球形嚢斑にＣｙ３標識ｓｉＲＮＡを、インタ

クトな正円窓を介した透過によって形質移入することができる）、種々の内耳の不快を治療しおよび聴覚機能を維持するのための二本鎖ｓｉＲＮＡのインビボ送達に成功している。約４０μｌの１０ｍＭ　ＲＮＡが、耳への投与についての投薬量として企図され得る。

【０４２４】

Ｒｅｊａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（Ｈｅａｒ　Ｒｅｓ．２００７　Ｊｕｎ；２２８（１－２）：１８０－７）によれば、インプラントによる電気刺激の標的であるらせん神経節ニューロンの良好な維持により人工内耳機能を改善することができ、実験的に聴覚を奪った耳において脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）がらせん神経節生存を増強することが以前示されている。Ｒｅｊａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．は、ＢＤＮＦ遺伝子インサートを有するウイルスベクターにより形質導入された線維芽細胞コーティングを含む改良型設計の人工内耳電極を試験した。この種のエキソビボ遺伝子導入を達成するため、Ｒｅｊａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．は、ＢＤＮＦ遺伝子カセットインサートを有するアデノウイルスをモルモット線維芽細胞に形質導入し、これらの細胞がＢＤＮＦを分泌したことを決定し、次にアガロースゲルでＢＤＮＦ分泌細胞を人工内耳電極に結合させて、その電極を鼓室階に植え込んだ。Ｒｅｊａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．は、このＢＤＮＦを発現する電極が、植え込みの４８日後に対照電極と比較したとき有意に多いらせん神経節ニューロンを蝸牛の基底回転部に維持することが可能であったことを決定し、らせん神経節ニューロンの生存を増強するため人工内耳療法をエキソビボ遺伝子導入と組み合わせることの実現可能性を実証した。かかるシステムは、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系の耳への送達に適用することができる。

【０４２５】

Ｍｕｋｈｅｒｊｅａ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｎｔｉｏｘｉｄａｎｔｓ　＆　Ｒｅｄｏｘ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，Ｖｏｌｕｍｅ　１３，Ｎｕｍｂｅｒ　５，２０１０）は、損傷からのＯＨＣの保護および聴性脳幹反応（ＡＢＲ）における閾値シフトの低下から明らかなとおり、低分子干渉（ｓｉ）ＲＮＡを使用したＮＯＸ３のノックダウンがシスプラチン中毒性難聴を解消したことを報告している。種々の用量のｓｉＮＯＸ３（０．３、０．６、および０．９μｇ）がラットに投与され、ＮＯＸ３発現がリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって評価された。使用した最も低い用量（０．３μｇ）のＮＯＸ３　ｓｉＲＮＡは、スクランブルｓｉＲＮＡまたは未治療の蝸牛の経鼓室投与と比較したときＮＯＸ３　ｍＲＮＡのいかなる阻害も示さなかった。しかしながら、より高用量のＮＯＸ３　ｓｉＲＮＡ（０．６および０．９μｇ）の投与は、対照のスクランブルｓｉＲＮＡと比較してＮＯＸ３発現を低下させた。かかるシステムは、ヒトに対する投与に関して約２ｍｇ～約４ｍｇのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの投薬量による経鼓室投与について本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適用し得る。

【０４２６】

Ｊｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．２１　ｎｏ．４，８３４－８４１　ａｐｒ．２０１３）は、卵形嚢におけるＨｅｓ５レベルがｓｉＲＮＡの適用後に低下したこと、およびそれらの卵形嚢における有毛細胞の数が対照治療後と比べて有意に多かったことを実証している。このデータは、ｓｉＲＮＡ技術が内耳における修復および再生の誘導に有用であり得ること、ノッチシグナル伝達経路が特異的遺伝子発現の阻害に潜在的に有用な標的であることを示唆している。Ｊｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．は、凍結乾燥したｓｉＲＮＡに滅菌通常生理食塩水を添加することにより調製した８μｇのＨｅｓ５　ｓｉＲＮＡを、２μｌ容積で耳の前庭上皮に注入した。かかるシステムは、ヒトに対する投与に関して約１～約３０ｍｇのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの投薬量による耳の前庭上皮への投与について本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適用し得る。

【０４２７】

眼

本発明はまた、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を一方または両方の眼に送達することも企図する。

【０４２８】

本発明のさらに別の態様では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を使用して、Ｇｅｎｅｔｉｃ

Ｄｉｓｅａｓｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｅｙｅ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，編者Ｅｌｉａｓ Ｉ．Ｔｒａｂｏｕｌｓｉ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，２０１２にさらに記載されるいくつかの遺伝子突然変異により生じる眼の異常が補修され得る。

【０４２９】

眼への投与には、レンチウイルスベクター、詳細にはウマ伝染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）が特に好ましい。

【０４３０】

別の実施形態において、特に眼の遺伝子療法に対して、ウマ伝染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）をベースとする最小非霊長類レンチウイルスベクターもまた企図される（例えば、Ｂａｌａｇａａｎ，Ｊ Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ ２００６；８：２７５－２８５，２００５年１１月２１日オンライン発行，Ｗｉｌｅｙ ＩｎｔｅｒＳｃｉｅｎｃｅ（ｗｗｗ．ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ．ｗｉｌｅｙ．ｃｏｍ）．ＤＯＩ：１０．１００２／ｊｇｍ．８４５を参照のこと）。ベクターは、標的遺伝子の発現をドライブするサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターを有することが企図される。前房内、網膜下、眼内および硝子体内注射は全て企図される（例えば、Ｂａｌａｇａａｎ，Ｊ Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ ２００６；８：２７５－２８５，２００５年１１月２１日オンライン発行，Ｗｉｌｅｙ ＩｎｔｅｒＳｃｉｅｎｃｅ（ｗｗｗ．ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ．ｗｉｌｅｙ．ｃｏｍ）．ＤＯＩ：１０．１００２／ｊｇｍ．８４５を参照のこと）。眼内注射は手術用顕微鏡の助けを借りて実施される。網膜下注射および硝子体内注射に関しては、軽い指圧により眼を脱出させ、ガラス製顕微鏡スライドカバースリップに覆われた角膜上の一滴の伝播媒質溶液からなるコンタクトレンズシステムを使用して眼底を可視化してもよい。網膜下注射に関しては、５μｌ Ｈａｍｉｌｔｏｎシリンジに取り付けられた１０ｍｍの３４ゲージ針の先端を、直接可視化しながら、網膜下腔に針の孔が見えるまで上方赤道強膜から接線方向に後極に向かって進めてもよい。次に、２μｌのベクター懸濁液を注入して上方胞状網膜剥離を生じさせ、そのようにして網膜下ベクター投与を確認し得る。この手法は自己閉鎖創強膜切開を作り出し、ベクター懸濁液がＲＰＥによって通常手技の４８時間以内に吸収されるまで網膜下腔に維持されることを可能にする。この手技を下半球に繰り返して下方網膜剥離を生じさせてもよい。この技法により、感覚神経網膜およびＲＰＥの約７０％がベクター懸濁液に曝露されることになる。硝子体内注射に関しては、針の先端を角膜強膜縁の１ｍｍ後方の強膜から進め、２μｌのベクター懸濁液を硝子体腔に注入してもよい。前房内注射に関しては、針の先端を角膜強膜縁穿刺によって進め、角膜中央部に向かって送り、および２μｌのベクター懸濁液を注入してもよい。前房内注射に関しては、針の先端を角膜強膜縁穿刺によって進め、角膜中央部に向かって送り、および２μｌのベクター懸濁液を注入してもよい。これらのベクターは１．０～１．４×10^{10}または１．０～１．４×10^{9}形質導入単位（ＴＵ）／ｍｌのいずれかの力価で注入され得る。

【０４３１】

別の実施形態において、滲出型の加齢性黄斑変性症の治療に対する網膜下注入によって送達される血管新生抑制タンパク質エンドスタチン（ｅｎｄｏｓｔａｉｎ）およびアンジオスタチンを発現するウマ伝染性貧血ウイルスベースのレンチウイルス遺伝子治療ベクターであるＲｅｔｉｎｏＳｔａｔ（登録商標）もまた企図される（例えば、Ｂｉｎｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，ＨＵＭＡＮ ＧＥＮＥ ＴＨＥＲＡＰＹ ２３：９８０－９９１（２０１２年９月）を参照のこと）。かかるベクターを本発明のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系用に改良し得る。各眼につき１．１×10^{5}形質導入単位／眼（ＴＵ／眼）の用量、１００μｌの総容積のＲｅｔｉｎｏＳｔａｔ（登録商標）で各眼を治療し得る。

【０４３２】

別の実施形態において、眼への送達にＥ１欠失、部分的Ｅ３欠失、Ｅ４欠失アデノウイルスベクターが企図され得る。２８人の進行性新生血管加齢性黄斑変性症（ＡＭＤ）患者に、ヒト色素上皮由来因子を発現するＥ１欠失、部分的Ｅ３欠失、Ｅ４欠失アデノウイルスベクター（ＡｄＰＥＤＦ．ｌｌ）の単回硝子体内注射が投与された（例えば、Ｃａｍｐ

ｏｃｈｉａｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １７：１６７－１７６（Ｆｅｂｒｕａｒｙ ２００６）を参照のこと）。10^{6}～$10^{9.5}$粒子単位（ＰＵ）の範囲の用量が調べられ、ＡｄＰＥＤＦ．ｌｌに関連する重篤な有害事象および用量制限毒性はなかった（例えば、Ｃａｍｐｏｃｈｉａｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １７：１６７－１７６（Ｆｅｂｒｕａｒｙ ２００６）を参照のこと）。アデノウイルスベクター媒介性眼内遺伝子導入は、眼障害の治療に実行可能な手法であるものと見られ、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に適用し得る。

【０４３３】

別の実施形態では、ＲＸｉ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのｓｄ－ｒｘＲＮＡ（登録商標）システムを、眼に対するＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの送達に使用しおよび／または適合させることができる。このシステムでは、３μｇのｓｄ－ｒｘＲＮＡの単回硝子体内投与がＰＰＩＢ ｍＲＮＡレベルの配列特異的低下を１４日間にわたりもたらす。ｓｄ－ｒｘＲＮＡ（登録商標）システムは、ヒトに投与される約３～２０ｍｇのＣＲＩＳＰＲの用量を企図して本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に適用し得る。

【０４３４】

Ｍｉｌｌｉｎｇｔｏｎ－Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９ ｎｏ．４，６４２－６４９ ａｐｒ．２０１１）は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）に基づくロドプシン抑制因子と、ＲＮＡｉ標的部位にわたる縮重位置のヌクレオチド変化に起因して抑制に抵抗性のコドン改変ロドプシン代替遺伝子とを送達するためのアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターを記載する。6.0×10^{8}ｖｐまたは1.8×10^{10}ｖｐ ＡＡＶのいずれかの注射が、Ｍｉｌｌｉｎｇｔｏｎ－Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．により眼内に網膜下注射された。Ｍｉｌｌｉｎｇｔｏｎ－Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．のＡＡＶベクターは、ヒトに投与される約2×10^{11}～約6×10^{13}ｖｐの用量を企図して本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に適用し得る。

【０４３５】

Ｄａｌｋａｒａ ｅｔ ａｌ．（Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ ５，１８９ｒａ７６（２０１３））はまた、眼の硝子体液に対する非傷害性注射後に網膜全体に野生型バージョンの欠陥遺伝子を送達するＡＡＶベクターを作り出すインビボ定向進化に関する。Ｄａｌｋａｒａは、７ｍｅｒペプチド提示ライブラリおよびＡＡＶ１、２、４、５、６、８、および９のｃａｐ遺伝子のＤＮＡシャフリングによって構築されたＡＡＶライブラリを記載している。これらのｒｃＡＡＶライブラリおよびＣＡＧまたはＲｈｏプロモーター下でＧＦＰを発現するｒＡＡＶベクターがパッケージングされ、定量的ＰＣＲによってデオキシリボヌクレアーゼ耐性のゲノム力価が得られた。ライブラリがプールされ、初期ライブラリ多様化と、続く３つのインビボ選択ステップとから各々がなる２ラウンドの進化が実施された。かかるステップのそれぞれにおいて、Ｐ３０ ｒｈｏ－ＧＦＰマウスに、２ｍｌのイオジキサノール精製リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）透析ライブラリが約1×10^{12}ｖｇ／ｍｌのゲノム力価で硝子体内注射された。Ｄａｌｋａｒａ ｅｔ ａｌ．のＡＡＶベクターは、ヒトに投与される約1×10^{15}～約1×10^{16}ｖｇ／ｍｌの用量を企図して、本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に適用し得る。

【０４３６】

別の実施形態において、網膜色素変性症（ＲＰ）の治療にロドプシン遺伝子が標的化されてもよく、ここではＳａｎｇａｍｏ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願公開第２０１２０２０４２８２号明細書のシステムを、本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に従い改良し得る。

【０４３７】

別の実施形態において、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓに譲渡された、ヒトロドプシン遺伝子から標的配列を開裂する方法に関する米国特許出願公開第２０１３０１８３２８２号明細書の方法もまた、本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に合わせて改良し得る。

【０４３８】

Ａｃａｄｅｍｉａ Ｓｉｎｉｃａに譲渡された米国特許出願公開第２０１３０２０２６

７８号明細書は、Ｐｕｆ－Ａ遺伝子（これは眼組織の網膜神経節細胞および色素含有細胞で発現し、ユニークな抗アポトーシス活性を示す）を眼の網膜下腔または硝子体内腔に送達することに関する網膜症および視力を脅かす眼科学的障害の治療方法に関する。詳細には、望ましい標的は、ｚｇｃ：１９３９３３、ｐｒｄｍ１ａ、ｓｐａｔａ２、ｔｅｘ１０、ｒｂｂ４、ｄｄｘ３、ｚｐ２．２、Ｂｌｉｍｐ－１およびＨｔｒＡ２であり、これらは全て、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系により標的化し得る。

【０４３９】

Ｗｕ（Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ，１３：６５９－６２，２０１３）は、マウスにおいて白内障を引き起こす単一塩基対突然変異にＣａｓ９を導いたガイドＲＮＡを設計し、これはＤＮＡ開裂を誘導した。次に接合体修復機構に提供される他の野生型アレルまたはオリゴのいずれかを使用して、変異マウスにおける壊れたアレルの配列が補修され、かつ白内障が引き起こす遺伝的欠陥が補修された。

【０４４０】

米国特許出願公開第２０１２０１５９６５３号明細書は、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用した黄斑変性症（ｍａｃｕｌａｒ　ｄｅｇｅｒａｔｉｏｎ）（ＭＤ）に関連する細胞、動物およびタンパク質の遺伝的改変を記載する。黄斑変性症（ＭＤ）は、高齢者における視力障害の主な原因であるが、また、スタルガルト病、ソーズビー眼底、および致死性小児神経変性疾患などの、発症年齢が乳児期という若さである小児期疾患の顕著な症状でもある。黄斑変性症は網膜の損傷が原因となって視野中心（斑）の視力喪失をもたらす。この疾患はヒトで観察されるため、現行の既存の動物モデルはこの疾患の主要な特徴を再現しない。ＭＤに関連するタンパク質をコードする突然変異体遺伝子を含む利用可能な動物モデルはまた、極めて可変的な表現型も生じ、ヒト疾患に対する解釈および治療法開発を困難にしている。

【０４４１】

米国特許出願公開第２０１２０１５９６５３号明細書の一態様は、ＭＤに関連するタンパク質をコードする任意の染色体配列を編集することに関し、これは本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適用し得る。ＭＤに関連するタンパク質は、典型的にはＭＤに関連するタンパク質とＭＤ障害との実験的関連性に基づき選択される。例えば、ＭＤ障害を有する集団では、ＭＤ障害を有しない集団と比べて、ＭＤに関連するタンパク質の産生速度または循環中濃度が上昇または低下し得る。タンパク質レベルの差は、限定はされないが、ウエスタンブロット、免疫組織化学染色、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、および質量分析を含むプロテオミクス技術を用いて評価し得る。あるいは、ＭＤに関連するタンパク質は、限定はされないが、ＤＮＡマイクロアレイ解析、遺伝子発現連鎖解析（ＳＡＧＥ）、および定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Ｑ－ＰＣＲ）を含むゲノム技術を用いて、それらのタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子発現プロファイルを得ることにより同定され得る。

【０４４２】

非限定的な例として、ＭＤに関連するタンパク質としては、限定はされないが以下のタンパク質が挙げられる：（ＡＢＣＡ４）ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＡ（ＡＢＣ１）、メンバー４　ＡＣＨＭ１色覚異常（杆体一色型色覚異常）１　ＡｐｏＥ　アポリポタンパク質Ｅ（ＡｐｏＥ）　Ｃ１ＱＴＮＦ５（ＣＴＲＰ５）　Ｃ１ｑおよび腫瘍壊死因子関連タンパク質５（Ｃ１ＱＴＮＦ５）　Ｃ２　補体成分２（Ｃ２）　Ｃ３　補体成分（Ｃ３）　ＣＣＬ２　ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド２（ＣＣＬ２）　ＣＣＲ２　ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体２（ＣＣＲ２）　ＣＤ３６　表面抗原分類３６　ＣＦＢ　補体因子Ｂ　ＣＦＨ　補体因子ＣＦＨ　Ｈ　ＣＦＨＲ１　補体因子Ｈ関連１　ＣＦＨＲ３　補体因子Ｈ関連３　ＣＮＧＢ３　環状ヌクレオチド開口チャンネルβ３　ＣＰ　セルロプラスミン（ＣＰ）　ＣＲＰ　Ｃ反応性タンパク質（ＣＲＰ）　ＣＳＴ３　シスタチンＣまたはシスタチン３（ＣＳＴ３）　ＣＴＳＤ　カテプシンＤ（ＣＴＳＤ）　ＣＸ３ＣＲ１　ケモカイン（Ｃ－Ｘ３－Ｃモチーフ）受容体１　ＥＬＯＶＬ４　極長鎖脂肪酸の伸長４　ＥＲＣＣ６　除去修復交差相補げっ歯類修復欠損、相補群６　ＦＢＬＮ５　フィビ

ュリン５　ＦＢＬＮ５　フィビュリン５　ＦＢＬＮ６　フィビュリン６　ＦＳＣＮ２　ファスシン（ＦＳＣＮ２）　ＨＭＣＮ１　ヘミセンチン（Ｈｅｍｉｃｅｎｔｒｉｎ）１　ＨＭＣＮ１　ヘミセンチン１　ＨＴＲＡ１　ＨｔｒＡセリンペプチダーゼ１（ＨＴＲＡ１）　ＨＴＲＡ１　ＨｔｒＡセリンペプチダーゼ１　ＩＬ－６　インターロイキン６　ＩＬ－８　インターロイキン８　ＬＯＣ３８７７１５仮定タンパク質　ＰＬＥＫＨＡ１　プレクストリン相同ドメイン含有ファミリーＡメンバー１（ＰＬＥＫＨＡ１）　ＰＲＯＭ１　プロミニン１（ＰＲＯＭ１またはＣＤ１３３）　ＰＲＰＨ２　ペリフェリン－２　ＲＰＧＲ　網膜色素変性症ＧＴＰアーゼ調節因子　ＳＥＲＰＩＮＧ１　セルピンペプチダーゼ阻害因子、クレードＧ、メンバー１（Ｃ１－阻害因子）　ＴＣＯＦ１　トリークル（Ｔｒｅａｃｌｅ）　ＴＩＭＰ３　メタロプロテイナーゼ阻害因子３（ＴＩＭＰ３）　ＴＬＲ３　Ｔｏｌｌ様受容体３。

染色体配列が編集されるＭＤ関連タンパク質のアイデンティティは異なってもよく、かつ異なることになる。好ましい実施形態において、染色体配列が編集されるＭＤ関連タンパク質は、ＡＢＣＲ遺伝子によりコードされるＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＡ（ＡＢＣ１）メンバー４タンパク質（ＡＢＣＡ４）、ＡＰＯＥ遺伝子によりコードされるアポリポタンパク質Ｅタンパク質（ＡＰＯＥ）、ＣＣＬ２遺伝子によりコードされるケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド２タンパク質（ＣＣＬ２）、ＣＣＲ２遺伝子によりコードされるケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体２タンパク質（ＣＣＲ２）、ＣＰ遺伝子によりコードされるセルロプラスミンタンパク質（ＣＰ）、ＣＴＳＤ遺伝子によりコードされるカテプシンＤタンパク質（ＣＴＳＤ）、またはＴＩＭＰ３遺伝子によりコードされるメタロプロテイナーゼ阻害因子３タンパク質（ＴＩＭＰ３）であり得る。例示的実施形態において、遺伝子改変を受けた動物はラットであり、およびＭＤ関連タンパク質をコードする編集される染色体配列は以下であり得る：（ＡＢＣＡ４）ＡＴＰ結合カセット、ＮＭ＿０００３５０　サブファミリーＡ（ＡＢＣ１）、メンバー４　ＡＰＯＥ　アポリポタンパク質Ｅ　ＮＭ＿１３８８２８（ＡＰＯＥ）　ＣＣＬ２ケモカイン（Ｃ－Ｃ　ＮＭ＿０３１５３０　モチーフ）リガンド２（ＣＣＬ２）　ＣＣＲ２ケモカイン（Ｃ－Ｃ　ＮＭ＿０２１８６６モチーフ）受容体２（ＣＣＲ２）　ＣＰ　セルロプラスミン（ＣＰ）　ＮＭ＿０１２５３２　ＣＴＳＤ　カテプシンＤ（ＣＴＳＤ）　ＮＭ＿１３４３３４　ＴＩＭＰ３　メタロプロテイナーゼ　ＮＭ＿０１２８８６　阻害因子３（ＴＩＭＰ３）。動物または細胞は、ＭＤ関連タンパク質をコードする１、２、３、４、５、６、７個またはそれ以上の破壊された染色体配列および破壊されたＭＤ関連タンパク質をコードする０、１、２、３、４、５、６、７個またはそれ以上の染色体にインテグレートされた配列を含み得る。

【０４４３】

編集されまたはインテグレートされた染色体配列は、変化したＭＤ関連タンパク質をコードするように改変されてもよい。ＭＤ関連染色体配列におけるいくつかの突然変異がＭＤと関連付けられている。ＭＤに関連する染色体配列における突然変異の非限定的な例としては、ＡＢＣＲタンパク質における、Ｅ４７１Ｋ（すなわち４７１位のグルタミン酸がリジンに変わる）、Ｒ１１２９Ｌ（すなわち１１２９位のアルギニンがロイシンに変わる）、Ｔ１４２８Ｍ（すなわち１４２８位のスレオニンがメチオニンに変わる）、Ｒ１５１７Ｓ（すなわち１５１７位のアルギニンがセリンに変わる）、Ｉ１５６２Ｔ（すなわち１５６２位のイソロイシンがスレオニンに変わる）、およびＧ１５７８Ｒ（すなわち１５７８位のグリシンがアルギニンに変わる）；ＣＣＲ２タンパク質における、Ｖ６４Ｉ（すなわち１９２位のバリンがイソロイシンに変わる）；ＣＰタンパク質における、Ｇ９６９Ｂ（すなわち９６９位のグリシンがアスパラギンまたはアスパラギン酸に変わる）；ＴＩＭＰ３タンパク質における、Ｓ１５６Ｃ（すなわち１５６位のセリンがシステインに変わる）、Ｇ１６６Ｃ（すなわち１６６位のグリシンがシステインに変わる）、Ｇ１６７Ｃ（すなわち１６７位のグリシンがシステインに変わる）、Ｙ１６８Ｃ（すなわち１６８位のチロシンがシステインに変わる）、Ｓ１７０Ｃ（すなわち１７０位のセリンがシステインに変わる）、Ｙ１７２Ｃ（すなわち１７２位のチロシンがシステインに変わる）およびＳ１８１Ｃ（すなわち１８１位のセリンがシステインに変わる）を含めた、ＭＤを引き起こす

ものが挙げられる。ＭＤ関連遺伝子および疾患における遺伝的変異の他の関連性は当該技術分野において公知である。

【０４４４】

心臓

本発明はまた、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を心臓に送達することも企図する。心臓に関しては、心筋向性アデノ随伴（ａｄｅｎａ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ）ウイルス（ＡＡＶＭ）、詳細には心臓で優先的遺伝子導入を示したＡＡＶＭ４１が好ましい（例えば、Ｌｉｎ－Ｙａｎｇａ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，Ｍａｒｃｈ　１０，２００９，ｖｏｌ．１０６，ｎｏ．１０を参照のこと）。投与は全身投与または局所投与であってよい。全身投与には約１～１０×１０^{14}ベクターゲノムの投薬量が企図される。例えば、Ｅｕｌａｌｉｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ｎａｔｕｒｅ　４９２：３７６およびＳｏｍａｓｕｎｔｈａｒａｍ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ　３４：７７９０も参照のこと。

【０４４５】

例えば、米国特許出願公開第２０１１００２３１３９号明細書は、ジンクフィンガーヌクレアーゼの使用による心血管疾患に関連する細胞、動物およびタンパク質の遺伝的改変を記載している。心血管疾患には、概して、高血圧、心臓発作、心不全、および脳卒中およびＴＩＡが含まれる。この開示に記載される方法においては、心血管疾患に関わる任意の染色体配列または心血管疾患に関わる任意の染色体配列によりコードされるタンパク質が利用され得る。心血管関連タンパク質は、典型的には心血管関連タンパク質と心血管疾患の発症との実験的関連性に基づき選択される。例えば、心血管障害を有する集団では、心血管障害を有しない集団と比べて心血管関連タンパク質の産生速度または循環中濃度が上昇または低下し得る。タンパク質レベルの差は、限定はされないが、ウエスタンブロット、免疫組織化学染色、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、および質量分析を含むプロテオミクス技術を用いて評価し得る。あるいは、心血管関連タンパク質は、限定はされないが、ＤＮＡマイクロアレイ解析、遺伝子発現連鎖解析（ＳＡＧＥ）、および定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Ｑ－ＰＣＲ）を含むゲノム技術を用いて、それらのタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子発現プロファイルを得ることにより同定され得る。

【０４４６】

例として、染色体配列は、限定はされないが、ＩＬ１Ｂ（インターロイキン１、β）、ＸＤＨ（キサンチンデヒドロゲナーゼ）、ＴＰ５３（腫瘍タンパク質ｐ５３）、ＰＴＧＩＳ（プロスタグランジン１２（プロスタサイクリン）シンターゼ）、ＭＢ（ミオグロビン）、ＩＬ４（インターロイキン４）、ＡＮＧＰＴ１（アンギオポエチン１）、ＡＢＣＧ８（ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＧ（ＷＨＩＴＥ）、メンバー８）、ＣＴＳＫ（カテプシンＫ）、ＰＴＧＩＲ（プロスタグランジン１２（プロスタサイクリン）受容体（ＩＰ））、ＫＣＮＪ１１（カリウム内向き整流性チャネル、サブファミリーＪ、メンバー１１）、ＩＮＳ（インスリン）、ＣＲＰ（Ｃ反応性タンパク質、ペントラキシン関連）、ＰＤＧＦＲＢ（血小板由来成長因子受容体、βポリペプチド）、ＣＣＮＡ２（サイクリンＡ２）、ＰＤＧＦＢ（血小板由来成長因子βポリペプチド（サル肉腫ウイルス（ｖ－ｓｉｓ）癌遺伝子ホモログ））、ＫＣＮＪ５（カリウム内向き整流性チャネル、サブファミリーＪ、メンバー５）、ＫＣＮＮ３（カリウム中間体／小コンダクタンスカルシウム活性化チャネル、サブファミリーＮ、メンバー３）、ＣＡＰＮ１０（カルパイン１０）、ＰＴＧＥＳ（プロスタグランジンＥシンターゼ）、ＡＤＲＡ２Ｂ（アドレナリン作動性、α－２Ｂ－、受容体）、ＡＢＣＧ５（ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＧ（ＷＨＩＴＥ）、メンバー５）、ＰＲＤＸ２（ペルオキシレドキシン２）、ＣＡＰＮ５（カルパイン５）、ＰＡＲＰ１４（ポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼファミリー、メンバー１４）、ＭＥＸ３Ｃ（ｍｅｘ－３ホモログＣ（Ｃ．エレガンス（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ））、ＡＣＥアンジオテンシンＩ変換酵素（ペプチジルジペプチダーゼＡ）１）、ＴＮＦ（腫瘍壊死因子（ＴＮＦスーパーファミリー、メンバー２））、ＩＬ６（インターロイキン６（インター

フェロン、β２））、ＳＴＮ（スタチン）、ＳＥＲＰＩＮＥ１（セルピンペプチダーゼ阻害因子、クレードＥ（ネキシン、プラスミノーゲンアクチベータ阻害因子１型）、メンバー１）、ＡＬＢ（アルブミン）、ＡＤＩＰＯＱ（アディポネクチン、Ｃ１Ｑおよびコラーゲンドメイン含有）、ＡＰＯＢ（アポリポタンパク質Ｂ（Ａｇ（ｘ）抗原を含む））、ＡＰＯＥ（アポリポタンパク質Ｅ）、ＬＥＰ（レプチン）、ＭＴＨＦＲ（５，１０－メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（ＮＡＤＰＨ））、ＡＰＯＡ１（アポリポタンパク質Ａ－Ｉ）、ＥＤＮ１（エンドセリン１）、ＮＰＰＢ（ナトリウム利尿ペプチド前駆体Ｂ）、ＮＯＳ３（一酸化窒素合成酵素３（内皮細胞））、ＰＰＡＲＧ（ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ）、ＰＬＡＴ（プラスミノーゲンアクチベータ、組織）、ＰＴＧＳ２（プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ２（プロスタグランジンＧ／Ｈシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ））、ＣＥＴＰ（コレステリルエステル転送タンパク質、血漿）、ＡＧＴＲ１（アンジオテンシンＩＩ受容体、１型）、ＨＭＧＣＲ（３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル－補酵素Ａ還元酵素）、ＩＧＦ１（インスリン様成長因子１（ソマトメジンＣ））、ＳＥＬＥ（セレクチンＥ）、ＲＥＮ（レニン）、ＰＰＡＲＡ（ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体α）、ＰＯＮ１（パラオキソナーゼ１）、ＫＮＧ１（キニノーゲン１）、ＣＣＬ２（ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド２）、ＬＰＬ（リポタンパク質リパーゼ）、ＶＷＦ（フォン・ヴィレブランド因子）、Ｆ２（凝固第ＩＩ因子（トロンビン））、ＩＣＡＭ１（細胞間接着分子１）、ＴＧＦＢ１（形質転換成長因子、β１）、ＮＰＰＡ（ナトリウム利尿ペプチド前駆体Ａ）、ＩＬ１０（インターロイキン１０）、ＥＰＯ（エリスロポエチン）、ＳＯＤ１（スーパーオキシドジスムターゼ１、可溶性）、ＶＣＡＭ１（血管細胞接着分子１）、ＩＦＮＧ（インターフェロン、γ）、ＬＰＡ（リポタンパク質、Ｌｐ（ａ））、ＭＰＯ（ミエロペルオキシダーゼ）、ＥＳＲ１（エストロゲン受容体１）、ＭＡＰＫ１（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ１）、ＨＰ（ハプトグロビン）、Ｆ３（凝固第ＩＩＩ因子（トロンボプラスチン、組織因子））、ＣＳＴ３（シスタチンＣ）、ＣＯＧ２（オリゴマーゴルジ複合体の構成成分２）、ＭＭＰ９（マトリックスメタロペプチダーゼ９（ゼラチナーゼＢ、９２ｋＤａゼラチナーゼ、９２ｋＤａ　ＩＶ型コラゲナーゼ））、ＳＥＲＰＩＮＣ１（セルピンペプチダーゼ阻害因子、クレードＣ（アンチトロンビン）、メンバー１）、Ｆ８（凝固第ＶＩＩＩ因子、凝固促進成分）、ＨＭＯＸ１（ヘムオキシゲナーゼ（デサイクリング）１）、ＡＰＯＣ３（アポリポタンパク質Ｃ－ＩＩＩ）、ＩＬ８（インターロイキン８）、ＰＲＯＫ１（プロキネチシン１）、ＣＢＳ（シスタチオニンβ合成酵素）、ＮＯＳ２（一酸化窒素合成酵素２、誘導型）、ＴＬＲ４（Ｔｏｌｌ様受容体４）、ＳＥＬＰ（セレクチンＰ（顆粒膜タンパク質１４０ｋＤａ、抗原ＣＤ６２））、ＡＢＣＡ１（ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＡ（ＡＢＣ１）、メンバー１）、ＡＧＴ（アンジオテンシノーゲン（セルピンペプチダーゼ阻害因子、クレードＡ、メンバー８））、ＬＤＬＲ（低密度リポタンパク質受容体）、ＧＰＴ（グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（アラニンアミノトランスフェラーゼ））、ＶＥＧＦＡ（血管内皮増殖因子Ａ）、ＮＲ３Ｃ２（核内受容体サブファミリー３、Ｃ群、メンバー２）、ＩＬ１８（インターロイキン１８（インターフェロン－γ誘導因子））、ＮＯＳ１（一酸化窒素合成酵素１（神経型））、ＮＲ３Ｃ１（核内受容体サブファミリー３、Ｃ群、メンバー１（グルココルチコイド受容体））、ＦＧＢ（フィブリノゲンβ鎖）、ＨＧＦ（肝細胞成長因子（ヘパポエチンＡ；散乱因子））、ＩＬ１Ａ（インターロイキン１、α）、ＲＥＴＮ（レジスチン）、ＡＫＴ１（ｖ－ａｋｔマウス胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ１）、ＬＩＰＣ（リパーゼ、肝臓）、ＨＳＰＤ１（熱ショック６０ｋＤａタンパク質１（シャペロニン））、ＭＡＰＫ１４（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ１４）、ＳＰＰ１（分泌リンタンパク質１）、ＩＴＧＢ３（インテグリン、β３（血小板糖タンパク質１１１ａ、抗原ＣＤ６１））、ＣＡＴ（カタラーゼ）、ＵＴＳ２（ウロテンシン２）、ＴＨＢＤ（トロンボモジュリン）、Ｆ１０（凝固第Ｘ因子）、ＣＰ（セルロプラスミン（フェロキシダーゼ））、ＴＮＦＲＳＦ１１Ｂ（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー１１ｂ）、ＥＤＮＲＡ（エンドセリン受容体Ａ型）、ＥＧＦＲ（上皮成長因子受容体（赤芽球性白血病ウイルス性（ｖ－ｅｒｂ－ｂ）癌遺伝子ホモログ、ト

リ））、ＭＭＰ２（マトリックスメタロペプチダーゼ２（ゼラチナーゼＡ、７２ｋＤａゼラチナーゼ、７２ｋＤａ　ＩＶ型コラゲナーゼ））、ＰＬＧ（プラスミノーゲン）、ＮＰＹ（神経ペプチドＹ）、ＲＨＯＤ（ｒａｓホモログ遺伝子ファミリー、メンバーＤ）、ＭＡＰＫ８（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ８）、ＭＹＣ（ｖ－ｍｙｃ骨髄球腫症ウイルス癌遺伝子ホモログ（トリ））、ＦＮ１（フィブロネクチン１）、ＣＭＡ１（キマーゼ１、マスト細胞）、ＰＬＡＵ（プラスミノーゲンアクチベータ、ウロキナーゼ）、ＧＮＢ３（グアニンヌクレオチド結合タンパク質（Ｇタンパク質）、βポリペプチド３）、ＡＤＲＢ２（アドレナリン作動性、β－２－、受容体、表面）、ＡＰＯＡ５（アポリポタンパク質Ａ－Ⅴ）、ＳＯＤ２（スーパーオキシドジスムターゼ２、ミトコンドリア）、Ｆ５（凝固第Ⅴ因子（プロアクセレリン、不安定因子））、ＶＤＲ（ビタミンＤ（１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ３）受容体）、ＡＬＯＸ５（アラキドン酸塩５－リポキシゲナーゼ）、ＨＬＡ－ＤＲＢ１（主要組織適合遺伝子複合体、クラスＩＩ、ＤＲ　β１）、ＰＡＲＰ１（ポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼ１）、ＣＤ４０ＬＧ（ＣＤ４０リガンド）、ＰＯＮ２（パラオキソナーゼ２）、ＡＧＥＲ（終末糖化産物特異的受容体）、ＩＲＳ１（インスリン受容体基質１）、ＰＴＧＳ１（プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ１（プロスタグランジンＧ／Ｈシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ））、ＥＣＥ１（エンドセリン変換酵素１）、Ｆ７（凝固第ＶＩＩ因子（血清プロトロンビン転化促進因子））、ＵＲＮ（インターロイキン１受容体拮抗薬）、ＥＰＨＸ２（エポキシドヒドロラーゼ２、細胞質）、ＩＧＦＢＰ１（インスリン様成長因子結合タンパク質１）、ＭＡＰＫ１０（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ１０）、ＦＡＳ（Ｆａｓ（ＴＮＦ受容体スーパーファミリー、メンバー６））、ＡＢＣＢ１（ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＢ（ＭＤＲ／ＴＡＰ）、メンバー１）、ＪＵＮ（ｊｕｎ癌遺伝子）、ＩＧＦＢＰ３（インスリン様成長因子結合タンパク質３）、ＣＤ１４（ＣＤ１４分子）、ＰＤＥ５Ａ（ホスホジエステラーゼ５Ａ、ｃＧＭＰ特異的）、ＡＧＴＲ２（アンジオテンシンＩＩ受容体、２型）、ＣＤ４０（ＣＤ４０分子、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー５）、ＬＣＡＴ（レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ）、ＣＣＲ５（ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体５）、ＭＭＰ１（マトリックスメタロペプチダーゼ１（間質コラゲナーゼ））、ＴＩＭＰ１（ＴＩＭＰメタロペプチダーゼ阻害因子１）、ＡＤＭ（アドレノメデュリン）、ＤＹＴ１０（ジストニー１０）、ＳＴＡＴ３（シグナル伝達兼転写活性化因子３（急性期反応因子））、ＭＭＰ３（マトリックスメタロペプチダーゼ３（ストロメライシン１、プロゼラチナーゼ））、ＥＬＮ（エラスチン）、ＵＳＦ１（上流転写因子１）、ＣＦＨ（補体因子Ｈ）、ＨＳＰＡ４（熱ショック７０ｋＤａタンパク質４）、ＭＭＰ１２（マトリックスメタロペプチダーゼ１２（マクロファージエラスターゼ））、ＭＭＥ（膜メタロエンドペプチダーゼ）、Ｆ２Ｒ（凝固第ＩＩ因子（トロンビン）受容体）、ＳＥＬＬ（セレクチンＬ）、ＣＴＳＢ（カテプシンＢ）、ＡＮＸＡ５（アネキシンＡ５）、ＡＤＲＢ１（アドレナリン作動性、β－１－、受容体）、ＣＹＢＡ（シトクロムｂ－２４５、αポリペプチド）、ＦＧＡ（フィブリノゲンα鎖）、ＧＧＴ１（γ－グルタミルトランスフェラーゼ１）、ＬＩＰＧ（リパーゼ、内皮）、ＨＩＦ１Ａ（低酸素誘導因子１、αサブユニット（塩基性ヘリックス－ループ－ヘリックス転写因子））、ＣＸＣＲ４（ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）受容体４）、ＰＲＯＣ（プロテインＣ（凝固第Ⅴａ因子および第ＶＩＩＩａ因子のインアクチベーター））、ＳＣＡＲＢ１（スカベンジャー受容体クラスＢ、メンバー１）、ＣＤ７９Ａ（ＣＤ７９ａ分子、免疫グロブリン関連α）、ＰＬＴＰ（リン脂質転移タンパク質）、ＡＤＤ１（アデュシン１（α））、ＦＧＧ（フィブリノゲンγ鎖）、ＳＡＡ１（血清アミロイドＡ１）、ＫＣＮＨ２（カリウム電位開口型チャネル、サブファミリーＨ（ｅａｇ関連）、メンバー２）、ＤＰＰ４（ジペプチジルペプチダーゼ４）、Ｇ６ＰＤ（グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ）、ＮＰＲ１（ナトリウム利尿ペプチド受容体Ａ／グアニル酸シクラーゼＡ（心房性ナトリウム利尿ペプチド受容体Ａ））、ＶＴＮ（ビトロネクチン）、ＫＩＡＡ０１０１（ＫＩＡＡ０１０１）、ＦＯＳ（ＦＢＪマウス骨肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ）、ＴＬＲ２（ｔｏｌｌ様受容体２）、ＰＰＩＧ（ペプチジルプロリルイソメラーゼＧ（シクロフィリンＧ））、ＩＬ１

Ｒ１（インターロイキン１受容体、Ｉ型）、ＡＲ（アンドロゲン受容体）、ＣＹＰ１Ａ１（シトクロムＰ４５０、ファミリー１、サブファミリーＡ、ポリペプチド１）、ＳＥＲＰＩＮＡ１（セルピンペプチダーゼ阻害因子、クレードＡ（α－１アンチプロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー１）、ＭＴＲ（５－メチルテトラヒドロ葉酸ホモシステインメチルトランスフェラーゼ）、ＲＢＰ４（レチノール結合タンパク質４、血漿）、ＡＰＯＡ４（アポリポタンパク質Ａ－ＩＶ）、ＣＤＫＮ２Ａ（サイクリン依存性キナーゼ阻害因子２Ａ（メラノーマ、ｐ１６、ＣＤＫ４を阻害））、ＦＧＦ２（線維芽細胞成長因子２（塩基性））、ＥＤＮＲＢ（エンドセリン受容体Ｂ型）、ＩＴＧＡ２（インテグリン、α２

（ＣＤ４９Ｂ、ＶＬＡ－２受容体のα２サブユニット））、ＣＡＢＩＮ１（カルシニューリン結合タンパク質１）、ＳＨＢＧ（性ホルモン結合グロブリン）、ＨＭＧＢ１（高移動度群ボックス１）、ＨＳＰ９０Ｂ２Ｐ（熱ショックタンパク質９０ｋＤａ　β（Ｇｒｐ９４）、メンバー２（偽遺伝子））、ＣＹＰ３Ａ４（シトクロムＰ４５０、ファミリー３、サブファミリーＡ、ポリペプチド４）、ＧＪＡ１（ギャップ結合タンパク質、α１、４３ｋＤａ）、ＣＡＶ１（カベオリン１、カベオラタンパク質、２２ｋＤａ）、ＥＳＲ２（エストロゲン受容体２（ＥＲ　β））、ＬＴＡ（リンホトキシンα（ＴＮＦスーパーファミリー、メンバー１））、ＧＤＦ１５（成長分化因子１５）、ＢＤＮＦ（脳由来神経栄養因子）、ＣＹＰ２Ｄ６（シトクロムＰ４５０、ファミリー２、サブファミリーＤ、ポリペプチド６）、ＮＧＦ（神経成長因子（βポリペプチド））、ＳＰ１（Ｓｐ１転写因子）、ＴＧＩＦ１（ＴＧＦＢ誘導性因子ホメオボックス１）、ＳＲＣ（ｖ－ｓｒｃ肉腫（シュミットールピンＡ－２（Ｓｃｈｍｉｄｔ－Ｒｕｐｐｉｎ　Ａ－２））ウイルス癌遺伝子ホモログ（トリ））、ＥＧＦ（上皮成長因子（β－ウロガストロン））、ＰＩＫ３ＣＧ（ホスホイノシチド－３－キナーゼ、触媒、γポリペプチド）、ＨＬＡ－Ａ（主要組織適合遺伝子複合体、クラスＩ、Ａ）、ＫＣＮＱ１（カリウム電位開口型チャネル、ＫＱＴ様サブファミリー、メンバー１）、ＣＮＲ１（カンナビノイド受容体１（脳））、ＦＢＮ１（フィブリリン１）、ＣＨＫＡ（コリンキナーゼα）、ＢＥＳＴ１（ベストロフィン１）、ＡＰＰ（アミロイドβ（Ａ４）前駆体タンパク質）、ＣＴＮＮＢ１（カテニン（カドヘリン関連タンパク質）、β１、８８ｋＤａ）、ＩＬ２（インターロイキン２）、ＣＤ３６（ＣＤ３６分子（トロンボスポンジン受容体））、ＰＲＫＡＢ１（プロテインキナーゼ、ＡＭＰ活性化、β１非触媒サブユニット）、ＴＰＯ（甲状腺ペルオキシダーゼ）、ＡＬＤＨ７Ａ１（アルデヒドデヒドロゲナーゼ７ファミリー、メンバーＡ１）、ＣＸ３ＣＲ１（ケモカイン（Ｃ－Ｘ３－Ｃモチーフ）受容体１）、ＴＨ（チロシンヒドロキシラーゼ）、Ｆ９（凝固第ＩＸ因子）、ＧＨ１（成長ホルモン１）、ＴＦ（トランスフェリン）、ＨＦＥ（ヘモクロマトーシス）、ＩＬ１７Ａ（インターロイキン１７Ａ）、ＰＴＥＮ（ホスファターゼ・テンシンホモログ）、ＧＳＴＭ１（グルタチオンＳ－トランスフェラーゼμ１）、ＤＭＤ（ジストロフィン）、ＧＡＴＡ４（ＧＡＴＡ結合タンパク質４）、Ｆ１３Ａ１（凝固第ＸＩＩＩ因子、Ａ１ポリペプチド）、ＴＴＲ（トランスサイレチン）、ＦＡＢＰ４（脂肪酸結合タンパク質４、脂肪細胞）、ＰＯＮ３（パラオキソナーゼ３）、ＡＰＯＣ１（アポリポタンパク質Ｃ－Ｉ）、ＩＮＳＲ（インスリン受容体）、ＴＮＦＲＳＦ１Ｂ（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー１Ｂ）、ＨＴＲ２Ａ（５－ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体２Ａ）、ＣＳＦ３（コロニー刺激因子３（顆粒球））、ＣＹＰ２Ｃ９（シトクロムＰ４５０、ファミリー２、サブファミリーＣ、ポリペプチド９）、ＴＸＮ（チオレドキシン）、ＣＹＰ１１Ｂ２（シトクロムＰ４５０、ファミリー１１、サブファミリーＢ、ポリペプチド２）、ＰＴＨ（副甲状腺ホルモン）、ＣＳＦ２（コロニー刺激因子２（顆粒球マクロファージ））、ＫＤＲ（キナーゼ挿入ドメイン受容体（ＩＩＩ型受容体チロシンキナーゼ））、ＰＬＡ２Ｇ２Ａ（ホスホリパーゼＡ２、グループＩＩＡ（血小板、滑液））、Ｂ２Ｍ（β－２－ミクログロブリン）、ＴＨＢＳ１（トロンボスポンジン１）、ＧＣＧ（グルカゴン）、ＲＨＯＡ（ｒａｓホモログ遺伝子ファミリー、メンバ

ーＡ）、ＡＬＤＨ２（アルデヒドデヒドロゲナーゼ２ファミリー（ミトコンドリア））、ＴＣＦ７Ｌ２（転写因子７様２（Ｔ細胞特異的、ＨＭＧボックス））、ＢＤＫＲＢ２（ブラジキニン受容体Ｂ２）、ＮＦＥ２Ｌ２（核内因子（赤血球由来２）様２）、ＮＯＴＣＨ１（Ｎｏｔｃｈホモログ１、転座関連（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））））、ＵＧＴ１Ａ１（ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ１）、ＩＦＮＡ１（インターフェロン、α１）、ＰＰＡＲＤ（ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体δ）、ＳＩＲＴ１（サーチュイン（サイレント交配型情報調節２ホモログ）１（Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ））））、ＧＮＲＨ１（ゴナドトロピン放出ホルモン１（黄体形成放出ホルモン））、ＰＡＰＰＡ（妊娠関連血漿タンパク質Ａ、パパリシン１）、ＡＲＲ３（アレスチン３、レチナール（Ｘ－アレスチン））、ＮＰＰＣ（ナトリウム利尿ペプチド前駆体Ｃ）、ＡＨＳＰ（αヘモグロビン安定化タンパク質）、ＰＴＫ２（ＰＴＫ２プロテインチロシンキナーゼ２）、ＩＬ１３（インターロイキン１３）、ＭＴＯＲ（ラパマイシンの機構的標的（セリン／スレオニンキナーゼ））、ＩＴＧＢ２（インテグリン、β２（補体成分３受容体３および４サブユニット））、ＧＳＴＴ１（グルタチオンＳ－トランスフェラーゼθ１）、ＩＬ６ＳＴ（インターロイキン６シグナル伝達因子（ｇｐ１３０、オンコスタチンＭ受容体））、ＣＰＢ２（カルボキシペプチダーゼＢ２（血漿））、ＣＹＰ１Ａ２（シトクロムＰ４５０、ファミリー１、サブファミリーＡ、ポリペプチド２）、ＨＮＦ４Ａ（肝細胞核内因子４、α）、ＳＬＣ６Ａ４（溶質輸送担体ファミリー６（神経伝達物質輸送体、セロトニン）、メンバー４）、ＰＬＡ２Ｇ６（ホスホリパーゼＡ２、ＶＩ群（細胞質型、カルシウム非依存性））、ＴＮＦＳＦ１１（腫瘍壊死因子（リガンド）スーパーファミリー、メンバー１１）、ＳＬＣ８Ａ１（溶質輸送担体ファミリー８（ナトリウム／カルシウム交換体）、メンバー１）、Ｆ２ＲＬ１（凝固第ＩＩ因子（トロンビン）受容体様１）、ＡＫＲ１Ａ１（アルド－ケトレダクターゼファミリー１、メンバーＡ１（アルデヒドレダクターゼ））、ＡＬＤＨ９Ａ１（アルデヒドデヒドロゲナーゼ９ファミリー、メンバーＡ１）、ＢＧＬＡＰ（骨γ－カルボキシグルタミン酸（ｇｌａ）含有タンパク質）、ＭＴＴＰ（ミクロゾームトリグリセリド転移タンパク質）、ＭＴＲＲ（５－メチルテトラヒドロ葉酸ホモシステインメチルトランスフェラーゼレダクターゼ）、ＳＵＬＴ１Ａ３（スルホトランスフェラーゼファミリー、細胞質型、１Ａ、フェノール選択、メンバー３）、ＲＡＧＥ（腎腫瘍抗原）、Ｃ４Ｂ（補体成分４Ｂ（チド（Ｃｈｉｄｏ）血液型）、Ｐ２ＲＹ１２（プリン受容体Ｐ２Ｙ、Ｇタンパク質共役、１２）、ＲＮＬＳ（リナラーゼ、ＦＡＤ依存性アミンオキシダーゼ）、ＣＲＥＢ１（ｃＡＭＰ応答エレメント結合タンパク質１）、ＰＯＭＣ（プロオピオメラノコルチン）、ＲＡＣ１（ｒａｓ関連Ｃ３ボツリヌス毒素基質１（ｒｈｏファミリー、低分子ＧＴＰ結合タンパク質Ｒａｃ１））、ＬＭＮＡ（ラミンＮＣ）、ＣＤ５９（ＣＤ５９分子、補体調節タンパク質）、ＳＣＮ５Ａ（ナトリウムチャネル、電位開口型、Ｖ型、αサブユニット）、ＣＹＰ１Ｂ１（シトクロムＰ４５０、ファミリー１、サブファミリーＢ、ポリペプチド１）、ＭＩＦ（マクロファージ遊走阻害因子（グリコシル化阻害因子））、ＭＭＰ１３（マトリックスメタロペプチダーゼ１３（コラゲナーゼ３））、ＴＩＭＰ２（ＴＩＭＰメタロペプチダーゼ阻害因子２）、ＣＹＰ１９Ａ１（シトクロムＰ４５０、ファミリー１９、サブファミリーＡ、ポリペプチド１）、ＣＹＰ２１Ａ２（シトクロムＰ４５０、ファミリー２１、サブファミリーＡ、ポリペプチド２）、ＰＴＰＮ２２（タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体型２２（リンパ球））、ＭＹＨ１４（ミオシン、重鎖１４、非筋肉性）、ＭＢＬ２（マンノース結合レクチン（プロテインＣ）２、可溶性（オプソニン欠損））、ＳＥＬＰＬＧ（セレクチンＰリガンド）、ＡＯＣ３（アミンオキシダーゼ、銅含有３（血管接着タンパク質１））、ＣＴＳＬ１（カテプシンＬ１）、ＰＣＮＡ（増殖細胞核抗原）、ＩＧＦ２（インスリン様成長因子２（ソマトメジンＡ））、ＩＴＧＢ１（インテグリン、β１（フィブロネクチン受容体、βポリペプチド、抗原ＣＤ２９はＭＤＦ２、ＭＳＫ１２を含む））、ＣＡＳＴ（カルパスタチン）、ＣＸＣＬ１２（ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）リガンド１２（ストロマ細胞由来因子１））、ＩＧＨＥ（免疫グロブリン重鎖定常ε）、ＫＣＮＥ１（カリウム電位開口型チャネル、Ｉｓｋ関連ファミリー、メンバ

ー１）、ＴＦＲＣ（トランスフェリン受容体（ｐ９０、ＣＤ７１））、ＣＯＬ１Ａ１（コラーゲン、Ｉ型、α１）、ＣＯＬ１Ａ２（コラーゲン、Ｉ型、α２）、ＩＬ２ＲＢ（インターロイキン２受容体、β）、ＰＬＡ２Ｇ１０（ホスホリパーゼＡ２、Ｘ群）、ＡＮＧＰＴ２（アンギオポエチン２）、ＰＲＯＣＲ（プロテインＣ受容体、内皮（ＥＰＣＲ））、ＮＯＸ４（ＮＡＤＰＨオキシダーゼ４）、ＨＡＭＰ（ヘプシジン抗菌ペプチド）、ＰＴＰＮ１１（タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体型１１）、ＳＬＣ２Ａ１（溶質輸送担体ファミリー２（促進性グルコーストランスポーター）、メンバー１）、ＩＬ２ＲＡ（インターロイキン２受容体、α）、ＣＣＬ５（ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド５）、ＩＲＦ１（インターフェロン調節因子１）、ＣＦＬＡＲ（ＣＡＳＰ８およびＦＡＤＤ様アポトーシス調節因子）、ＣＡＬＣＡ（カルシトニン関連ポリペプチドα）、ＥＩＦ４Ｅ（真核生物翻訳開始因子４Ｅ）、ＧＳＴＰ１（グルタチオンＳ－トランスフェラーゼπ１）、ＪＡＫ２（ヤヌスキナーゼ２）、ＣＹＰ３Ａ５（シトクロムＰ４５０、ファミリー３、サブファミリーＡ、ポリペプチド５）、ＨＳＰＧ２（ヘパラン硫酸プロテオグリカン２）、ＣＣＬ３（ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド３）、ＭＹＤ８８（ミエロイド分化一次応答遺伝子（８８））、ＶＩＰ（血管作動性腸管ペプチド）、ＳＯＡＴ１（ステロールＯ－アシルトランスフェラーゼ１）、ＡＤＲＢＫ１（アドレナリン作動性、β、受容体キナーゼ１）、ＮＲ４Ａ２（核内受容体サブファミリー４、グループＡ、メンバー２）、ＭＭＰ８（マトリックスメタロペプチダーゼ８（好中球コラゲナーゼ））、ＮＰＲ２（ナトリウム利尿ペプチド受容体Ｂ／グアニル酸シクラーゼＢ（心房性ナトリウム利尿ペプチド受容体Ｂ））、ＧＣＨ１（ＧＴＰシクロヒドロラーゼ１）、ＥＰＲＳ（グルタミル－プロリル－ｔＲＮＡシンテターゼ）、ＰＰＡＲＧＣ１Ａ（ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ、コアクチベーター１α）、Ｆ１２（凝固第ＸＩＩ因子（ハーゲマン因子））、ＰＥＣＡＭ１（血小板／内皮細胞接着分子）、ＣＣＬ４（ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド４）、ＳＥＲＰＩＮＡ３（セルピンペプチダーゼ阻害因子、クレードＡ（α－１アンチプロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー３）、ＣＡＳＲ（カルシウム感知受容体）、ＧＪＡ５（ギャップ結合タンパク質、α５、４０ｋＤａ）、ＦＡＢＰ２（脂肪酸結合タンパク質２、腸）、ＴＴＦ２（転写終結因子、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ）、ＰＲＯＳ１（プロテインＳ（α））、ＣＴＦ１（カルジオトロフィン１）、ＳＧＣＢ（サルコグリカン、β（４３ｋＤａジストロフィン関連糖タンパク質））、ＹＭＥ１Ｌ１（ＹＭＥ１様１（Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ））、ＣＡＭＰ（カテリシジン抗菌ペプチド）、ＺＣ３Ｈ１２Ａ（ジンクフィンガーＣＣＣＨ型含有１２Ａ）、ＡＫＲ１Ｂ１（アルド－ケトレダクターゼファミリー１、メンバーＢ１（アルドースレダクターゼ））、ＤＥＳ（デスミン）、ＭＭＰ７（マトリックスメタロペプチダーゼ７（マトリライシン、子宮））、ＡＨＲ（アリール炭化水素受容体）、ＣＳＦ１（コロニー刺激因子１（マクロファージ））、ＨＤＡＣ９（ヒストン脱アセチル化酵素９）、ＣＴＧＦ（結合組織成長因子）、ＫＣＮＭＡ１（大コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネル、サブファミリーＭ、αメンバー１）、ＵＧＴ１Ａ（ＵＤＰグルクロノシルトランスフェラーゼ１ファミリー、ポリペプチドＡ複合遺伝子座）、ＰＲＫＣＡ（プロテインキナーゼＣ、α）、ＣＯＭＴ（カテコール－β－メチルトランスフェラーゼ）、Ｓ１００Ｂ（Ｓ１００

カルシウム結合タンパク質Ｂ）、ＥＧＲ１（初期増殖応答１）、ＰＲＬ（プロラクチン）、ＩＬ１５（インターロイキン１５）、ＤＲＤ４（ドーパミン受容体Ｄ４）、ＣＡＭＫ２Ｇ（カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼＩＩγ）、ＳＬＣ２２Ａ２（溶質輸送担体ファミリー２２（有機カチオントランスポーター）、メンバー２）、ＣＣＬ１１（ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド１１）、ＰＧＦ（Ｂ３２１胎盤成長因子）、ＴＨＰＯ（トロンボポエチン）、ＧＰ６（糖タンパク質ＶＩ（血小板））、ＴＡＣＲ１（タキキニン受容体１）、ＮＴＳ（ニューロテンシン）、ＨＮＦ１Ａ（ＨＮＦ１ホメオボックスＡ）、ＳＳＴ（ソマトスタチン）、ＫＣＮＤ１（カリウム電位開口型チャネル、Ｓ

ｈａｌ関連サブファミリー、メンバー１）、ＬＯＣ６４６６２７（ホスホリパーゼ阻害因子）、ＴＢＸＡＳ１（トロンボキサンＡシンターゼ１（血小板））、ＣＹＰ２Ｊ２（シトクロムＰ４５０、ファミリー２、サブファミリーＪ、ポリペプチド２）、ＴＢＸＡ２Ｒ（トロンボキサンＡ２受容体）、ＡＤＨ１Ｃ（アルコールデヒドロゲナーゼ１Ｃ（クラスＩ）、γポリペプチド）、ＡＬＯＸ１２（アラキドン酸１２－リポキシゲナーゼ）、ＡＨＳＧ（α－２－ＨＳ－糖タンパク質）、ＢＨＭＴ（ベタイン－ホモシステインメチルトランスフェラーゼ）、ＧＪＡ４（ギャップ結合タンパク質、α４、３７ｋＤａ）、ＳＬＣ２５Ａ４（溶質輸送担体ファミリー２５（ミトコンドリア輸送担体；アデニンヌクレオチドトランスロケーター）、メンバー４）、ＡＣＬＹ（ＡＴＰクエン酸リアーゼ）、ＡＬＯＸ５ＡＰ（アラキドン酸５－リポキシゲナーゼ活性化タンパク質）、ＮＵＭＡ１（核有糸分裂装置タンパク質１）、ＣＹＰ２７Ｂ１（シトクロムＰ４５０、ファミリー２７、サブファミリーＢ、ポリペプチド１）、ＣＹＳＬＴＲ２（システイニルロイコトリエン受容体２）、ＳＯＤ３（スーパーオキシドジスムターゼ３、細胞外）、ＬＴＣ４Ｓ（ロイコトリエンＣ４シンターゼ）、ＵＣＮ（ウロコルチン）、ＧＨＲＬ（グレリン／オベスタチンプレプロペプチド）、ＡＰＯＣ２（アポリポタンパク質Ｃ－ＩＩ）、ＣＬＥＣ４Ａ（Ｃ型レクチンドメインファミリー４、メンバーＡ）、ＫＢＴＢＤ１０（ケルヒリピートおよびＢＴＢ（ＰＯＺ）ドメイン含有１０）、ＴＮＣ（テネイシンＣ）、ＴＹＭＳ（チミジル酸シンターゼ）、ＳＨＣｌ（ＳＨＣ（Ｓｒｃ相同性２ドメイン含有）形質転換タンパク質１）、ＬＲＰ１（低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１）、ＳＯＣＳ３（サイトカインシグナル伝達のサプレッサー３）、ＡＤＨ１Ｂ（アルコールデヒドロゲナーゼ１Ｂ（クラスＩ）、βポリペプチド）、ＫＬＫ３（カリクレイン関連ペプチダーゼ３）、ＨＳＤ１１Ｂ１（ヒドロキシステロイド（１１－β）デヒドロゲナーゼ１）、ＶＫＯＲＣ１（ビタミンＫエポキシドレダクターゼ複合体、サブユニット１）、ＳＥＲＰＩＮＢ２（セルピンペプチダーゼ阻害因子、クレードＢ（オボアルブミン）、メンバー２）、ＴＮＳ１（テンシン１）、ＲＮＦ１９Ａ（リングフィンガータンパク質１９Ａ）、ＥＰＯＲ（エリスロポエチン受容体）、ＩＴＧＡＭ（インテグリン、αＭ（補体成分３受容体３サブユニット））、ＰＩＴＸ２（ペアード様ホメオドメイン２）、ＭＡＰＫ７（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ７）、ＦＣＧＲ３Ａ（ＩｇＧのＦｃ断片、低親和性１１１ａ、受容体（ＣＤ１６ａ））、ＬＥＰＲ（レプチン受容体）、ＥＮＧ（エンドグリン）、ＧＰＸ１（グルタチオンペルオキシダーゼ１）、ＧＯＴ２（グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ２、ミトコンドリア（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ２））、ＨＲＨ１（ヒスタミン受容体Ｈ１）、ＮＲ１１２（核内受容体サブファミリー１、グループＩ、メンバー２）、ＣＲＨ（コルチコトロピン放出ホルモン）、ＨＴＲ１Ａ（５－ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体１Ａ）、ＶＤＡＣ１（電位依存性アニオンチャネル１）、ＨＰＳＥ（ヘパラナーゼ）、ＳＦＴＰＤ（サーファクタントタンパク質Ｄ）、ＴＡＰ２（トランスポーター２、ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＢ（ＭＤＲ／ＴＡＰ））、ＲＮＦ１２３（リングフィンガータンパク質１２３）、ＰＴＫ２Ｂ（ＰＴＫ２Ｂプロテインチロシンキナーゼ２β）、ＮＴＲＫ２（神経栄養チロシンキナーゼ、受容体、２型）、ＩＬ６Ｒ（インターロイキン６受容体）、ＡＣＨＥ（アセチルコリンエステラーゼ（Ｙｔ血液型））、ＧＬＰ１Ｒ（グルカゴン様ペプチド１受容体）、ＧＨＲ（成長ホルモン受容体）、ＧＳＲ（グルタチオンレダクターゼ）、ＮＱＯ１（ＮＡＤ（Ｐ）Ｈデヒドロゲナーゼ、キノン１）、ＮＲ５Ａ１（核内受容体サブファミリー５、グループＡ、メンバー１）、ＧＪＢ２（ギャップ結合タンパク質、β２、２６ｋＤａ）、ＳＬＣ９Ａ１（溶質輸送担体ファミリー９（ナトリウム／水素交換体）、メンバー１）、ＭＡＯＡ（モノアミンオキシダーゼＡ）、ＰＣＳＫ９（プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン９型）、ＦＣＧＲ２Ａ（ＩｇＧのＦｃ断片、低親和性ＩＩａ、受容体（ＣＤ３２））、ＳＥＲＰＩＮＦ１（セルピンペプチダーゼ阻害因子、クレードＦ（α－２抗プラスミン、色素上皮由来因子）、メンバー１）、ＥＤＮ３（エンドセリン３）、ＤＨＦＲ（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）、ＧＡＳ６（成長停止特異的６）、ＳＭＰＤ１（スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ１、酸性リソソーム）、ＵＣＰ２（脱共役タンパク質２（ミトコンドリア、プロトン担

体））、ＴＦＡＰ２Ａ（転写因子ＡＰ－２α（活性化エンハンサー結合タンパク質２α））、Ｃ４ＢＰＡ（補体成分４結合タンパク質、α）、ＳＥＲＰＩＮＦ２（セルピンペプチダーゼ阻害因子、クレードＦ（α－２抗プラスミン、色素上皮由来因子）、メンバー２）、ＴＹＭＰ（チミジンホスホリラーゼ）、ＡＬＰＰ（アルカリホスファターゼ、胎盤（リーガン（Ｒｅｇａｎ）アイソザイム））、ＣＸＣＲ２（ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）受容体２）、ＳＬＣ３９Ａ３（溶質輸送担体ファミリー３９（亜鉛トランスポーター）、メンバー３）、ＡＢＣＧ２（ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＧ（ＷＨＩＴＥ）、メンバー２）、ＡＤＡ（アデノシンデアミナーゼ）、ＪＡＫ３（ヤヌスキナーゼ３）、ＨＳＰＡ１Ａ（熱ショック７０ｋＤａタンパク質１Ａ）、ＦＡＳＮ（脂肪酸シンターゼ）、ＦＧＦ１（線維芽細胞成長因子１（酸性））、Ｆ１１（凝固第ＸＩ因子）、ＡＴＰ７Ａ（ＡＴＰアーゼ、Ｃｕ＋＋輸送、αポリペプチド）、ＣＲ１（補体成分（３ｂ／４ｂ）受容体１（Ｋｎｏｐｓ血液型））、ＧＦＡＰ（グリア線維性酸性タンパク質）、ＲＯＣＫ１（Ｒｈｏ関連、コイルドコイル含有プロテインキナーゼ１）、ＭＥＣＰ２（メチルＣｐＧ結合タンパク質２（レット症候群））、ＭＹＬＫ（ミオシン軽鎖キナーゼ）、ＢＣＨＥ（ブチリルコリンエステラーゼ）、ＬＩＰＥ（リパーゼ、ホルモン感受性）、ＰＲＤＸ５（ペルオキシレドキシン５）、ＡＤＯＲＡ１（アデノシンＡ１受容体）、ＷＲＮ（ウェルナー症候群、ＲｅｃＱヘリカーゼ様）、ＣＸＣＲ３（ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）受容体３）、ＣＤ８１（ＣＤ８１分子）、ＳＭＡＤ７（ＳＭＡＤファミリーメンバー７）、ＬＡＭＣ２（ラミニン、γ２）、ＭＡＰ３Ｋ５（マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼキナーゼ５）、ＣＨＧＡ（クロモグラニンＡ（副甲状腺分泌タンパク質１））、ＩＡＰＰ（膵島アミロイドポリペプチド）、ＲＨＯ（ロドプシン）、ＥＮＰＰ１（エクトヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼ１）、ＰＴＨＬＨ（副甲状腺ホルモン様ホルモン）、ＮＲＧ１（ニューレグリン１）、ＶＥＧＦＣ（血管内皮増殖因子Ｃ）、ＥＮＰＥＰ（グルタミルアミノペプチダーゼ（アミノペプチダーゼＡ））、ＣＥＢＰＢ（ＣＣＡＡＴ／エンハンサー結合タンパク質（Ｃ／ＥＢＰ）、β）、ＮＡＧＬＵ（Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼ、α－）、Ｆ２ＲＬ３（凝固第ＩＩ因子（トロンビン）受容体様３）、ＣＸ３ＣＬ１（ケモカイン（Ｃ－Ｘ３－Ｃモチーフ）リガンド１）、ＢＤＫＲＢ１（ブラジキニン受容体Ｂ１）、ＡＤＡＭＴＳ１３（トロンボスポンジン１型モチーフを有するＡＤＡＭメタロペプチダーゼ、１３）、ＥＬＡＮＥ（エラスターゼ、好中球発現）、ＥＮＰＰ２（エクトヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼ２）、ＣＩＳＨ（サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質）、ＧＡＳＴ（ガストリン）、ＭＹＯＣ（ミオシリン、小柱網誘導性グルココルチコイド応答）、ＡＴＰ１Ａ２（ＡＴＰアーゼ、Ｎａ＋／Ｋ＋輸送、α２ポリペプチド）、ＮＦ１（ニューロフィブロミン１）、ＧＪＢ１（ギャップ結合タンパク質、β１、３２ｋＤａ）、ＭＥＦ２Ａ（筋細胞エンハンサー因子２Ａ）、ＶＣＬ（ビンキュリン）、ＢＭＰＲ２（骨形成タンパク質受容体、ＩＩ型（セリン／スレオニンキナーゼ））、ＴＵＢＢ（チューブリン、β）、ＣＤＣ４２（細胞分裂周期４２（ＧＴＰ結合タンパク質、２５ｋＤａ））、ＫＲＴ１８（ケラチン１８）、ＨＳＦ１（熱ショック転写因子１）、ＭＹＢ（ｖ－ｍｙｂ骨髄芽球症ウイルス癌遺伝子ホモログ（トリ））、ＰＲＫＡＡ２（プロテインキナーゼ、ＡＭＰ活性化、α２触媒サブユニット）、ＲＯＣＫ２（Ｒｈｏ関連、コイルドコイル含有プロテインキナーゼ２）、ＴＦＰＩ（組織因子経路阻害因子（リポタンパク質関連凝固阻害因子））、ＰＲＫＧ１（プロテインキナーゼ、ｃＧＭＰ依存性、Ｉ型）、ＢＭＰ２（骨形成タンパク質２）、ＣＴＮＮＤ１（カテニン（カドヘリン関連タンパク質）、δ１）、ＣＴＨ（シスタチオナーゼ（シスタチオニンγ－リアーゼ））、ＣＴＳＳ（カテプシンＳ）、ＶＡＶ２（ｖａｖ　２グアニンヌクレオチド交換因子）、ＮＰＹ２Ｒ（ニューロペプチドＹ受容体Ｙ２）、ＩＧＦＢＰ２（インスリン様成長因子結合タンパク質２、３６ｋＤａ）、ＣＤ２８（ＣＤ２８分子）、ＧＳＴＡ１（グルタチオンＳ－トランスフェラーゼα１）、ＰＰＩＡ（ペプチジルプロリルイソメラーゼＡ（シクロフィリンＡ））、ＡＰＯＨ（アポリポタンパク質Ｈ（β－２－糖タンパク質Ｉ））、Ｓ１００Ａ８（Ｓ１００カルシウム結合タンパク質Ａ８）、ＩＬ１１（インターロイキン１１）、ＡＬＯＸ１５（アラキドン酸１５－リポキシゲナーゼ）、

ＦＢＬＮ１（フィビュリン１）、ＮＲ１Ｈ３（核内受容体サブファミリー１、グループＨ、メンバー３）、ＳＣＤ（ステアロイル－ＣｏＡデサチュラーゼ（Δ－９－デサチュラーゼ））、ＧＩＰ（胃抑制ポリペプチド）、ＣＨＧＢ（クロモグラニンＢ（セクレトグラニン１））、ＰＲＫＣＢ（プロテインキナーゼＣ、β）、ＳＲＤ５Ａ１（ステロイド－５－アルファ－レダクターゼ、αポリペプチド１（３－オキソ－５α－ステロイドΔ４－デヒドロゲナーゼα１））、ＨＳＤ１１Ｂ２（ヒドロキシステロイド（１１－β）デヒドロゲナーゼ２）、ＣＡＬＣＲＬ（カルシトニン受容体様）、ＧＡＬＮＴ２（ＵＤＰ－Ｎ－アセチル－α－Ｄ－ガラクトサミン：ポリペプチドＮ－アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ２（ＧａｌＮＡｃ－Ｔ２））、ＡＮＧＰＴＬ４（アンギオポエチン様４）、ＫＣＮＮ４（カリウム中間体／小コンダクタンスカルシウム活性化チャネル、サブファミリーＮ、メンバー４）、ＰＩＫ３Ｃ２Ａ（ホスホイノシチド－３－キナーゼ、クラス２、αポリペプチド）、ＨＢＥＧＦ（ヘパリン結合ＥＧＦ様成長因子）、ＣＹＰ７Ａ１（シトクロムＰ４５０、ファミリー７、サブファミリーＡ、ポリペプチド１）、ＨＬＡ－ＤＲＢ５（主要組織適合遺伝子複合体、クラスＩＩ、ＤＲ　β　５）、ＢＮＩＰ３（ＢＣＬ２／アデノウイルスＥ１Ｂ　１９ｋＤａ相互作用タンパク質３）、ＧＣＫＲ（グルコキナーゼ（ヘキソキナーゼ４）調節因子）、Ｓ１００Ａ１２（Ｓ１００カルシウム結合タンパク質Ａ１２）、ＰＡＤＩ４（ペプチジルアルギニンデイミナーゼ、ＩＶ型）、ＨＳＰＡ１４（熱ショック７０ｋＤａタンパク質１４）、ＣＸＣＲ１（ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）受容体１）、Ｈ１９（Ｈ１９、刷り込み母性発現転写物（非タンパク質コード））、ＫＲＴＡＰ１９－３（ケラチン関連タンパク質１９－３）、ＩＤＤＭ２（インスリン依存性真性糖

尿病２）、ＲＡＣ２（ｒａｓ関連Ｃ３ボツリヌス毒素基質２（ｒｈｏファミリー、低分子ＧＴＰ結合タンパク質Ｒａｃ２））、ＲＹＲ１（リアノジン受容体１（骨格））、ＣＬＯＣＫ（時計ホモログ（マウス））、ＮＧＦＲ（神経成長因子受容体（ＴＮＦＲスーパーファミリー、メンバー１６））、ＤＢＨ（ドーパミンβ－ヒドロキシラーゼ（ドーパミンβ－モノオキシゲナーゼ））、ＣＨＲＮＡ４（コリン作動性受容体、ニコチン性、α４）、ＣＡＣＮＡ１Ｃ（カルシウムチャネル、電位依存性、Ｌ型、α１Ｃサブユニット）、ＰＲＫＡＧ２（プロテインキナーゼ、ＡＭＰ活性化、γ２非触媒サブユニット）、ＣＨＡＴ（コリンアセチルトランスフェラーゼ）、ＰＴＧＤＳ（プロスタグランジンＤ２シンターゼ２１ｋＤａ（脳））、ＮＲ１Ｈ２（核内受容体サブファミリー１、グループＨ、メンバー２）、ＴＥＫ（ＴＥＫチロシンキナーゼ、内皮）、ＶＥＧＦＢ（血管内皮増殖因子Ｂ）、ＭＥＦ２Ｃ（筋細胞エンハンサー因子２Ｃ）、ＭＡＰＫＡＰＫ２（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ活性化プロテインキナーゼ２）、ＴＮＦＲＳＦ１１Ａ（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー１１ａ、ＮＦＫＢアクチベータ）、ＨＳＰＡ９（熱ショック７０ｋＤａタンパク質９（モルタリン））、ＣＹＳＬＴＲ１（システイニルロイコトリエン受容体１）、ＭＡＴ１Ａ（メチオニンアデノシルトランスフェラーゼＩ、α）、ＯＰＲＬ１（オピエート受容体様１）、ＩＭＰＡ１（イノシトール（ｍｙｏ）－１（または４）－モノホスファターゼ１）、ＣＬＣＮ２（クロライドチャネル２）、ＤＬＤ（ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ）、ＰＳＭＡ６（プロテアソーム（プロソーム、マクロパイン（ｍａｃｒｏｐａｉｎ））サブユニット、α型、６）、ＰＳＭＢ８（プロテアソーム（プロソーム、マクロパイン）サブユニット、β型、８（大型多機能ペプチダーゼ７））、ＣＨＩ３Ｌ１（キチナーゼ３様１（軟骨糖タンパク質－３９））、ＡＬＤＨ１Ｂ１（アルデヒドデヒドロゲナーゼ１ファミリー、メンバーＢ１）、ＰＡＲＰ２（ポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼ２）、ＳＴＡＲ（ステロイド産生急性調節タンパク質）、ＬＢＰ（リポ多糖結合タンパク質）、ＡＢＣＣ６（ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＣ（ＣＦＴＲ／ＭＲＰ）、メンバー６）、ＲＧＳ２（Ｇタンパク質シグナル伝達の調節因子２、２４ｋＤａ）、ＥＦＮＢ２（エフリン－Ｂ２）、ＧＪＢ６（ギャップ結合タンパク質、β６、３０ｋＤａ）、ＡＰＯＡ２（アポリポタンパク質Ａ－ＩＩ）、ＡＭＰＤ１（アデノ

シン一リン酸デアミナーゼ１）、ＤＹＳＦ（ジスフェリン、肢帯型筋ジストロフィー２Ｂ（常染色体劣性遺伝））、ＦＤＦＴ１（ファルネシル二リン酸ファルネシルトランスフェラーゼ１）、ＥＤＮ２（エンドセリン２）、ＣＣＲ６（ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体６）、ＧＪＢ３（ギャップ結合タンパク質、β３、３１ｋＤａ）、ＩＬ１ＲＬ１（インターロイキン１受容体様１）、ＥＮＴＰＤ１（エクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドロラーゼ１）、ＢＢＳ４（バルデー－ビードル症候群４）、ＣＥＬＳＲ２（カドヘリン、ＥＧＦ　ＬＡＧ７回膜貫通型Ｇ型受容体２（フラミンゴホモログ、ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））、Ｆ１１Ｒ（Ｆ１１受容体）、ＲＡＰＧＥＦ３（Ｒａｐグアニンヌクレオチド交換因子（ＧＥＦ）３）、ＨＹＡＬ１（ヒアルロノグルコサミニダーゼ１）、ＺＮＦ２５９（ジンクフィンガータンパク質２５９）、ＡＴＯＸ１（ＡＴＸ１抗酸化タンパク質１ホモログ（酵母））、ＡＴＦ６（活性化転写因子６）、ＫＨＫ（ケトヘキソキナーゼ（フルクトキナーゼ））、ＳＡＴ１（スペルミジン／スペルミンＮ１－アセチルトランスフェラーゼ１）、ＧＧＨ（γ－グルタミルヒドロラーゼ（コンジュガーゼ、ホリルポリγグルタミルヒドロラーゼ））、ＴＩＭＰ４（ＴＩＭＰメタロペプチダーゼ阻害因子４）、ＳＬＣ４Ａ４（溶質輸送担体ファミリー４、ナトリウム・炭酸水素イオン共輸送体、メンバー４）、ＰＤＥ２Ａ（ホスホジエステラーゼ２Ａ、ｃＧＭＰ刺激性）、ＰＤＥ３Ｂ（ホスホジエステラーゼ３Ｂ、ｃＧＭＰ阻害性）、ＦＡＤＳ１（脂肪酸デサチュラーゼ１）、ＦＡＤＳ２（脂肪酸デサチュラーゼ２）、ＴＭＳＢ４Ｘ（チモシンβ４、Ｘ連鎖）、ＴＸＮＩＰ（チオレドキシン相互作用タンパク質）、ＬＩＭＳ１（ＬＩＭおよび老化細胞抗原様ドメイン１）、ＲＨＯＢ（ｒａｓホモログ遺伝子ファミリー、メンバーＢ）、ＬＹ９６（リンパ球抗原９６）、ＦＯＸＯ１（フォークヘッドボックスＯ１）、ＰＮＰＬＡ２（パタチン様ホスホリパーゼドメイン含有２）、ＴＲＨ（サイロトロピン放出ホルモン）、ＧＪＣ１（ギャップ結合タンパク質、γ１、４５ｋＤａ）、ＳＬＣ１７Ａ５（溶質輸送担体ファミリー１７（アニオン／糖輸送体）、メンバー５）、ＦＴＯ（体脂肪量および肥満関連）、ＧＪＤ２（ギャップ結合タンパク質、δ２、３６ｋＤａ）、ＰＳＲＣ１（プロリン／セリンリッチコイルドコイル１）、ＣＡＳＰ１２（カスパーゼ１２（遺伝子／偽遺伝子））、ＧＰＢＡＲ１（Ｇタンパク質共役型胆汁酸受容体１）、ＰＸＫ（ＰＸドメイン含有セリン／スレオニンキナーゼ）、ＩＬ３３（インターロイキン３３）、ＴＲＩＢ１（トリブルズ（ｔｒｉｂｂｌｅｓ）ホモログ１（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））、ＰＢＸ４（プレＢ細胞白血病ホメオボックス４）、ＮＵＰＲ１（核タンパク質、転写調節因子、１）、１５－Ｓｅｐ（１５ｋＤａ　セレノプロテイン）、ＣＩＬＰ２（軟骨中間層タンパク質２）、ＴＥＲＣ（テロメラーゼＲＮＡ成分）、ＧＧＴ２（γ－グルタミルトランスフェラーゼ２）、ＭＴ－ＣＯ１（ミトコンドリアにコードされたシトクロムｃオキシダーゼＩ）、およびＵＯＸ（尿酸オキシダーゼ、偽遺伝子）を含み得る。

【０４４７】

さらなる実施形態において、染色体配列は、Ｐｏｎ１（パラオキソナーゼ１）、ＬＤＬＲ（ＬＤＬ受容体）、ＡｐｏＥ（アポリポタンパク質Ｅ）、ＡｐｏＢ－１００（アポリポタンパク質Ｂ－１００）、ＡｐｏＡ（アポリポタンパク質（ａ））、ＡｐｏＡ１（アポリポタンパク質Ａ１）、ＣＢＳ（シスタチオニン（ｃｙｓｔａｔｈｉｏｎｅ）Ｂ－シンターゼ）、糖タンパク質ＩＩｂ／ＩＩｂ、ＭＴＨＲＦ（５，１０－メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（ＮＡＤＰＨ）、およびそれらの組み合わせからさらに選択され得る。一つの反復では、心血管疾患に関与する染色体配列および染色体配列によりコードされるタンパク質は、Ｃａｃｎａ１Ｃ、Ｓｏｄ１、Ｐｔｅｎ、Ｐｐａｒ（α）、ＡｐｏＥ、レプチン、およびそれらの組み合わせから選択され得る。

【０４４８】

腎臓

本発明はまた、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を腎臓に送達することも企図する。治療用核酸の細胞取込みを誘導するための送達戦略には、物理的力またはベクター系、例えばウイルスベース、脂質ベースまたは複合体ベースの送達、またはナノ担体が含まれる。核酸が流

体力学的高圧注入で全身的に腎細胞に送られたとき見込まれる臨床的意義が低い初期の適用以降、種々の動物腎疾患モデルにおいてインビボで転写後イベントを標的化するため幅広い遺伝子治療ウイルスおよび非ウイルス担体が既に適用されている（Ｃｓａｂａ Ｒｅｖｅｓｚ ａｎｄ Ｐｅｔｅｒ Ｈａｍａｒ（２０１１）、「腎臓においてＲＮＡを標的化する送達方法（Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｔｏ Ｔａｒｇｅｔ ＲＮＡｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｋｉｄｎｅｙ）」、Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｐｒｏｆ．Ｃｈｕｎｓｈｅｎｇ Ｋａｎｇ（Ｅｄ．），ＩＳＢＮ：９７８－９５３－３０７－５４１－９、ＩｎＴｅｃｈ、以下から入手可能：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｎｔｅｃｈｏｐｅｎ．ｃｏｍ／ｂｏｏｋｓ／ｇｅｎｅ－ｔｈｅｒａｐｙ－ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ／ｄｅｌｉｖｅｒｙ－ｍｅｔｈｏｄｓ－ｔｏ－ｔａｒｇｅｔ－ｒｎａｓ－ｉｎ－ｔｈｅ－ｋｉｄｎｅｙ）。腎臓に対する送達方法は、以下のとおり要約される：

【０４４９】

【表６】

送達方法	担体	標的 RNA	疾患	モデル	機能アッセイ	著者
流体力学的/脂質	TransIT インビボ遺伝子送達システム、DOTAP	p85α	急性腎傷害	虚血再灌流	取り込み、体内分布	Larson et al., Surgery, (Aug 2007), Vol. 142, No. 2, pp. (262-269)
流体力学的/脂質	リポフェクタミン 2000	Fas	急性腎傷害	虚血再灌流	血中尿素窒素、Fas 免疫組織化学、アポトーシス、組織学的スコアリング	Hamar et al., Proc Natl Acad Sci, (Oct 2004), Vol. 101, No. 41, pp. (14883-14888)
流体力学的	n.a.	アポトーシスカスケードエレメント	急性腎傷害	虚血再灌流	n.a.	Zheng et al., Am J Pathol, (Oct 2008), Vol. 173, No. 4, pp. (973–980)
流体力学的	n.a.	核内因子 κ-b (NFkB)	急性腎傷害	虚血再灌流	n.a.	Feng et al., Transplantation, (May 2009), Vol. 87, No. 9, pp. (1283–1289)

【０４５０】

【表７】

送達方法	担体	標的 RNA	疾患	モデル	機能アッセイ	著者
流体力学的 / ウイルス	リポフェクタミン 2000	アポトーシス拮抗転写因子 (AATF)	急性腎傷害	虚血再灌流	アポトーシス、酸化的ストレス、カスパーゼ活性化、膜脂質過酸化	Xie & Guo, Am Soc Nephrol, (Dec 2006), Vol. 17, No. 12, pp. (3336–3346)
流体力学的	pBAsi mU6 Neo/ TransIT-EE 流体力学的送達システム	グレムリン	糖尿病性腎症	ストレプトゾトシン (Streptozotozin)誘発性糖尿病	タンパク尿、血清クレアチニン、糸球体および尿細管直径、コラーゲン IV 型/BMP7 発現	Q. Zhang et al., PloS ONE, (Jul 2010), Vol. 5, No. 7, e11709, pp. (1-13)
ウイルス/脂質	pSUPER ベクター/リポフェクタミン	TGF-β II 型受容体	間質性腎線維症	一側性尿道閉塞	α-SMA 発現、コラーゲン含有量	Kushibikia et al., J Controlled Release, (Jul 2005), Vol. 105, No. 3, pp. (318-331)
ウイルス	アデノ随伴ウイルス-2	ミネラルコルチコイド受容体	高血圧が引き起こす腎損傷	寒冷誘発性高血圧症	血圧、血清アルブミン、血清尿素窒素、血清クレアチニン、腎臓重量、尿中ナトリウム	Wang et al., Gene Therapy, (Jul 2006), Vol. 13, No. 14, pp. (1097-1103)
流体力学的 / ウイルス	pU6 ベクター	ルシフェラーゼ	n.a.	n.a.	取り込み	Kobayashi et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, (Feb 2004), Vol. 308, No. 2, pp. (688-693)
脂質	リポタンパク質、アルブミン	apoB1, apoM	n.a.	n.a.	取り込み、リポタンパク質およびアルブミンに対する結合親和性	Wolfrum et al., Nature Biotechnology, (Sep 2007), Vol. 25, No. 10, pp. (1149-1157)
脂質	リポフェクタミン 2000	p53	急性腎傷害	虚血性およびシスプラチン誘発性急性外傷	組織学的スコアリング、アポトーシス	Molitoris et al., J Am Soc Nephrol, (Aug 2009), Vol. 20, No. 8, pp. (1754-1764)
脂質	DOTAP/DOPE、DOTAP/DOPE/DOPE-PEG2000	COX-2	乳腺癌	MDA-MB-231 乳癌異種移植片を有するマウス	細胞生存度、取り込み	Mikhaylova et al., Cancer Gene Therapy, (Mar 2011), Vol. 16, No. 3, pp. (217-226)
脂質	コレステロール	12/15-リポキシゲナーゼ	糖尿病性腎症	ストレプトゾトシン誘発性糖尿病	アルブミン尿、尿中クレアチニン、組織学、I型および IV 型コラーゲン、TGF-β、フィブロネクチン、プラスミノーゲンアクチベータ阻害因子 1	Yuan et al., Am J Physiol Renal Physiol, (Jun 2008), Vol. 295, pp. (F605-F617)

【０４５１】

【表８】

送達方法	担体	標的 RNA	疾患	モデル	機能アッセイ	著者
脂質	リポフェクタミン 2000	ミトコンドリア膜 44 (TIM44)	糖尿病性腎症	ストレプトゾトシン誘発性糖尿病	細胞増殖およびアポトーシス、組織学、ROS、Mn-SOD およびグルタチオンペルオキシダーゼのミトコンドリアインポート、細胞膜分極	Y. Zhang et al., J Am Soc Nephrol, (Apr 2006), Vol. 17, No. 4, pp. (1090–1101)
流体力学的/脂質	プロテオリポソーム	RLIP76	腎癌	Caki-2 腎癌異種移植片を有するマウス	取り込み	Singhal et al., Cancer Res, (May 2009), Vol. 69, No. 10, pp. (4244-4251)
ポリマー	PEG 化 PEI	ルシフェラーゼ pGL3	n.a.	n.a.	取り込み、体内分布、赤血球凝集	Malek et al., Toxicology and Applied Pharmacology, (Apr 2009), Vol. 236, No. 1, pp. (97-108)
ポリマー	PEG 化ポリ-L-リジン	MAPK1	ループス糸球体腎炎	糸球体腎炎	タンパク尿、糸球体硬化症、TGF-β、フィブロネクチン、プラスミノーゲンアクチベータ阻害因子 1	Shimizu et al., J Am Soc Nephrology, (Apr 2010), Vol. 21, No. 4, pp. (622-633)
ポリマー/ナノ粒子	ヒアルロン酸/量子ドット/ PEI	VEGF	腎癌/メラノーマ	B16F1 メラノーマ腫瘍を有するマウス	体内分布、細胞毒性、腫瘍容積、エンドサイトーシス	Jiang et al., Molecular Pharmaceutics, (May-Jun 2009), Vol. 6, No. 3, pp. (727-737)
ポリマー/ナノ粒子	PEG 化ポリカプロラクトンナノファイバー	GAPDH	n.a.	n.a.	細胞生存度、取り込み	Cao et al, J Controlled Release, (Jun 2010), Vol. 144, No. 2, pp. (203-212)
アプタマー	スピーゲルマー (Spiegelmer) mNOX-E36	CC ケモカインリガンド 2	糸球体硬化症	一側性腎摘出マウス	尿中アルブミン、尿中クレアチニン、組織病理学、糸球体濾過率、マクロファージ数、血清 Ccl2、Mac- 2+、Ki-67+	Ninichuk et al., Am J Pathol, (Mar 2008), Vol. 172, No. 3, pp. (628-637)
アプタマー	アプタマー NOX-F37	バソプレッシン (AVP)	うっ血性心不全	n.a.	D-AVP に対する結合親和性、AVP シグナル伝達の阻害、尿浸透圧および尿中ナトリウム濃度	Purschke et al., Proc Natl Acad Sci, (Mar 2006), Vol. 103, No. 13, pp. (5173-5178)

【０４５２】

Ｙｕａｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｍ　Ｊ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　Ｒｅｎａｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ　２９５：Ｆ６０５－Ｆ６１７，２００８）は、アラキドン酸代謝の１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯ）経路を標的にする低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）のインビボ送達が、ストレプトゾトシンを注射した１型糖尿病マウスモデルにおいて腎損傷および糖尿病性腎症（ＤＮ）を改善し得るかどうかを調べた。腎臓においてより多くのインビボ到達およびｓｉＲＮＡ発現を達成するため、Ｙｕａｎ　ｅｔ　ａｌ．は、コレステロールとコンジュゲートした二本鎖１２／１５－ＬＯ　ｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチドを使用した。約４００μｇのｓｉＲＮＡがマウスに皮下注入された。Ｙｕａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．の方法は、ヒトに対する腎臓への送達にコレステロールとコンジュゲートしたＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの１～２ｇの皮下注射を企図して本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適用し得る。

【０４５３】

Ｍｏｌｉｔｏｒｉｓ ｅｔ ａｌ.（Ｊ Ａｍ Ｓｏｃ Ｎｅｐｈｒｏｌ ２０：１７５４－１７６４，２００９）は、腎臓内におけるオリゴヌクレオチド再吸収部位として近位尿細管細胞（ＰＴＣ）を利用して、アポトーシス経路の中心的タンパク質であるｐ５３に標的化されたｓｉＲＮＡの腎損傷予防に対する有効性を試験した。虚血性傷害の４時間後に静脈内注射されたｐ５３に対するネイキッド合成ｓｉＲＮＡが、ＰＴＣおよび腎機能の両方を最大限保護した。Ｍｏｌｉｔｏｒｉｓ ｅｔ ａｌ.のデータは、静脈内投与後に近位尿細管細胞に対するｓｉＲＮＡの急速な送達が起こることを示している。用量反応分析のため、ラットに０．３３；１、３、または５ｍｇ／ｋｇの用量のｓｉＰ５３を同じ４時点で与え、それぞれ１．３２；４、１２、および２０ｍｇ／ｋｇの累積用量となるように注射した。試験した全てのｓｉＲＮＡ用量が１日目にＳＣｒ低下効果を生じ、より高い用量では、ＰＢＳ治療した虚血対照ラットと比較して約５日間にわたり有効であった。１２および２０ｍｇ／ｋｇの累積用量が最良の保護効果をもたらした。Ｍｏｌｉｔｏｒｉｓ ｅｔ ａｌ.の方法は、ヒトに対する腎臓への送達に１２および２０ｍｇ／ｋｇの累積用量を企図して本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に適用し得る。

【０４５４】

Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ.（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｖｏｌｕｍｅ ２２，Ｎｕｍｂｅｒ ４，２０１２）は、げっ歯類および非ヒト霊長類における静脈内投与後の合成低分子干渉ＲＮＡ Ｉ５ＮＰの毒性および薬物動態特性を報告している。Ｉ５ＮＰは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）経路を介して作用することによりアポトーシス促進タンパク質ｐ５３の発現を一時的に阻害するように設計され、急性虚血／再灌流傷害、例えば大規模な心臓手術の間に起こり得る急性腎損傷および腎移植後に起こり得る臓器移植後臓器機能障害などから細胞を保護するために開発されている。有害作用を誘発するにはげっ歯類で８００ｍｇ／ｋｇ Ｉ５ＮＰ、および非ヒト霊長類で１，０００ｍｇ／ｋｇ Ｉ５ＮＰの用量が必要で、これはサルでは、補体の準臨床的活性化および凝固時間の僅かな増加を含む血液に対する効果を導くことが特定された。ラットでは、Ｉ５ＮＰのラット類似体でさらなる有害作用は観察されなかったことから、これらの作用が、Ｉ５ＮＰの意図される薬理活性に関連する毒性というよりむしろ、合成ＲＮＡ二重鎖のクラス作用に相当する可能性が高いことが示される。まとめると、これらのデータは、急性虚血／再灌流傷害後の腎機能の保全に対するＩ５ＮＰの静脈内投与の臨床試験を裏付けている。サルにおける無毒性量（ＮＯＡＥＬ）は５００ｍｇ／ｋｇであった。サルにおいて最大２５ｍｇ／ｋｇまでの用量レベルで静脈内投与した後、心血管、呼吸器、および神経学的パラメータに対する作用は観察されなかった。従って、同程度の投薬量が、ヒトの腎臓に対するＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの静脈内投与に企図され得る。

【０４５５】

Ｓｈｉｍｉｚｕ ｅｔ ａｌ.（Ｊ Ａｍ Ｓｏｃ Ｎｅｐｈｒｏｌ ２１：６２２－６３３，２０１０）は、ポリ（エチレングリコール）－ポリ（Ｌ－リジン）ベースのビヒクルによってｓｉＲＮＡを糸球体に標的送達するシステムを開発した。ｓｉＲＮＡ／ナノ担体複合体は直径が約１０～２０ｎｍで、複合体が有窓内皮を通過してメサンギウムに到達することを可能にし得るサイズであった。蛍光標識ｓｉＲＮＡ／ナノ担体複合体を腹腔内注射した後、Ｓｈｉｍｉｚｕ ｅｔ ａｌ.は血液循環中に長時間にわたりｓｉＲＮＡを検出した。マイトジェン活性化プロテインキナーゼ１（ＭＡＰＫ１）ｓｉＲＮＡ／ナノ担体複合体の反復腹腔内投与により、糸球体腎炎マウスモデルにおいて糸球体ＭＡＰＫ１ｍＲＮＡおよびタンパク質発現が抑制された。ｓｉＲＮＡ蓄積を調べるため、ＰＩＣナノ担体と複合体化したＣｙ５標識ｓｉＲＮＡ（０．５ｍｌ、５ｎｍｏｌのｓｉＲＮＡ含有量）、ネイキッドＣｙ５標識ｓｉＲＮＡ（０．５ｍｌ、５ｎｍｏｌ）、またはＨＶＪ－Ｅに封入したＣｙ５標識ｓｉＲＮＡ（０．５ｍｌ、５ｎｍｏｌのｓｉＲＮＡ含有量）をＢＡＬＢ－ｃマウスに投与した。Ｓｈｉｍｉｚｕ ｅｔ ａｌ.の方法は、ヒトに対する腎臓への腹腔内投与および送達に約１～２リットル中ナノ担体と複合体化した約１０～２０μｍｏｌ ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの用量を企図して本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に適用し得る。

【０４５６】
肺
本発明はまた、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を一方または両方の肺に送達することも企図する。
【０４５７】
当初はＡＡＶ－２ベースのベクターがＣＦ気道に対するＣＦＴＲ送達に提案されたが、他の血清型、例えばＡＡＶ－１、ＡＡＶ－５、ＡＡＶ－６、およびＡＡＶ－９が種々の肺上皮モデルにおいて遺伝子導入効率の向上を呈している（例えば、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１７　ｎｏ．１２，２０６７－２０７７　Ｄｅｃ　２００９を参照のこと）。ＡＡＶ－１は、インビトロ，５でのヒト気道上皮細胞への形質導入効率がＡＡＶ－２およびＡＡＶ－５と比べて約１００倍高く、しかしながらマウス気管気道上皮についてはＡＡＶ－１はインビボでＡＡＶ－５と同等の効率で形質導入したことが実証された。他の試験から、ＡＡＶ－５はＡＡＶ－２と比べてインビトロでのヒト気道上皮（ＨＡＥ）に対する遺伝子送達の効率が５０倍高く、インビボでマウス肺気道上皮における効率が有意に高いことが示されている。ＡＡＶ－６もまた、インビトロでのヒト気道上皮細胞およびインビボ．８でのマウス気道における効率がＡＡＶ－２と比べて高いことが示されている。最近の分離株ＡＡＶ－９は、インビボでマウス鼻上皮および肺胞上皮においてＡＡＶ－５より高い遺伝子導入効率を示すことが示され、９ヶ月間にわたり遺伝子発現が検出されたことから、ＣＦＴＲ遺伝子送達ベクターにとって望ましい特性であるインビボでの長期遺伝子発現がＡＡＶで実現し得ることが示唆される。さらに、ＡＡＶ－９は、ＣＦＴＲ発現の損失なしにかつ免疫学的帰結を最小限に抑えてマウス肺に再投与し得ることが実証された。ＣＦおよび非ＣＦ　ＨＡＥ培養物の頂端表面に１００μｌのＡＡＶベクターを数時間接種し得る（例えば、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１７　ｎｏ．１２，２０６７－２０７７　Ｄｅｃ　２００９を参照のこと）。ＭＯＩは、ウイルス濃度および実験の目的に応じて1×10^{3}から4×10^{5}ベクターゲノム／細胞まで異なり得る。上記に引用したベクターは、本発明の送達および／または投与に企図される。
【０４５８】
Ｚａｍｏｒａ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｍ　Ｊ　Ｒｅｓｐｉｒ　Ｃｒｉｔ　Ｃａｒｅ　Ｍｅｄ　Ｖｏｌ　１８３．ｐｐ　５３１－５３８，２０１１）は、ヒト感染症の治療に対するＲＮＡ干渉治療薬の適用例、およびまた、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）に感染した肺移植レシピエントにおける抗ウイルス薬の無作為化試験を報告した。Ｚａｍｏｒａ　ｅｔ　ａｌ．は、ＲＳＶ気道感染症のＬＴＸレシピエントにおける無作為化二重盲検プラセボ対照試験を実施した。患者はＲＳＶに対する標準治療を受けることが許された。エアロゾル化したＡＬＮ－ＲＳＶ０１（０．６ｍｇ／ｋｇ）またはプラセボが毎日、３日間にわたり投与された。この試験は、ＲＳＶを標的化するＲＮＡｉ治療薬をＲＳＶ感染症のＬＴＸレシピエントに安全に投与し得ることを実証している。ＡＬＮ－ＲＳＶ０１の１日用量の３つは、気道症状の増悪または肺機能障害をもたらさず、かつサイトカインまたはＣＲＰの誘導などの全身性の炎症誘発効果を呈しなかった。薬物動態が吸入後に僅かな低い一過性の全身曝露を示したが、これは、静脈内投与されるかまたは吸入により投与されたＡＬＮ－ＲＳＶ０１がエキソヌクレアーゼ媒介性の消化および腎排泄によって循環から急速に消失することを示す前臨床動物データと一致している。Ｚａｍｏｒａ　ｅｔ　ａｌ．の方法は本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適用することができ、本発明にはエアロゾル化したＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓを例えば０．６ｍｇ／ｋｇの投薬量で企図することができる。
【０４５９】
ＣＦＴＲΔ５０８キメラガイドＲＮＡの例に関しては実施例２２を参照されたく、この実施例２２は、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子を使用した、嚢胞性線維症または嚢胞性線維症（ＣＦ）関連症状に罹患している、必要性のある対象または患者の気道におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の遺伝子導入または遺伝子送達を実証する。詳細には、嚢胞性線維症ΔＦ５０８突然変異の修復戦略が例示される。この種の戦略は全生物にわたり適用さ

れるはずである。特にＣＦに関連して、好適な患者には以下が含まれ得る：ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の家畜。この例では、本出願人らはＣａｓ９酵素を含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を利用してΔＦ５０８または他のＣＦＴＲ誘導突然変異を標的化した。

【０４６０】

この例における治療対象は、自発呼吸下で各肺につき薬学的に有効な量のエアロゾル化ＡＡＶベクター系の気管支内送達を受ける。このように、エアロゾル化送達は、一般にＡＡＶ送達に好ましい。送達にはアデノウイルスまたはＡＡＶ粒子が用いられ得る。各々が１つ以上の調節配列に作動可能に結合している好適な遺伝子構築物を送達ベクターにクローニングし得る。この例では、以下の構築物が例として提供される：Ｃａｓ９に対するＣｂｈまたはＥＦ１ａプロモーター、キメラガイドＲＮＡに対するＵ６またはＨ１プロモーター）：好ましい構成は、ＣＦＴＲΔ５０８を標的化するキメラガイド、ΔＦ５０８突然変異の修復テンプレートおよびコドン最適化されたＣａｓ９酵素（好ましいＣａｓ９は、ヌクレアーゼ活性またはニッカーゼ活性を有するものである）を、場合により１つ以上の核局在化シグナルまたは配列（ＮＬＳ）、例えば２つのＮＬＳを伴い使用することである。ＮＬＳを含まない構築物もまた想定される。

【０４６１】

Ｃａｓ９標的部位を同定するため、本出願人らはヒトＣＦＴＲゲノム遺伝子座を解析し、Ｃａｓ９標的部位を同定した。好ましくは、一般に、およびこのＣＦの場合、ＰＡＭはＮＧＧまたはＮＮＡＧＡＡＷモチーフを含み得る。

【０４６２】

従って、ＣＦの場合、本方法は、
組成物を発現させるため組成物を作動可能にコードする１つ以上のウイルスベクターを含むウイルスベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達すること
を含む目的ゲノム遺伝子座における標的配列の操作を含み、
ここでこの組成物は、
Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列であって、
（ａ）好適な哺乳類細胞におけるＣＦ標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、
（ｂ）ｔｒａｃｒメイト配列、および
（ｃ）ｔｒａｃｒ配列
を含むポリヌクレオチド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、および
ＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント、
［（ａ）、（ｂ）および（ｃ）は、５’から３’配向で配置されており、
成分ＩおよびＩＩは、系の同じまたは異なるベクター上にあり、
転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、および
ＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を含む。ＣＦに関して、好ましい標的ＤＮＡ配列はＣＦＴＲΔ５０８突然変異を含む。好ましいＰＡＭは上記に記載される。好ましいＣＲＩＳＰＲ酵素は任意のＣａｓ（本明細書に記載されるものであるが、特に実施例２２に記載されるもの）である。

【０４６３】

ＣＦに代わるものとしては任意の遺伝的障害が挙げられ、その例は周知されている。本発明の別の好ましい方法または使用は、ラフォラ病に関連することが特定されているＥＭＰ２ＡおよびＥＭＰ２Ｂ遺伝子の欠陥を補修するためのものである。

【０４６４】
一部の実施形態では、「ガイド配列」は「ガイドＲＮＡ」と異なり得る。ガイド配列は、ガイドＲＮＡの範囲内にある、標的部位を指定する約２０ｂｐの配列を指し得る。
【０４６５】
一部の実施形態では、Ｃａｓ９はＳｐＣａｓ９である（またはそれから誘導される）。かかる実施形態において、好ましい突然変異は、ＳｐＣａｓ９の１０位、７６２位、８４０位、８５４位、８６３位および／または９８６位または他のＣａｓ９における対応する位置（これは例えば標準的な配列比較ツールによって確かめることができる）の一部または全部にある。詳細には、ＳｐＣａｓ９において以下の突然変異の一部または全部が好ましい：Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａおよび／またはＤ９８６Ａ；ならびに代替アミノ酸のいずれかの保存的置換も想定される。他のＣａｓ９の対応する位置における同じ（またはこれらの突然変異の保存的置換）もまた好ましい。特にＳｐＣａｓ９ではＤ１０およびＨ８４０が好ましい。しかしながら、他のＣａｓ９では、ＳｐＣａｓ９　Ｄ１０およびＨ８４０に対応する残基もまた好ましい。これらはニッカーゼ活性を提供するため有利である。かかる突然変異は、ＣＦの治療のみならず、本発明の全ての態様に適用し得る。
【０４６６】
Ｓｃｈｗａｎｋ　ｅｔ　ａｌ．（Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ，１３：６５３－５８，２０１３）は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を使用してヒト幹細胞における嚢胞性線維症に関連する欠陥を補修した。このチームの標的は、イオンチャネル、嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス受容体（ＣＦＴＲ）の遺伝子であった。ＣＦＴＲにおける欠失は、嚢胞性線維症患者においてタンパク質の誤った折り畳みを引き起こす。Ｓｃｈｗａｎｋ　ｅｔ　ａｌ．は、２人の嚢胞性線維症小児由来の細胞試料から生じさせた培養腸幹細胞を使用して、挿入しようとする修復配列を含有するドナープラスミドと共にＣＲＩＳＰＲを使用して欠陥を補修することができた。この研究者らは、次に細胞を腸の「オルガノイド」、すなわち小型の腸に成長させ、それらが正常に機能することを示した。この例では、クローンオルガノイドの約半分に適切な遺伝的補修が起こった。
【０４６７】
筋肉
本発明はまた、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を筋肉に送達することも企図する。
【０４６８】
Ｂｏｒｔｏｌａｎｚａ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ｖｏｌ．１９　ｎｏ．１１，２０５５－２０６４　Ｎｏｖ．２０１１）は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）が発症した後のＦＲＧ１マウスにおけるＲＮＡ干渉発現カセットの全身送達が、毒性の徴候なしに用量依存的な長期ＦＲＧ１ノックダウンをもたらしたことを示している。Ｂｏｒｔｏｌａｎｚａ　ｅｔ　ａｌ．は、5×10^{12}ｖｇのｒＡＡＶ６－ｓｈ１ＦＲＧ１の単回静脈注射がＦＲＧ１マウスの筋組織病理および筋機能をレスキューすることを見出した。詳細には、生理溶液中に2×10^{12}または5×10^{12}ｖｇのベクターを含有する２００μｌを、２５ゲージＴｅｒｕｍｏシリンジを使用して尾静脈に注入した。Ｂｏｒｔｏｌａｎｚａ　ｅｔ　ａｌ．の方法を、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓを発現するＡＡＶに適用し、約2×10^{15}または2×10^{16}ｖｇのベクターの投薬量でヒトに注射し得る。
【０４６９】
Ｄｕｍｏｎｃｅａｕｘ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ｖｏｌ．１８　ｎｏ．５，８８１－８８７　Ｍａｙ　２０１０）は、ミオスタチン受容体ＡｃｖＲＩＩｂ　ｍＲＮＡを指向するＲＮＡ干渉（ｓｈ－ＡｃｖＲＩＩｂ）の技術を用いてミオスタチン経路を阻害する。擬似ジストロフィンの回復が、ベクター化したＵ７エクソンスキッピング技法（Ｕ７－ＤＹＳ）により媒介された。ｓｈ－ＡｃｖｒＩＩｂ構築物単独、Ｕ７－ＤＹＳ構築物単独、または両方の構築物の組み合わせのいずれかを担持するアデノ随伴ベクターが、ジストロフィーｍｄｘマウスの前脛骨（ＴＡ）筋に注入された。注入は

10^{11}個のＡＡＶウイルスゲノムで実施された。Ｄｕｍｏｎｃｅａｕｘ　ｅｔ　ａｌ．の方法は、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓを発現するＡＡＶに適用し、例えば約10^{14}～約10^{15}ｖｇのベクターの投薬量でヒトに注射し得る。

【０４７０】

Ｋｉｎｏｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．（Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ（２００８）１５，１１２６－１１３０）は、アテロコラーゲン（ＡＴＣＯＬ）を含む化学的に改変されていないｓｉＲＮＡのナノ粒子製剤を用いた正常または罹患マウスの骨格筋へのインビボｓｉＲＮＡ送達の有効性を報告する。骨格筋成長の負の調節因子であるミオスタチンを標的とするｓｉＲＮＡをＡＴＣＯＬの媒介によってマウス骨格筋または静脈内に局所適用することにより、投与後数週間以内に筋量の顕著な増加が生じた。これらの結果は、ＡＴＣＯＬの媒介によるｓｉＲＮＡの適用が、筋萎縮症を含む疾患に対するさらなる治療用途に強力なツールであることを含意する。Ｍｓｔ－ｓｉＲＮＡ（最終濃度１０ｍＭ）がＡＴＣＯＬ（局所投与用の最終濃度０．５％）（ＡｔｅｌｏＧｅｎｅ、高研、東京、日本）と、製造者の指示に従い混合された。ネンブタール（２５ｍｇ／ｋｇ、ｉ．ｐ．）によるマウス（２０週齢雄性Ｃ５７ＢＬ／６）の麻酔後、Ｍｓｔ－ｓｉＲＮＡ／ＡＴＣＯＬ複合体が咀嚼筋および大腿二頭筋に注入された。Ｋｉｎｏｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．の方法をＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓに適用し、ヒトに対して例えば約５００～１０００ｍｌの４０μＭ溶液の投薬量で筋肉に注射し得る。

【０４７１】

Ｈａｇｓｔｒｏｍ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　Ｖｏｌ．１０，Ｎｏ．２，Ａｕｇｕｓｔ　２００４）は、哺乳動物の四肢筋全体にわたる筋細胞（筋線維）に対する効率的かつ反復可能な核酸の送達を可能にする血管内非ウイルス方法を記載している。この手順には、ターニケットまたは血液測定用カフで一過性に遮断した肢の遠位静脈へのネイキッドプラスミドＤＮＡまたはｓｉＲＮＡの注入が含まれる。筋線維に対する核酸送達は、筋組織中への核酸溶液の溢出を可能にするのに十分な容積で急速注入することにより促進される。小型動物および大型動物の両方において、最小毒性で骨格筋における高度な導入遺伝子発現が達成された。四肢筋に対するｓｉＲＮＡ送達のエビデンスもまた得られた。アカゲザルに対するプラスミドＤＮＡ静脈注入では、各々単一のシリンジが装填された２つのシリンジポンプ（モデルＰＨＤ　２０００；Ｈａｒｖａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）に三方活栓が接続された。パパベリン注射後５分でｐＤＮＡ（４０～１００ｍｌ生理食塩水中１５．５～２５．７ｍｇ）が１．７または２．０ｍｌ／秒の速度で注入された。これは、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓを発現するプラスミドＤＮＡ用に、ヒトについて８００～２０００ｍｌ生理食塩水中約３００～５００ｍｇの注入でスケールアップすることができる。ラットに対するアデノウイルスベクター注入では、３ｍｌの通常生理食塩水（ＮＳＳ）中2×10^{9}個の感染粒子が注入された。これは、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓを発現するアデノウイルスベクター用に、ヒトについて１０リットルのＮＳＳ中約1×10^{13}個の感染粒子の注入でスケールアップすることができる。ｓｉＲＮＡに関しては、ラットは大伏在静脈に１２．５μｇのｓｉＲＮＡを注入され、霊長類は大伏在静脈に７５０μｇのｓｉＲＮＡを注入された。これは、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ用に、例えばヒトの大伏在静脈への約１５～約５０ｍｇの注入でスケールアップすることができる。

【０４７２】

皮膚

本発明はまた、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を皮膚に送達することも企図する。

【０４７３】

Ｈｉｃｋｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ－Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ（２０１３）２，ｅ１２９）は、ヒトおよびマウス皮膚にセルフデリバリー（ｓｄ）ｓｉＲＮＡを送達するための電動マイクロニードルアレイ皮膚送達装置に関する。ｓｉＲＮＡベースの皮膚治療薬を臨床に移行させる際の主な課題は、有効な送達系の開発である。種々の皮膚送達技術に多くの試みが投じられてきたが、成功は限られて

いる。皮膚がｓｉＲＮＡで治療された臨床試験では、皮下針注射に伴う激痛のために試験におけるさらなる患者の登録が不可能となっており、改良された、より「患者に優しい」（すなわち、痛みがほとんどまたは全くない）送達手法の必要性が浮き彫りとなっている。マイクロニードルは、ｓｉＲＮＡを含む大型の荷電カーゴを、最大の障壁である角質層を越えて送達する効率的な方法であり、概して従来の皮下針より痛みが少ないと考えられる。電動「スタンプ型」マイクロニードル装置は、Ｈｉｃｋｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．によって使用された電動マイクロニードルアレイ（ＭＭＮＡ）装置を含め、無毛マウス試験で安全であり、かつ（ｉ）化粧品業界での広範な使用、および（ｉｉ）限られた試験でほぼ全てのボランティアがこの装置の使用はインフルエンザの予防接種と比べてはるかに痛みが少ないと認めたことからも明らかなとおり、痛みをほとんどまたは全く引き起こさないことが示されており、この装置を使用したｓｉＲＮＡ送達により、皮下針注射を使用した先行の臨床試験で経験されたものと比べて痛みがはるかに少なくなることが示唆される。ＭＭＮＡ装置（Ｂｏｍｔｅｃｈ　Ｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃ　Ｃｏ、ソウル、韓国からＴｒｉｐｌｅ－ＭまたはＴｒｉ－Ｍとして市販されている）は、マウスおよびヒト皮膚に対するｓｉＲＮＡの送達用に構成された。０．１ｍｍの深さに設定された、使い捨てＴｒｉ－Ｍ針カートリッジ（Ｂｏｍｔｅｃｈ）のチャンバに、ｓｄ－ｓｉＲＮＡ溶液（最大３００μｌの０．１ｍｇ／ｍｌ　ＲＮＡ）が導入された。ヒト皮膚の治療に関しては、不特定の皮膚（外科手技後直ちに入手）が手で伸ばされ、処置前にコルク製プラットフォームにピンで留められた。全ての皮内注射が、２８ゲージ０．５インチ針を有するインスリンシリンジを使用して実施された。Ｈｉｃｋｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．のＭＭＮＡ装置および方法は、例えば皮膚に対する最大３００μｌの０．１ｍｇ／ｍｌ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの投薬量で、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの送達に使用しおよび／または適合させることができる。

【０４７４】

Ｌｅａｃｈｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１８　ｎｏ．２，４４２－４４６　Ｆｅｂ．２０１０）は、皮膚用の第１の低分子干渉性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）ベースの治療薬を利用した、生活に支障をきたす程の足底角皮症を含む常染色体優性症候群であるまれな皮膚障害の先天性爪肥厚症（ＰＣ）の治療に関する第Ｉｂ相臨床試験に関する。ＴＤ１０１と呼ばれるこのｓｉＲＮＡは、野生型Ｋ６ａ　ｍＲＮＡには影響を及ぼすことなくケラチン６ａ（Ｋ６ａ）Ｎ１７１Ｋ突然変異ｍＲＮＡを特異的かつ強力に標的化する。以下に用量漸増スケジュールを提供する。

【０４７５】

【表９】

週数	用量番号	日数	容積(ml)	TD101濃度 (mg/ml)	総TD101用量 (mg)
1	1-2	1-7	0.1	1.0	0.10
2	3-4	8-14	0.25	1.0	0.25
3	5-6	15-21	0.50	1.0	0.50
4	7-8	22-28	1.0	1.0	1.0
5	9-10	29-35	1.5	1.0	1.5
6	11-12	36-42	2.0	1.0	2.0
7	13-14	43-49	2.0	1.5	3.0
8	15-16	50-56	2.0	2.0	4.0
9	17-18	57-63	2.0	2.5	5.0
10	19-20	64-70	2.0	3.0	6.0
11	21-22	71-77	2.0	3.5	7.0
12	23-24	78-84	2.0	4.0	8.0
13	25-26	85-91	2.0	4.5	9.0
14	27-28	92-98	2.0	5.0	10.0
15	29-30	99-105	2.0	6.0	12.0
16	31-32	106-112	2.0	7.0	14.0
17	33	113-119	2.0	8.5	17.0

【０４７６】

最初に、ＴＤ１０１またはビヒクル単独（カルシウムまたはマグネシウム不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水）の０．１ｍｌの１．０ｍｇ／ｍｌ溶液が対称性の臍帯に投与された。６つの漸増用量容積が企図され、増加に対する有害反応はなかった：注射１回当たり０．１、０．２５、０．５、１．０、１．５、および２．０ｍｌのＴＤ１０１溶液の１．０ｍｇ／ｍｌ溶液。計画された最大容積（２．０ｍｌ）で十分な忍容性が示されたため、次にＴＤ１０１の濃度を１ｍｇ／ｍｌから８．５ｍｇ／ｍｌの最終濃度に至るまで毎週増加させた。同様の投薬量が、ケラチン６ａ（Ｋ６ａ）Ｎ１７１Ｋ突然変異ｍＲＮＡを特異的かつ強力に標的化するＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの投与に企図される。

【０４７７】

Ｚｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（ＰＮＡＳ，Ｊｕｌｙ　２４，２０１２，ｖｏｌ．１０９，ｎｏ．３０，１１９７５－１１９８０）は、金コアが高配向の共有結合的に固定化されたｓｉＲＮＡの高密度シェルに取り囲まれている球状核酸ナノ粒子コンジュゲート（ＳＮＡ－ＮＣ）が、適用後数時間以内にほぼ１００％のインビトロのケラチノサイト、マウス皮膚、およびヒト表皮を自在に通り抜けることを示している。Ｚｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．は、６０時間にわたる２５ｎＭ上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）ＳＮＡ－ＮＣの単回適用がヒト皮膚における有効な遺伝子ノックダウンを実証することを実証した。同様の投薬量が、皮膚に対する投与についてＳＮＡ－ＮＣに固定化されたＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓに企図される。

【０４７８】

肝炎ウイルス

本発明はまた、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）の治療にも適用することができる。しかしながら、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系は、内因性低分子ＲＮＡ経路が過飽和になるリスクなどのＲＮＡｉの欠点を回避するように、例えば用量および配列を最適化するなどして適合させなければならない（例えば、Ｇｒｉｍｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　ｖｏｌ．４４１，２６　Ｍａｙ　２００６を参照のこと）。例えば、ヒト当たり約１～１０×10^{14}粒子などの低用量が企図される。

【０４７９】

別の実施形態において、ＨＢＶを標的とするＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系が、安定核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）などのリポソームで投与され得る（例えば、Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２３，Ｎｏ．８，Ａｕｇｕｓｔ　２００５を参照のこと）。ＳＮＡＬＰ中約１、３または５ｍｇ／ｋｇ／日の、ＨＢＶ　ＲＮＡに標的化されたＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓを毎日静脈内注射することが企図される。毎日の治療は約３日間にわたり、次に毎週、約５週間にわたり得る。

【０４８０】

別の実施形態において、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．のシステム（Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ（２００７）１４，１１－１９）を本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に使用しおよび／または適合させることができる。Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．は二本鎖アデノ随伴ウイルス８型偽型ベクター（ｄｓＡＡＶ２／８）を使用してｓｈＲＮＡを送達する。ＨＢＶ特異的ｓｈＲＮＡを担持するｄｓＡＡＶ２／８ベクターの単回投与（マウス当たり１×10^{12}ベクターゲノム）が、ＨＢＶトランスジェニックマウスの肝臓における安定したレベルのＨＢＶタンパク質、ｍＲＮＡおよび複製ＤＮＡを有効に抑制し、循環中ＨＢＶ負荷の最大２～３$\log_{10}$の低下がもたらされた。有意なＨＢＶ抑制はベクター投与後少なくとも１２０日間持続した。ｓｈＲＮＡの治療効果は配列依存的で、インターフェロンの活性化は伴わなかった。本発明には、ＨＢＶを指向するＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ　システムをＡＡＶ２／８ベクターなどのＡＡＶベクターにクローニングし、例えばヒト当たり約１×10^{15}ベクターゲノム～約１×10^{16}ベクターゲノムの投薬量でヒトに投与し得る。

【０４８１】

別の実施形態において、Ｗｏｏｄｄｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．の方法（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ｖｏｌ．２１　ｎｏ．５，９７３－９８５　Ｍａｙ　２０１３）を、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に使用しおよび／または適合させることができる。Ｗｏ

ｏｄｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．は、肝細胞標的化Ｎ－アセチルガラクトサミンコンジュゲートメリチン様ペプチド（ＮＡＧ－ＭＬＰ）と、凝固第ＶＩＩ因子（Ｆ７）を標的化する肝臓向性コレステロールコンジュゲートｓｉＲＮＡ（ｃｈｏｌ－ｓｉＲＮＡ）との単純な共注入が、マウスおよび非ヒト霊長類において臨床化学の変化またはサイトカインの誘導なしに効率的なＦ７ノックダウンをもたらすことを示す。Ｗｏｏｄｄｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．は、ＨＢＶ感染症の一過性のトランスジェニックマウスモデルを使用して、ＮＡＧ－ＭＬＰと、保存されたＨＢＶ配列を標的化する強力なｃｈｏｌ－ｓｉＲＮＡとの単回共注入が、ウイルスＲＮＡ、タンパク質、およびウイルスＤＮＡのマルチログ（ｍｕｌｔｉｌｏｇ）抑制をもたらし、効果が長時間にわたったことを示す。本発明には、例えば約６ｍｇ／ｋｇのＮＡＧ－ＭＬＰと６ｍｇ／ｋｇのＨＢＶ特異的ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓとの静脈内（ｉｎｔｒａｖｅｉｎｏｕｓ）共注入が想定され得る。代替例では、１日目に約３ｍｇ／ｋｇのＮＡＧ－ＭＬＰおよび３ｍｇ／ｋｇのＨＢＶ特異的ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓが送達され、続いて２週間後に約２～３ｍｇ／ｋｇのＮＡＧ～ＭＬＰおよび２～３ｍｇ／ｋｇのＨＢＶ特異的ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓが投与されてもよい。

【０４８２】

本発明はまた、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）の治療にも適用され得る。Ｒｏｅｌｖｉｎｋｉ　ｅｔ　ａｌ．の方法（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ｖｏｌ．２０　ｎｏ．９，１７３７－１７４９　Ｓｅｐ　２０１２）をＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適用することができる。例えば、ＡＡＶ８などのＡＡＶベクターが企図されるベクターであってよく、例えばキログラム体重当たり約１．２５×１０^{１１}～１．２５×１０^{１３}ベクターゲノム（ｖｇ／ｋｇ）の投薬量が企図され得る。

【０４８３】

さらに別の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９媒介性ゲノム編集を用いて疾患突然変異および／または表現型を補修することができる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９媒介性ゲノム編集を用いて肝臓および／または肝細胞における疾患突然変異および／または表現型を補修し得ることは、全体として参照により本明細書に援用される、ウェブサイトｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｄｏｉｆｉｎｄｅｒ／１０．１０３８／ｎｂｔ．２８８４で入手可能なＮａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ　ｏｎｌｉｎｅ　３０　Ｍａｒｃｈ　２０１４；ｃｏｒｒｅｃｔｅｄ　ｏｎｌｉｎｅ　３１　Ｍａｒｃｈ　２０１４に発表されたＨａｏ　Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．による「成体マウスにおけるＣａｓ９によるゲノム編集は疾患突然変異および表現型を補修する（Ｇｅｎｏｍｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ　ｗｉｔｈ　Ｃａｓ９　ｉｎ　ａｄｕｌｔ　ｍｉｃｅ　ｃｏｒｒｅｃｔｓ　ａ　ｄｉｓｅａｓｅ　ｍｕｔａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ）」と題される論稿に説明される。この論文は、ヒト疾患遺伝性チロシン血症のマウスモデルにおける肝細胞のＦａｈ突然変異のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９媒介性補修に関する。流体力学的注入によるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系の成分の送達により、約１／２５０個の肝細胞で野生型Ｆａｈタンパク質の初期発現がもたらされたことが示された。さらに、Ｆａｈ陽性肝細胞の増加が体重減少の表現型をレスキューしたことが示された。

【０４８４】

同様の方法で他の疾患の宿主を治療し得ることは直ちに明らかであろう。突然変異によって引き起こされる遺伝性疾患のいくつかの例が本明細書に提供されるが、さらに多くが知られている。上記の戦略はそれらの疾患に適用することができる。

【０４８５】

ハンチントン病（ＨＤ）

ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）は、ハンチントン病の疾患原因遺伝子であるＨＴＴの発現を低下させることによってこの障害に対する治療可能性を提供し（例えば、ＭｃＢｒｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ｖｏｌ．１９　ｎｏ．１２　Ｄｅｃ．２０１１，ｐｐ．２１５２－２１６２を参照のこと）、従って出願人は、それをＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に使用しおよび／または適合させることができると仮定する。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、アンチセンス配列のオフターゲットの可能性を低下させるアルゴリ

ズムを使用して生成され得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ配列は、マウス、アカゲザルまたはヒトハンチンチンのいずれのエクソン５２にある配列も標的とし、かつＡＡＶなどのウイルスベクターで発現し得る。ヒトを含めた動物に、半球当たり約３回のマイクロインジェクション（合計６回の注入）：最初は前交連から１mm吻側に（１２μｌ）および残りの２回の注入（それぞれ１２μｌおよび１０μｌ）は最初の注入から３および６mm尾側に離して、１ｅ１２ｖｇ／ｍｌのＡＡＶによって約１μｌ／分の速度で注入されてもよく、注入液を針先端から拡散させるため、針はその場にさらに５分間残された。

【０４８６】

ＤｉＦｉｇｌｉａ ｅｔ ａｌ．（ＰＮＡＳ，Ｏｃｔｏｂｅｒ ２３，２００７，ｖｏｌ．１０４，ｎｏ．４３，１７２０４－１７２０９）は、Ｈｔｔを標的化するｓｉＲＮＡの成体線条体への単回投与が突然変異体Ｈｔｔをサイレンシングし、神経病変を減弱させ、および急激発症型のウイルストランスジェニックマウスＨＤモデルで観察された異常行動表現型を遅延させ得ることを観察した。ＤｉＦｉｇｌｉａは、２μｌのＣｙ３標識ｃｃ－ｓｉＲＮＡ－Ｈｔｔまたは非コンジュゲートｓｉＲＮＡ－Ｈｔｔを１０μＭでマウスに線条体内注入した。Ｈｔｔに標的化されたＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの同様の投薬量を本発明においてヒトに企図することができ、例えば、Ｈｔｔに標的化された約５～１０ｍｌの１０μＭ ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓが線条体内注入されてもよい。

【０４８７】

別の例において、Ｂｏｕｄｒｅａｕ ｅｔ ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ ｖｏｌ．１７ ｎｏ．６ ｊｕｎｅ ２００９）は、ｈｔｔ特異的ＲＮＡｉウイルスを発現する５μｌの組換えＡＡＶ血清型２／１ベクターを（４×１０^{12}ウイルスゲノム／ｍｌで）線条体（ｓｔｒａｉａｔｕｍ）に注入する。Ｈｔｔに標的化されたＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの同様の投薬量を本発明においてヒトに企図することができ、例えば、Ｈｔｔに標的化された約１０～２０ｍｌの４×１０^{12}ウイルスゲノム／ｍｌ）ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓが線条体内注入されてもよい。

【０４８８】

別の例において、ＨＴＴに標的化されたＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓが連続投与され得る（例えば、Ｙｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １５０，８９５－９０８，Ａｕｇｕｓｔ ３１，２０１２を参照のこと）。Ｙｕ ｅｔ ａｌ．は、０．２５ｍｌ／時を送達する浸透圧ポンプ（モデル２００４）を利用して３００ｍｇ／日のｓｓ－ｓｉＲＮＡまたはリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）を２８日間送達するとともに、０．５μｌ／時を送達するように設計されたポンプ（モデル２００２）を使用して７５ｍｇ／日の陽性対照ＭＯＥ ＡＳＯを１４日間送達した。ポンプ（Ｄｕｒｅｃｔ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）は滅菌ＰＢＳ中に希釈されたｓｓ－ｓｉＲＮＡまたはＭＯＥが充填され、次に植え込みの２４時間前または４８時間前（モデル２００４）に３７℃でインキュベートされた。マウスが２．５％イソフルラン（ｉｓｏｆｌｕｏｒａｎｅ）で麻酔をかけられ、頭蓋底に正中切開が設けられた。定位固定ガイドを使用して右側脳室にカニューレが植え込まれ、Ｌｏｃｔｉｔｅ接着剤で固定された。Ａｌｚｅｔ浸透圧ミニポンプに取り付けられたカテーテルがカニューレに取り付けられ、ポンプが肩甲骨中央領域に皮下留置された。切開は５．０ナイロン縫合糸で閉じられた。Ｈｔｔに標的化されたＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの同様の投薬量を本発明においてヒトに企図することができ、例えば、Ｈｔｔに標的化された約５００～１０００ｇ／日のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓが投与されてもよい。

【０４８９】

持続注入の別の例において、Ｓｔｉｌｅｓ ｅｔ ａｌ．（Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ ２３３（２０１２）４６３－４７１）は、チタン針先端を有する実質内カテーテルを右被殻に植え込んだ。カテーテルが腹部の皮下に植え込まれたＳｙｎｃｈｒｏＭｅｄ（登録商標）ＩＩポンプ（Ｍｅｄｔｒｏｎｉｃ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｉｃａｌ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）に接続された。６μＬ／日でリン酸緩衝生理食塩水を７日間注入した後、ポンプに被験物質が再充填され、７日間の連続送達がプログラムされた。約２．３～１１．５２ｍｇ／日のｓｉＲＮＡが約０．１～０．５μＬ／分の種々の

注入速度で注入された。Ｈｔｔに標的化されたＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの同様の投薬量を本発明においてヒトに企図することができ、例えば、Ｈｔｔに標的化された約２０～２００ｍｇ／日のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓが投与されてもよい。

【０４９０】

別の例において、Ｓａｎｇａｍｏに譲渡された米国特許出願公開第２０１３０２５３０４０号明細書の方法もまた、ハンチントン病の治療用にＴＡＬＥＳから本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適合させることができる。

【０４９１】

核酸、アミノ酸およびタンパク質

本発明は核酸を使用して標的ＤＮＡ配列を結合する。核酸はタンパク質と比べて作製がはるかに容易で安価であり、かつ相同性が求められるストレッチの長さに応じて特異性を変化させることができるため、これは有利である。例えば、複数のフィンガーの複雑な三次元の配置は不要である。

【０４９２】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」および「オリゴヌクレオチド」は、互換的に使用される。これらは、任意の長さのヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、またはそれらのアナログのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有し得、既知または未知の任意の機能を遂行し得る。以下のものは、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片のコードまたは非コード領域、連鎖分析から定義される遺伝子座（遺伝子座）、エキソン、イントロン、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短鎖ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、リボザイム、ｃＤＮＡ、組換えポリヌクレオチド、分枝鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意配列の単離ＤＮＡ、任意配列の単離ＲＮＡ、核酸プローブ、およびプライマー。この用語はまた、合成骨格を有する核酸様構造も包含する、国際公開第９７／０３２１１号パンフレットおよび国際公開第９６／３９１５４号パンフレット。ポリヌクレオチドは、１つ以上の改変ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得る。ヌクレオチド構造の改変は、存在する場合、ポリマーの集合前または後に与えることができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断することができる。ポリヌクレオチドは、重合後に例えば標識成分とのコンジュゲーションによりさらに改変することができる。

【０４９３】

本明細書において使用される用語「野生型」は、当業者により理解される当技術分野の用語であり、突然変異体またはバリアント形態から区別される天然状態で生じるままの生物、株、遺伝子または特徴の典型的な形態を意味する。

【０４９４】

本明細書において使用される用語「バリアント」は、天然状態で生じるものから逸脱するパターンを有する品質の提示を意味すると解釈すべきである。

【０４９５】

用語「天然に存在しない」または「エンジニアリングされた」は、互換的に使用され、人工の関与を示す。この用語は、核酸分子またはポリペプチドを指す場合、核酸分子またはポリペプチドが、それらが天然状態で天然に会合し、または天然状態で見出される少なくとも１つの他の成分を少なくとも実質的に含まないことを意味する。

【０４９６】

「相補性」は、古典的ワトソン－クリック塩基対形成または他の非古典的タイプのいずれかによる別の核酸配列との水素結合を形成する核酸の能力を指す。相補性パーセントは、第２の核酸配列との水素結合（例えば、ワトソン－クリック塩基対形成）を形成し得る核酸分子中の残基の割合を示す（例えば、１０のうち５、６、７、８、９、１０は、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、および１００％の相補性である）。「完全に相補

的」は、核酸配列の全ての連続残基が第２の核酸配列中の同一数の連続残基と水素結合することを意味する。本明細書において使用される「実質的に相補的」は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５、５０、またはそれよりも多いヌクレオチドの領域に対して少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、もしくは１００％である相補性の程度を指し、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする２つの核酸を指す。

【０４９７】

本明細書において使用されるハイブリダイゼーションのための「ストリンジェントな条件」は、標的配列に対する相補性を有する核酸が、標的配列と優位にハイブリダイズし、非標的配列と実質的にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、一般に、配列依存的であり、多数の因子に応じて変動する。一般に、配列が長ければ、配列がその標的配列と特異的にハイブリダイズする温度が高い。ストリンジェントな条件の非限定的な例は、Ｔｉｊｓｓｅｎ（１９９３），Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ Ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ－Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ｗｉｔｈ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｐｒｏｂｅｓ Ｐａｒｔ Ｉ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｃｈａｐｔｅｒ“Ｏｖｅｒｖｉｅｗ ｏｆ ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔｈｅ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｏｆ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｐｒｏｂｅ ａｓｓａｙ”，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．に詳述されている。ポリヌクレオチド配列に言及がなされる場合、相補的なまたは部分的に相補的な配列もまた想定される。それらは好ましくは、高度にストリンジェントな条件下で参照配列にハイブリダイズし得る。概して、ハイブリダイゼーション速度を最大化するためには、比較的低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件が選択される：熱的融点（T_m）より約２０～２５℃低い。T_mは、特定の標的配列の５０％が規定のイオン強度およびｐＨの溶液中で完全に相補的なプローブとハイブリダイズする温度である。概して、ハイブリダイズされる配列の少なくとも約８５％のヌクレオチド相補性を求めるためには、T_mより約５～１５℃低い高度にストリンジェントな洗浄条件が選択される。ハイブリダイズされる配列の少なくとも約７０％のヌクレオチド相補性を求めるためには、T_mより約１５～３０℃低い中程度にストリンジェントな洗浄条件が選択される。高度に許容的な（極めて低いストリンジェンシーの）洗浄条件は、T_mより５０℃も低いものであってよく、ハイブリダイズされる配列間における高度のミスマッチを許容する。当業者は、標的配列とプローブ配列との間の具体的な相同性レベルによる検出可能なハイブリダイゼーションシグナルの結果に影響が及ぶように、ハイブリダイゼーション工程および洗浄工程における他の物理的および化学的パラメータもまた変更し得ることを認識するであろう。好ましい高度にストリンジェントな条件は、５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ、および１％ＳＤＳ、４２℃でのインキュベーション、または５×ＳＳＣおよび１％ＳＤＳ、６５℃でのインキュベーションと、０．２×ＳＳＣおよび０．１％ＳＤＳ、６５℃での洗浄を含む。

【０４９８】

「ハイブリダイゼーション」は、１つ以上のポリヌクレオチドが反応してヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化される複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対形成、フーグスティーン結合により、または任意の他の配列特異的様式で生じ得る。複合体は、二本鎖構造を形成する２つの鎖、多重鎖複合体を形成する３つ以上の鎖、単一の自己ハイブリダイズする鎖、またはそれらの任意の組合せを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、より広範なプロセス、例えば、ＰＣＲの開始、または酵素によるポリヌクレオチドの開裂におけるステップを構成し得る。所与の配列とハイブリダイズし得る配列は、所与の配列の「相補鎖」と称される。

【０４９９】

本明細書で使用されるとき、用語「ゲノム遺伝子座（ｇｅｎｏｍｉｃ ｌｏｃｕｓ）」または「遺伝子座（ｌｏｃｕｓ）」（複数形では遺伝子座（ｌｏｃｉ））は、染色体上の

遺伝子またはＤＮＡ配列の特定の位置である。「遺伝子」は、ポリペプチドをコードするひと続きのＤＮＡもしくはＲＮＡ、または生物において機能的な役割を担い、ひいては生体における遺伝の分子単位であるＲＮＡ鎖を指す。本発明の目的上、遺伝子は遺伝子産物の産生を調節する領域（かかる調節配列がコード配列および／または転写配列に隣接するか否かに関わらず）を含むと見なされ得る。従って、遺伝子には、必ずしも限定されるわけではないが、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳調節配列、例えばリボソーム結合部位および配列内リボソーム進入部位、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス付着部位および遺伝子座制御領域が含まれる。

【０５００】

本明細書で使用されるとき、「ゲノム遺伝子座の発現」または「遺伝子発現」は、機能性遺伝子産物の合成において遺伝子からの情報が用いられるプロセスである。遺伝子発現の産物は多くの場合にタンパク質であるが、ｒＲＮＡ遺伝子またはｔＲＮＡ遺伝子などの非タンパク質コード遺伝子では、産物は機能性ＲＮＡである。遺伝子発現プロセスは、知られている全ての生命－真核生物（多細胞生物を含む）、原核生物（細菌および古細菌）およびウイルスによって、生存のための機能性産物の生成に用いられる。本明細書で使用されるとき、遺伝子または核酸の「発現」には、細胞遺伝子発現のみならず、クローニングシステムおよび任意の他のコンテクストにおける核酸の転写および翻訳もまた包含される。本明細書で使用されるとき、「発現」はまた、ポリヌクレオチドがＤＮＡテンプレートから（例えばｍＲＮＡまたは他のＲＮＡ転写物に）転写されるプロセスおよび／または転写されたｍＲＮＡが続いてペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスも指す。転写物およびコードされたポリペプチドは、まとめて「遺伝子産物」と称され得る。ポリヌクレオチドがゲノムＤＮＡに由来する場合、発現には、真核細胞におけるｍＲＮＡのスプライシングが含まれ得る。

【０５０１】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書において、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために互換的に使用される。ポリマーは、直鎖または分枝鎖であり得、それは、改変アミノ酸を含み得、それは、非アミノ酸により中断されていてよい。この用語は、改変、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作、例えば、標識成分とのコンジュゲーションを受けたアミノ酸ポリマーも包含する。本明細書において使用される用語「アミノ酸」は、グリシンおよびＤまたはＬ光学異性体の両方を含む天然および／または非天然または合成アミノ酸、ならびにアミノ酸アナログおよびペプチド模倣体を含む。

【０５０２】

本明細書で使用されるとき、用語「ドメイン」または「タンパク質ドメイン」は、タンパク質鎖の残りの部分と独立して存在しおよび機能し得るタンパク質配列の一部を指す。

【０５０３】

本発明の態様に記載されるとおり、配列同一性は配列相同性と関係がある。相同性比較は目測で行われてもよく、またはより通例では、容易に利用可能な配列比較プログラムの助けを借りて行われてもよい。これらの市販のコンピュータプログラムは２つ以上の配列間のパーセント（％）相同性を計算し得るとともに、２つ以上のアミノ酸または核酸配列が共有する配列同一性も計算し得る。一部の好ましい実施形態では、本明細書に記載されるｄＴＡＬＥのキャッピング領域は、本明細書に提供されるキャッピング領域アミノ酸配列と少なくとも９５％同一であるまたはそれとの同一性を共有する配列を有する。

【０５０４】

配列相同性は、当該技術分野において公知の多くのコンピュータプログラムのいずれか、例えばＢＬＡＳＴまたはＦＡＳＴＡ等により生成し得る。かかるアラインメントの実行に好適なコンピュータプログラムは、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージである（ウィスコンシン大学（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）、米国；Ｄｅｖｅｒｅｕｘ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ

Ｒｅｓｅａｒｃｈ １２：３８７）。配列比較を実施し得る他のソフトウェアの例としては、限定はされないが、ＢＬＡＳＴパッケージ（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９９ 前掲書－Ｃｈａｐｔｅｒ １８を参照）、ＦＡＳＴＡ（Ａｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，４０３－４１０）およびＧＥＮＥＷＯＲＫＳスイートの比較ツールが挙げられる。ＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡは両方とも、オフラインおよびオンライン検索に利用可能である（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９９ 前掲書，７－５８～７－６０頁を参照）。しかしながら、ＧＣＧ Ｂｅｓｔｆｉｔプログラムを使用することが好ましい。

【０５０５】

パーセンテージ（％）配列相同性は連続する配列にわたり計算することができ、すなわち１つの配列が他の配列と整列され、一方の配列の各アミノ酸またはヌクレオチドが他方の配列の対応するアミノ酸またはヌクレオチドと一度に１個の残基ずつ直接比較される。これは「ギャップなし」アラインメントと呼ばれる。典型的には、かかるギャップなしアラインメントは比較的少ない数の残基にわたってのみ実施される。

【０５０６】

これは極めて単純かつ一貫した方法であるが、例えば、本来同一である配列ペアにおいて、１つの挿入または欠失によって続くアミノ酸残基のアラインメントにずれが生じ、ひいては大域的アラインメントの実行時に％相同性が大幅に低下する可能性がある点を考慮に入れることができない。結果的に、多くの配列比較方法が、全体的な相同性または同一性スコアを過度に不利にすることなく可能性のある挿入および欠失を考慮に入れる最適アラインメントを作製するように設計される。これは配列アラインメントに「ギャップ」を挿入して局所的な相同性または同一性を最大化しようとすることにより達成される。

【０５０７】

しかしながら、これらのより複雑な方法では、アラインメントに現れる各ギャップに「ギャップペナルティー」が割り当てられ、従って、同じ数の同一アミノ酸について、可能な限り少ないギャップ－２つの比較される配列間のより高い関連性を反映する－を有する配列アラインメント程、多くのギャップを有するものより高いスコアを達成し得る。ギャップの存在に比較的高いコストを課し、ギャップにおける後続の各残基により小さいペナルティーを課す「アフィニティーギャップコスト」が典型的に使用される。これは最も一般的に用いられるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティーは、当然ながらギャップがより少ない最適化されたアラインメントを生じ得る。多くのアラインメントプログラムでギャップペナルティーを変更することが可能である。しかしながら、配列比較にかかるソフトウェアを使用する際にはデフォルト値を使用することが好ましい。例えば、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージを使用する場合、アミノ酸配列に関するデフォルトのギャップペナルティーは、ギャップが－１２、および各伸長が－４である。

【０５０８】

従って最大％相同性の計算は、初めにギャップペナルティーを考慮して最適アラインメントを作成することが必要である。かかるアラインメントの実行に好適なコンピュータプログラムは、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘ ｅｔ ａｌ．，１９８４ Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １２ ｐ３８７）である。配列比較を実施し得る他のソフトウェアの例としては、限定はされないが、ＢＬＡＳＴパッケージ（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９９ Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，４^{ｔｈ} Ｅｄ．－Ｃｈａｐｔｅｒ １８を参照）、ＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，１９９０ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４０３－４１０）およびＧＥＮＥＷＯＲＫＳスイートの比較ツールが挙げられる。ＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡは両方とも、オフラインおよびオンライン検索に利用可能である（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，７－５８～７－６０頁を参照）。しかしながら、用途によってはＧＣＧ Ｂｅｓｔｆｉｔプログラムを使用することが好ま

しい。ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓと呼ばれる新規ツールもまたタンパク質およびヌクレオチド配列の比較に利用可能である（ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ．１９９９ １７４（２）：２４７－５０；ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ．１９９９ １７７（１）：１８７－８および米国国立衛生研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｆｏｒ Ｈｅａｌｔｈ）のウェブサイトにある国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）のウェブサイトを参照）。

【０５０９】

最終的な％相同性は同一性の点で測定され得るが、アラインメントプロセスそれ自体は典型的にはオール・オア・ナッシングのペア比較に基づくものではない。代わりに、化学的類似性または進化距離に基づき各ペアワイズ比較にスコアを割り当てるスケール付き類似性スコア行列が概して使用される。一般的に用いられるかかる行列の例は、ＢＬＯＳＵＭ６２行列－ＢＬＡＳＴプログラムスイートのデフォルト行列である。ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎプログラムは、概して公開されているデフォルト値か、あるいは供給がある場合にはカスタムの記号比較表を使用する（さらなる詳細についてはユーザーマニュアルを参照のこと）。用途によっては、ＧＣＧパッケージの公開されているデフォルト値か、または他のソフトウェアの場合にはＢＬＯＳＵＭ６２などのデフォルト行列を使用することが好ましい。

【０５１０】

あるいは、パーセンテージ相同性は、ＤＮＡＳＩＳ（商標）（Ｈｉｔａｃｈｉ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）の多重アラインメント機能を使用して、ＣＬＵＳＴＡＬ（Ｈｉｇｇｉｎｓ ＤＧ ＆ Ｓｈａｒｐ ＰＭ（１９８８），Ｇｅｎｅ ７３（１），２３７－２４４）と類似したアルゴリズムに基づき計算することができる。ソフトウェアが最適アラインメントを作成し終えると、％相同性、好ましくは％配列同一性を計算することが可能になる。ソフトウェアは典型的にはこれを配列比較の一部として行い、数値結果を生成する。

【０５１１】

配列はまた、サイレントな変化を生じさせて機能的に等価な物質をもたらすアミノ酸残基の欠失、挿入または置換も有し得る。アミノ酸特性（残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および／または両親媒性の性質など）の類似性に基づき計画的なアミノ酸置換が作製されてもよく、従ってアミノ酸を官能基で一つにまとめることが有用である。アミノ酸は、その側鎖の特性のみに基づき一つにまとめられてもよい。しかしながら、突然変異データも同様に含めることがより有用である。このように得られたアミノ酸セットは、構造上の理由から保存されているものと見られる。これらのセットはベン図の形式で記述することができる（Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ Ｃ．Ｄ．ａｎｄ Ｂａｒｔｏｎ Ｇ．Ｊ．（１９９３）「タンパク質配列アラインメント：残基保存の階層分析戦略（Ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｌｉｇｎｍｅｎｔｓ：ａ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｆｏｒ ｔｈｅ ｈｉｅｒａｒｃｈｉｃａｌ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｒｅｓｉｄｕｅ ｃｏｎｓｅｒｖａｔｉｏｎ）」Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．９：７４５－７５６）（Ｔａｙｌｏｒ Ｗ．Ｒ．（１９８６）「アミノ酸保存の分類（Ｔｈｅ ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｃｏｎｓｅｒｖａｔｉｏｎ）」Ｊ．Ｔｈｅｏｒ．Ｂｉｏｌ．１１９；２０５－２１８）。保存的置換は、例えば、一般に受け入れられているベン図によるアミノ酸分類を記載する下記の表に従い作製し得る。

【０５１２】

【表１０】

セット		サブセット	
疎水性	ＦＷＹＨＫＭＩＬＶＡＧＣ	芳香族	ＦＷＹＨ
		脂肪族	ＩＬＶ
極性	ＷＹＨＫＲＥＤＣＳＴＮＱ	荷電	ＨＫＲＥＤ
		正電荷	ＨＫＲ
		負電荷	ＥＤ
小さい	ＶＣＡＧＳＰＴＮＤ	極めて小さい	ＡＧＳ

【０５１３】

本発明の実施形態は、起こり得る相同置換（置換（ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎ）および置換（ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ）は、本明細書では既存のアミノ酸残基またはヌクレオチドと代替の残基またはヌクレオチドとの相互交換を意味して用いられる）、すなわち、アミノ酸の場合に塩基性同士、酸性同士、極性同士等、同種のもの同士の置換を含み得る配列（ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの両方）を含む。非相同置換、すなわち、あるクラスから別のクラスの残基への置換、あるいは、オルニチン（以下、Ｚと称する）、ジアミノ酪酸オルニチン（以下、Ｂと称する）、ノルロイシンオルニチン（以下、Ｏと称する）、ピリイルアラニン（ｐｙｒｉｙｌａｌａｎｉｎｅ）、チエニルアラニン、ナフチルアラニンおよびフェニルグリシンなどの非天然アミノ酸の取り込みが関わる置換もまた起こり得る。

【０５１４】

変異体アミノ酸配列は、グリシンまたはβ－アラニン残基などのアミノ酸スペーサーに加え、メチル基、エチル基またはプロピル基などのアルキル基を含む配列の任意の２つのアミノ酸残基の間に挿入され得る好適なスペーサー基を含み得る。別形態の変化（これにはペプトイド形態の１つ以上のアミノ酸残基の存在が関わる）については、当業者は十分に理解し得る。誤解を避けるため、「ペプトイド形態」は、α－炭素置換基がα－炭素上ではなく、むしろ残基の窒素原子上にある変異体アミノ酸残基を指して使用される。ペプトイド形態のペプチドの調製方法は当該技術分野において公知である（例えばＳｉｍｏｎ ＲＪ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ（１９９２）８９（２０），９３６７－９３７１およびＨｏｒｗｅｌｌ ＤＣ，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（１９９５）１３（４），１３２－１３４）。

【０５１５】

本発明の実施は、特に記載のない限り、当業者の技能の範囲内である免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクスおよび組換えＤＮＡの慣用の技術を用いる。Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）；ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，（１９８７））

；シリーズMETHODS IN ENZYMOLOGY（Academic Press, Inc.）：PCR 2：A PRACTICAL APPROACH（M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds.（1995））、Harlow and Lane, eds.（1988）ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL、およびANIMAL CELL CULTURE（R. I. Freshney, ed.（1987））参照。

【０５１６】

ベクター

一態様において、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のエンジニアリングおよび最適化において使用されるベクターを提供する。

【０５１７】

本明細書で使用されるとき、「ベクター」は、ある環境から別の環境に実体を移すことを可能にし、またはそれを促進するツールである。ベクターはレプリコン、例えばプラスミド、ファージ、またはコスミドであり、そこに別のＤＮＡセグメントが挿入されることで、挿入されたセグメントの複製がもたらされ得る。概してベクターは、適切な制御エレメントと関連付けられたときに複製能を有する。一般に、用語「ベクター」は、核酸分子であって、それが結合している別の核酸の輸送能を有する核酸分子を指す。ベクターとしては、限定はされないが、一本鎖、二本鎖、または部分的に二本鎖の核酸分子；１つ以上の遊離末端を含む、遊離末端を含まない（例えば環状の）核酸分子；ＤＮＡ、ＲＮＡ、または両方を含む核酸分子；および当該技術分野において公知の他のポリヌクレオチド変種が挙げられる。ある種のベクターは「プラスミド」であり、これは、標準的な分子クローニング技術によるなどしてさらなるＤＮＡセグメントを中に挿入することのできる環状二本鎖ＤＮＡループを指す。別の種類のベクターはウイルスベクターであり、ここではウイルス（例えばレトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ））にパッケージングするためのウイルス由来のＤＮＡまたはＲＮＡ配列がベクター中に存在する。ウイルスベクターはまた、宿主細胞への形質移入のためウイルスによって担持されるポリヌクレオチドも含む。特定のベクターは、それが導入される宿主細胞中で自己複製する能力を有する（例えば細菌性複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムにインテグレートされ、従って宿主ゲノムと共に複製する。さらに、特定のベクターは、作動可能に結合している遺伝子の発現を指向させる能力を有する。かかるベクターは、本明細書では「発現ベクター」と称される。組換えＤＮＡ技法において有用な一般的な発現ベクターは、多くの場合にプラスミドの形態である。

【０５１８】

組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に好適な形態の本発明の核酸を含んでもよく、これは、その組換え発現ベクターが、発現させる核酸配列に作動可能に結合した１つ以上の調節エレメントを含むことを意味し、調節エレメントは、発現に使用される宿主細胞に基づき選択され得る。組換え発現ベクター内で「作動可能に結合している」とは、目的のヌクレオチド配列が調節エレメントに、そのヌクレオチド配列の（例えばインビトロ転写／翻訳系における、またはベクターが宿主細胞に導入される場合には宿主細胞における）発現を可能にする形で結合していることを意味するように意図される。組換えおよびクローニング方法に関しては、２００４年９月２日に米国特許出願公開第２００４－０１７１１５６　Ａ１号明細書として公開された米国特許出願第１０／８１５，７３０号明細書（その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）が参照される。

【０５１９】

本発明の態様は、キメラＲＮＡおよびＣａｓ９用のベクターに関する。キメラＲＮＡおよびＣａｓ９用のバイシストロニック発現ベクターが好ましい。概して、および特に、この実施形態においてＣａｓ９は好ましくはＣＢｈプロモーターによりドライブされる。キメラＲＮＡは、好ましくはＵ６プロモーターによりドライブされ得る。理想的にはこの２

つが組み合わされる。キメラガイドＲＮＡは、典型的には２０ｂｐのガイド配列（Ｎ）からなり、これがｔｒａｃｒ配列（下部鎖の１つ目の「Ｕ」から転写物の末端まで延在する）につなぎ合わされ得る。ｔｒａｃｒ配列は、指示されるとおりの種々の位置でトランケートされ得る。ガイド配列とｔｒａｃｒ配列とはｔｒａｃｒメイト配列に隔てられ、ｔｒａｃｒメイト配列はＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡであってもよい。この後に、示されるとおりのループ配列ＧＡＡＡが続き得る。これらは両方ともに好ましい例である。本出願人らは、ＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイによりヒトＥＭＸ１およびＰＶＡＬＢ遺伝子座におけるＣａｓ９媒介性インデルを実証している。ｃｈｉＲＮＡは、その「＋ｎ」記号で示され、ｃｒＲＮＡは、ガイド配列およびｔｒａｃｒ配列が別個の転写物として発現するハイブリッドＲＮＡを指す。本出願全体を通じて、キメラＲＮＡはシングルガイド、または合成ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）とも称され得る。ループは好ましくはＧＡＡＡであるが、この配列に限定されるものではなく、または実際には、４ｂｐ長であることのみに限定されるものではない。実際には、ヘアピン構造における使用に好ましいループ形成配列は４ヌクレオチド長であり、最も好ましくは配列ＧＡＡＡを有する。しかしながら、代替的な配列であってよいとおり、より長いまたは短いループ配列が使用され得る。配列は好ましくはヌクレオチドトリプレット（例えばＡＡＡ）、およびさらなるヌクレオチド（例えばＣまたはＧ）を含む。ループ形成配列の例にはＣＡＡＡおよびＡＡＡＧが含まれる。

【０５２０】

用語「調節エレメント」は、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナルおよびポリＵ配列などの転写終結シグナル）を含むことが意図される。かかる調節エレメントは、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ，ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）に記載される。調節エレメントには、多くのタイプの宿主細胞でヌクレオチド配列の構成的発現を指図するもの、および特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指図するもの（例えば組織特異的調節配列）が含まれる。組織特異的プロモーターは、主として所望される目的の組織、例えば、筋肉、ニューロン、骨、皮膚、血液、特定の臓器（例えば肝臓、膵臓）など、または特定の細胞型（例えばリンパ球）における発現を指図し得る。調節エレメントはまた、細胞周期依存的または発生段階依存的様式など、時間依存的様式での発現も指図することができ、これは同時に組織または細胞型特異的であっても、またはそうでなくてもよい。一部の実施形態では、ベクターは、１つ以上のｐｏｌ ＩＩＩプロモーター（例えば１、２、３、４、５つ、またはそれ以上のｐｏｌ ＩＩＩプロモーター）、１つ以上のｐｏｌ ＩＩプロモーター（例えば１、２、３、４、５つ、またはそれ以上のｐｏｌ ＩＩプロモーター）、１つ以上のｐｏｌ Ｉプロモーター（例えば１、２、３、４、５つ、またはそれ以上のｐｏｌ Ｉプロモーター）、またはそれらの組み合わせを含む。ｐｏｌ ＩＩＩプロモーターの例としては、限定はされないが、Ｕ６およびＨ１プロモーターが挙げられる。ｐｏｌ ＩＩプロモーターの例としては、限定はされないが、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター（場合によりＲＳＶエンハンサーを伴う）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター（場合によりＣＭＶエンハンサーを伴う）［例えば、Ｂｏｓｈａｒｔ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ，４１：５２１－５３０（１９８５）を参照］、ＳＶ４０プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、β－アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、およびＥＦ１αプロモーターが挙げられる。また、エンハンサーエレメント、例えばＷＰＲＥ；ＣＭＶエンハンサー；ＨＴＬＶ－ＩのＬＴＲにおけるＲ－Ｕ５’セグメント（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，Ｖｏｌ．８（１），ｐ．４６６－４７２，１９８８）；ＳＶ４０エンハンサー；およびウサギβ－グロビンのエクソン２と３との間のイントロン配列（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，Ｖｏｌ．７８（３），ｐ．１５２７－３１，１９８１）も用語「調節エレメント」に包含される。発現ベクターの設計が、形質転換する宿主細胞の選択、所望の発現レベルなどの要因に依存し得ることは、当業者によって理解される

であろう。ベクターを宿主細胞に導入し、それにより本明細書に記載されるとおり核酸によってコードされる転写物、タンパク質、またはペプチド、例えば融合タンパク質またはペプチド（例えば、クラスター化等間隔短鎖回分リピート（ＣＲＩＳＰＲ）転写物、タンパク質、酵素、それらの突然変異形態、それらの融合タンパク質等）を産生させることができる。調節配列に関しては、米国特許出願第１０／４９１，０２６号明細書が参照される（その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）。プロモーターに関しては、国際公開第２０１１／０２８９２９号パンフレットおよび米国特許出願第１２／５１１，９４０号明細書が参照される（その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）。

【０５２１】

ベクターは、原核または真核細胞中のＣＲＩＳＰＲ転写物（例えば、核酸転写物、タンパク質、または酵素）の発現のために設計することができる。例えば、ＣＲＩＳＰＲ転写物は、細菌細胞、例えば、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用）、酵母細胞、または哺乳動物細胞中で発現させることができる。好適な宿主細胞は、Ｇｏｅｄｄｅｌ，ＧＥＮＥ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ　ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ　１８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）にさらに考察されている。あるいは、組換え発現ベクターをインビトロで、例えばＴ７プロモーター調節配列およびＴ７ポリメラーゼを使用して転写および翻訳させることができる。

【０５２２】

ベクターは、原核生物または原核細胞中に導入し、その中で増殖させることができる。一部の実施形態において、原核生物を使用して真核細胞中に導入すべきベクターのコピーを増幅し、または真核細胞中に導入すべきベクターの産生における中間ベクターとして使用される（例えば、ウイルスベクターパッケージング系の一部としてプラスミドを増幅）。一部の実施形態において、原核生物を使用してベクターのコピーを増幅し、１つ以上の核酸を発現させ、例えば、宿主細胞または宿主生物への送達のための１つ以上のタンパク質の資源を提供する。原核生物中のタンパク質の発現は、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）中で、融合または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的または誘導的プロモーターを含有するベクターを用いて実施されることが最も多い。融合ベクターは、多数のアミノ酸をそれにコードされるタンパク質に、例えば、組換えタンパク質のアミノ末端に付加する。このような融合ベクターは、１つ以上の目的、例えば、（ｉ）組換えタンパク質の発現の増加；（ｉｉ）組換えタンパク質の溶解度の増加；および（ｉｉｉ）親和性精製におけるリガンドとして作用することによる組換えタンパク質の精製の支援を果たし得る。融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解開裂部位を融合部分および組換えタンパク質の接合部に導入して融合タンパク質の精製後に融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能とすることが多い。このような酵素、およびそのコグネート認識配列としては、Ｘａ因子、トロンビンおよびエンテロキナーゼが挙げられる。例示的融合発現ベクターとしては、ｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃ；Ｓｍｉｔｈ　ａｎｄ　Ｊｏｈｎｓｏｎ，１９８８．Ｇｅｎｅ　６７：３１－４０）、ｐＭＡＬ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，Ｍａｓｓ．）およびｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）が挙げられ、それぞれ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質、またはプロテインＡを標的組換えタンパク質に融合する。

【０５２３】

好適な誘導的非融合大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）発現ベクターの例としては、ｐＴｒｃ（Ａｍｒａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８８）Ｇｅｎｅ　６９：３０１－３１５）およびｐＥＴ　１１ｄ（Ｓｔｕｄｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，ＧＥＮＥ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ　ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ　１８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）６０－８９）が挙げられる。

【０５２４】
一部の実施形態において、ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母の出芽酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｉｖｉｓａｅ）中の発現のためのベクターの例としては、ｐＹｅｐＳｅｃ１（Ｂａｌｄａｒｉ，ｅｔ ａｌ．，１９８７．ＥＭＢＯ Ｊ．６：２２９－２３４）、ｐＭＦａ（Ｋｕｉｊａｎ ａｎｄ Ｈｅｒｓｋｏｗｉｔｚ，１９８２．Ｃｅｌｌ ３０：９３３－９４３）、ｐＪＲＹ８８（Ｓｃｈｕｌｔｚ ｅｔ ａｌ．，１９８７．Ｇｅｎｅ ５４：１１３－１２３）、ｐＹＥＳ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）、およびｐｉｃＺ（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）が挙げられる。

【０５２５】
一部の実施形態において、ベクターは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して昆虫細胞中のタンパク質発現をドライブする。培養昆虫細胞（例えば、ＳＦ９細胞）中のタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、ｐＡｃシリーズ（Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，１９８３．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２１５６－２１６５）およびｐＶＬシリーズ（Ｌｕｃｋｌｏｗ ａｎｄ Ｓｕｍｍｅｒｓ，１９８９．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７０：３１－３９）が挙げられる。

【０５２６】
一部の実施形態において、ベクターは、哺乳動物発現ベクターを使用して哺乳動物細胞中の１つ以上の配列の発現をドライブし得る。哺乳動物発現ベクターの例としては、ｐＣＤＭ８（Ｓｅｅｄ，１９８７．Ｎａｔｕｒｅ ３２９：８４０）およびｐＭＴ２ＰＣ（Ｋａｕｆｍａｎ，ｅｔ ａｌ．，１９８７．ＥＭＢＯ Ｊ．６：１８７－１９５）が挙げられる。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクター制御機能は、典型的には、１つ以上の調節エレメントにより提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２型、サイトメガロウイルス、シミアンウイルス４０、ならびに本明細書に開示の他のものおよび当技術分野において公知のものに由来する。原核および真核細胞の両方のために他の好適な発現系については、例えば、Ｃｈａｐｔｅｒｓ １６ ａｎｄ １７ ｏｆ Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ．２ｎｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９参照。

【０５２７】
一部の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞タイプ中の核酸の発現を優先的に指向し得る（例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現させる）。組織特異的調節エレメントは、当技術分野において公知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Ｐｉｎｋｅｒｔ，ｅｔ ａｌ．，１９８７．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１：２６８－２７７）、リンパ系特異的プロモーター（Ｃａｌａｍｅ ａｎｄ Ｅａｔｏｎ，１９８８．Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５）、特にＴ細胞受容体のプロモーター（Ｗｉｎｏｔｏ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８９．ＥＭＢＯ Ｊ．８：７２９－７３３）および免疫グロブリン（Ｂａｎｅｉｊｉ，ｅｔ ａｌ．，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７２９－７４０；Ｑｕｅｅｎ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７４１－７４８）、神経細胞特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；Ｂｙｒｎｅ ａｎｄ Ｒｕｄｄｌｅ，１９８９．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５４７３－５４７７）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄ，ｅｔ ａｌ．，１９８５．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２－９１６）、および乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター；米国特許第４，８７３，３１６号明細書および欧州特許出願公開第２６４，１６６号明細書）が挙げられる。発生制御プロモーター、例えば、ネズミｈｏｘプロモーター（Ｋｅｓｓｅｌ ａｎｄ Ｇｒｕｓｓ，１９９０．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３７４－３７９）およびα－フェトタンパク質プロモーター（

Ｃａｍｐｅｓ ａｎｄ Ｔｉｌｇｈｍａｎ，１９８９．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：５３７－５４６）も包含される。これらの原核生物および真核生物ベクターに関しては、米国特許第６，７５０，０５９号明細書（その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）が参照される。本発明の他の実施形態はウイルスベクターの使用に関するものであってよく、これに関しては米国特許出願第１３／０９２，０８５号明細書（その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）が参照される。組織特異的調節エレメントは当該技術分野において公知であり、これに関しては米国特許第７，７７６，３２１号明細書（その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）が参照される。

【０５２８】

調節エレメント

一部の実施形態において、調節エレメントは、ＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上のエレメントの発現をドライブするようにＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上のエレメントに作動可能に結合している。一般に、ＣＲＩＳＰＲ（クラスター化等間隔短鎖回分リピート）は、ＳＰＩＤＲ（スペーサー散在型ダイレクトリピート（ＳＰａｃｅｒ Ｉｎｔｅｒｓｐｅｒｓｅｄ Ｄｉｒｅｃｔ Ｒｅｐｅａｔ））としても公知であり、通常、特定の細菌種に特異的であるＤＮＡ遺伝子座のファミリーを構成する。ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中で認識された区別されるクラスの散在型短鎖配列リピート（ＳＳＲ）（Ｉｓｈｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１６９：５４２９－５４３３［１９８７］；およびＮａｋａｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１７１：３５５３－３５５６［１９８９］）および関連遺伝子を含む。類似の散在型ＳＳＲが、ハロフェラックス・メディテラネイ（Ｈａｌｏｆｅｒａｘ ｍｅｄｉｔｅｒｒａｎｅｉ）、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）、および結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）中で同定されている（Ｇｒｏｅｎｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１０：１０５７－１０６５［１９９３］；Ｈｏｅ ｅｔ ａｌ．，Ｅｍｅｒｇ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．，５：２５４－２６３［１９９９］；Ｍａｓｅｐｏｈｌ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ １３０７：２６－３０［１９９６］；およびＭｏｊｉｃａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１７：８５－９３［１９９５］参照）。ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、典型的には他のＳＳＲとリピートの構造が異なり、それは短鎖等間隔リピート（ＳＲＳＲ）と称されている（Ｊａｎｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，ＯＭＩＣＳ Ｊ．Ｉｎｔｅｇ．Ｂｉｏｌ．，６：２３－３３［２００２］；およびＭｏｊｉｃａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，３６：２４４－２４６［２０００］）。一般に、リピートは、実質的に一定の長さを有するユニーク介入配列により等間隔とされているクラスターで生じる短いエレメントである（Ｍｏｊｉｃａ ｅｔ ａｌ．，［２０００］、前掲）。リピート配列は株間で高度に保存されているが、散在型リピートの数およびスペーサー領域の配列は、典型的には、株ごとに異なる（ｖａｎ Ｅｍｂｄｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１８２：２３９３－２４０１［２０００］）。ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、４０を超える原核生物中で同定されており（例えば、Ｊａｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，４３：１５６５－１５７５［２００２］；およびＭｏｊｉｃａ ｅｔ ａｌ．，［２００５］参照）、例として、限定されるものではないが、アエロパイラム属（Ａｅｒｏｐｙｒｕｍ）、パイロバキュラム属（Ｐｙｒｏｂａｃｕｌｕｍ）、スルフォロバス属（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ）、アーケオグロバス属（Ａｒｃｈａｅｏｇｌｏｂｕｓ）、ハロカーキュラ属（Ｈａｌｏｃａｒｃｕｌａ）、メタノバクテリウム属（Ｍｅｔｈａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、メタノコッカス属（Ｍｅｔｈａｎｏｃｏｃｃｕｓ）、メタノサルシナ属（Ｍｅｔｈａｎｏｓａｒｃｉｎａ）、メタノパイラス属（Ｍｅｔｈａｎｏｐｙｒｕｓ）、パイロコッカス属（Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ）、ピクロフィラス属（Ｐｉｃｒｏｐｈｉｌｕｓ）、サーモプラズマ属（Ｔｈｅｒｍｏｐｌａｓｍａ）、コリネバクテリウム属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、マイコバクテリウム属（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ストレプトマイセス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）、アキフェックス属（Ａｑｕｉｆｅｘ）、ポーフィロモナス属（

Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ）、クロロビウム属（Ｃｈｌｏｒｏｂｉｕｍ）、サーマス属（Ｔｈｅｒｍｕｓ）、バシラス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、クロストリジウム属（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）、サーモアナエロバクター属（Ｔｈｅｒｍｏａｎａｅｒｏｂａｃｔｅｒ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、フソバクテリウム属（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、アザーカス属（Ａｚａｒｃｕｓ）、クロモバクテリウム属（Ｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ネイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）、ニトロソモナス属（Ｎｉｔｒｏｓｏｍｏｎａｓ）、デスルフォビブリオ属（Ｄｅｓｕｌｆｏｖｉｂｒｉｏ）、ジオバクター属（Ｇｅｏｂａｃｔｅｒ）、ミクソコッカス属（Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ）、カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）、ウォリネラ属（Ｗｏｌｉｎｅｌｌａ）、アシネトバクター属（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、エルウィニア属（Ｅｒｗｉｎｉａ）、エシェリキア属（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）、メチロコッカス属（Ｍｅｔｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、パスツレラ属（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ）、フォトバクテリウム属（Ｐｈｏｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、キサントモナス属（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ）、エルシニア属（Ｙｅｒｓｉｎｉａ）、トレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）、およびサーモトガ属（Ｔｈｅｒｍｏｔｏｇａ）である。

【０５２９】

一般に、「ＣＲＩＳＰＲ系」は、集合的に、ＣＲＩＳＰＲ関連（「Ｃａｓ」）遺伝子の発現またはその活性の指向に関与する転写物および他のエレメント、例として、Ｃａｓ遺伝子をコードする配列、ｔｒａｃｒ（トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ）配列（例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡまたは活性部分ｔｒａｃｒＲＮＡ）、ｔｒａｃｒメイト配列（内因性ＣＲＩＳＰＲ系に関して「ダイレクトリピート」およびｔｒａｃｒＲＮＡによりプロセシングされる部分ダイレクトリピートを包含）、ガイド配列（内因性ＣＲＩＳＰＲ系に関して「スペーサー」とも称される）、またはＣＲＩＳＰＲ遺伝子座からの他の配列および転写物を指す。本発明の実施形態において用語のガイド配列とガイドＲＮＡとは同義的に用いられる。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上のエレメントは、Ｉ型、ＩＩ型、またはＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系に由来する。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上のエレメントは、内因性ＣＲＩＳＰＲ系を含む特定の生物、例えば、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）に由来する。一般に、ＣＲＩＳＰＲ系は、標的配列（内因性ＣＲＩＳＰＲ系に関してプロトスペーサーとも称される）におけるＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進するエレメントを特徴とする。ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成に関して、「標的配列」は、ガイド配列が相補性を有するように設計される配列を指し、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する。標的配列は、任意のポリヌクレオチド、例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡポリヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態において、標的配列は、細胞の核または細胞質中に局在している。

【０５３０】

一部の実施形態では、以下の基準の一部または全部を満たす反復モチーフを検索することにより、インシリコでダイレクトリピートが同定され得る：

１．ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座に隣接するゲノム配列の２Ｋｂウィンドウに存在する；

２．２０～５０ｂｐにわたる；および

３．２０～５０ｂｐの間隔が置かれている。

【０５３１】

一部の実施形態では、これらの基準のうち２つ、例えば１および２、２および３、または１および３が使用されてもよい。一部の実施形態では、３つ全ての基準が使用されてもよい。

【０５３２】

一部の実施形態では、続いて以下の基準の一部または全部を満たす配列により候補ｔｒａｃｒＲＮＡが予測され得る：

１．ダイレクトリピートとの配列相同性（最大１８ｂｐのミスマッチを含むＧｅｎｅｉｏｕｓにおけるモチーフ検索）；
２．転写方向における予測されたＲｈｏ非依存性転写ターミネーターの存在；および
３．ｔｒａｃｒＲＮＡとダイレクトリピートとの間の安定したヘアピン二次構造。
【０５３３】
一部の実施形態では、これらの基準のうち２つ、例えば１および２、２および３、または１および３が使用されてもよい。一部の実施形態では、３つ全ての基準が使用されてもよい。
【０５３４】
一部の実施形態では、キメラ合成ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）設計が、ダイレクトリピートとｔｒａｃｒＲＮＡとの間に少なくとも１２ｂｐの二重鎖構造を組み込み得る。
【０５３５】
本発明の好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ系はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系であり、Ｃａｓ酵素は、ＤＮＡ開裂を触媒するＣａｓ９である。化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）に由来するＣａｓ９または任意の近縁のＣａｓ９による酵素作用は、ガイド配列の２０ヌクレオチドにハイブリダイズしかつ標的配列の２０ヌクレオチドに続いてプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列（例としては、ＮＧＧ／ＮＲＧまたは本明細書に記載されるとおり決定され得るＰＡＭが挙げられる）を有する標的部位配列に二本鎖切断を生じさせる。部位特異的ＤＮＡ認識および開裂のためのＣａｓ９を介したＣＲＩＳＰＲ活性は、ガイド配列、一部がガイド配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒ配列およびＰＡＭ配列によって規定される。ＣＲＩＳＰＲ系のさらなる態様が、Ｋａｒｇｉｎｏｖ　ａｎｄ　Ｈａｎｎｏｎ，「ＣＲＩＳＰＲ系：細菌および古細菌における低分子ＲＮＡガイド防御（Ｔｈｅ　ＣＲＩＳＰＲ　ｓｙｓｔｅｍ：ｓｍａｌｌ　ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ　ｄｅｆｅｎｃｅ　ｉｎ　ｂａｃｔｅｒｉａ　ａｎｄ　ａｒｃｈａｅａ）」，Ｍｏｌｅ　Ｃｅｌｌ　２０１０，Ｊａｎｕａｒｙ　１５；３７（１）：７に記載される。
【０５３６】
化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ＳＦ３７０由来のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座、これは、４つの遺伝子Ｃａｓ９、Ｃａｓ１、Ｃａｓ２、およびＣｓｎ１のクラスター、ならびに２つの非コードＲＮＡエレメント、ｔｒａｃｒＲＮＡおよび短い一続きの非反復配列（スペーサー、各約３０ｂｐ）が間に置かれた反復配列（ダイレクトリピート）の特徴的アレイを含む。この系では、標的化されたＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）が４段階の逐次的なステップで作成される（図２Ａ）。第一に、２つの非コードＲＮＡ、プレｃｒＲＮＡアレイおよびｔｒａｃｒＲＮＡが、ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座から転写される。第二に、ｔｒａｃｒＲＮＡがプレｃｒＲＮＡのダイレクトリピートにハイブリダイズし、次にはこれがプロセシングされて、個々のスペーサー配列を含む成熟ｃｒＲＮＡとなる。第三に、成熟ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体が、ｃｒＲＮＡのスペーサー領域とプロトスペーサーＤＮＡとの間のヘテロ二重鎖形成によって、プロトスペーサーおよび対応するＰＡＭからなるＤＮＡ標的にＣａｓ９を仕向ける。最後に、Ｃａｓ９がＰＡＭの上流で標的ＤＮＡの開裂を媒介することにより、プロトスペーサー内にＤＳＢが作り出される（図２Ａ）。図２Ｂは、コドン最適化Ｃａｓ９の核局在を実証する。正確な転写開始を促進するため、ｔｒａｃｒＲＮＡの発現の駆動にＲＮＡポリメラーゼＩＩＩベースのＵ６プロモーターが選択された（図２Ｃ）。同様に、単一のスペーサーと、それに隣接する２つのダイレクトリピート（ＤＲ、用語「ｔｒａｃｒメイト配列」にも包含される；図２Ｃ）からなるプレｃｒＲＮＡアレイを発現させるため、Ｕ６プロモーターベースの構築物が開発された。初期のスペーサーは、大脳皮質の発生に重要な遺伝子であるヒトＥＭＸ１遺伝子座における３３塩基対（ｂｐ）の標的部位（３０ｂｐプロトスペーサー＋Ｃａｓ９のＮＧＧ認識モチーフを満たす３ｂｐ　ＣＲＩＳＰＲモチーフ（ＰＡＭ）配列）をターゲティングするように設計された、（図２Ｃ）。
【０５３７】

典型的には、内因性ＣＲＩＳＰＲ系に関して、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成（標的配列にハイブリダイズされ、１つ以上のＣａｓタンパク質と複合体形成しているガイド配列を含む）は、標的配列中または付近（例えば、それから１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０、またはそれよりも多い塩基対内）の一方または両方の鎖の開裂をもたらす。理論により拘束されるものではないが、ｔｒａｃｒ配列は、野生型ｔｒａｃｒ配列の全部または一部（例えば、野生型ｔｒａｃｒ配列の約または約２０、２６、３２、４５、４８、５４、６３、６７、８５、またはそれよりも多い数を超えるヌクレオチド）を含み得、またはそれからなっていてよく、例えば、ガイド配列に作動可能に結合しているｔｒａｃｒメイト配列の全部または一部とのｔｒａｃｒ配列の少なくとも一部に沿うハイブリダイゼーションによりＣＲＩＳＰＲ複合体の一部も形成し得る。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上のエレメントの発現をドライブする１つ以上のベクターを宿主細胞中に導入し、その結果、ＣＲＩＳＰＲ系のエレメントの発現が１つ以上の標的部位におけるＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を指向する。例えば、Ｃａｓ酵素、ｔｒａｃｒメイト配列に結合しているガイド配列、およびｔｒａｃｒ配列は、それぞれ別個のベクター上の別個の調節エレメントに作動可能に結合させることができる。あるいは、同一または異なる調節エレメントから発現されるエレメントの２つ以上を単一ベクター中で合わせることができ、ＣＲＩＳＰＲ系の任意の成分を提供する１つ以上の追加のベクターは第１のベクター中に含まれない。単一ベクター中で合わせるＣＲＩＳＰＲ系エレメントは、任意の好適な配向で配置することができ、例えば、あるエレメントを第２のエレメントに対して５’側（の上流）にまたは３’側（の下流）に局在化することができる。あるエレメントのコード配列は、第２のエレメントのコード配列の同一または逆鎖上で局在化し、同一または逆向きで配向させることができる。一部の実施形態において、単一のプロモーターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする転写物、ならびに１つ以上のイントロン配列内に埋め込まれているガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列（場合により、ガイド配列に作動可能に結合している）、およびｔｒａｃｒ配列（例えば、それぞれが異なるイントロン中に、２つ以上が少なくとも１つのイントロン中に、または全部が単一のイントロン中に存在する）の１つ以上の発現をドライブする。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列、およびｔｒａｃｒ配列は、同一のプロモーターに作動可能に結合しており、それから発現される。

【０５３８】

一部の実施形態において、ベクターは、１つ以上の挿入部位、例えば、制限エンドヌクレアーゼ認識配列（「クローニング部位」とも称される）を含む。一部の実施形態において、１つ以上の挿入部位（例えば、約または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれよりも多い数を超える挿入部位）は、１つ以上のベクターの１つ以上の配列エレメントの上流および／または下流に局在している。一部の実施形態において、ベクターは、ｔｒａｃｒメイト配列の上流、および場合によりｔｒａｃｒメイト配列に作動可能に結合している調節エレメントの下流の挿入部位を含み、その結果、挿入部位中へのガイド配列の挿入後および発現時にガイド配列が真核細胞中の標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向する。一部の実施形態において、ベクターは、２つ以上の挿入部位を含み、それぞれの挿入部位は、それぞれの部位におけるガイド配列の挿入を可能とするために２つのｔｒａｃｒメイト配列間に局在している。このような配置において、２つ以上のガイド配列は、単一ガイド配列の２つ以上のコピー、２つ以上の異なるガイド配列、またはそれらの組合せを含み得る。複数の異なるガイド配列を使用する場合、単一発現構築物を使用して細胞内の複数の異なる対応する標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ活性をターゲティングすることができる。例えば、単一ベクターは、約または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、またはそれよりも多い数を超えるガイド配列を含み得る。一部の実施形態において、約または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれよりも多い数を超えるそのようなガイド配列含有ベクターを提供し、場合により細胞に送達することができる。

【０５３９】

一部の実施形態において、ベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えば、Ｃａｓタンパク質をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している調節エレメントを含む。Ｃａｓタンパク質の非限定的な例としては、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１およびＣｓｘ１２としても公知）、Ｃａｓ１０、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、それらのホモログ、またはそれらの改変バージョンが挙げられる。一部の実施形態において、非改変ＣＲＩＳＰＲ酵素は、ＤＮＡ開裂活性を有し、例えば、Ｃａｓ９である。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の局在における、例えば、標的配列内および／または標的配列の相補鎖内の一方または両方の鎖の開裂を指向する。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の最初または最後のヌクレオチドからの約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、５０、１００、２００、５００、またはそれよりも多い塩基対内の一方または両方の鎖の開裂を指向する。一部の実施形態において、ベクターは、対応する野生型酵素に対して突然変異しているＣＲＩＳＰＲ酵素をコードし、その結果、突然変異ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を開裂する能力を欠く。例えば、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）からのＣａｓ９のＲｕｖＣ　Ｉ触媒ドメイン中のアスパラギン酸からアラニンへの置換（Ｄ１０Ａ）は、Ｃａｓ９を両方の鎖を開裂するヌクレアーゼからニッカーゼ（一本鎖を開裂する）に変換する。Ｃａｓ９をニッカーゼに変える突然変異の他の例としては、限定されるものではないが、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、およびＮ８６３Ａが挙げられる。さらなる例として、Ｃａｓ９の２つ以上の触媒ドメイン（ＲｕｖＣ　Ｉ、ＲｕｖＣ　ＩＩ、およびＲｕｖＣ　ＩＩＩまたはＨＮＨドメイン）を突然変異させて全てのＤＮＡ開裂活性を実質的に欠く突然変異Ｃａｓ９を産生することができる。一部の実施形態において、Ｄ１０Ａ突然変異を、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、またはＮ８６３Ａ突然変異の１つ以上と組み合わせて全てのＤＮＡ開裂活性を実質的に欠くＣａｓ９酵素を産生する。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、突然変異酵素のＤＮＡ開裂活性がその非突然変異形態に対して約２５％、１０％、５％、１％、０．１％、０．０１％、またはそれよりも小さい数未満である場合、全てのＤＮＡ開裂活性を実質的に欠くとみなす。酵素がＳｐＣａｓ９でない場合、ＳｐＣａｓ９の１０位、７６２位、８４０位、８５４位、８６３位および／または９８６位に対応する一部または全部の残基に突然変異が作製されてもよい（これは例えば標準的な配列比較ツールによって確かめることができる。詳細には、ＳｐＣａｓ９において以下の突然変異の一部または全部が好ましい：Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａおよび／またはＤ９８６Ａ；ならびに代替アミノ酸のいずれかについての保存的置換もまた想定される。他のＣａｓ９の対応する位置における同じもの（またはこれらの突然変異の保存的置換）もまた好ましい。特にＳｐＣａｓ９におけるＤ１０およびＨ８４０が好ましい。しかしながら、他のＣａｓ９では、ＳｐＣａｓ９　Ｄ１０およびＨ８４０に対応する残基もまた好ましい。

【０５４０】

ＳｐＣａｓ９のＲｕｖＣ　Ｉ触媒ドメインにおけるアスパラギン酸からアラニンへの置換（Ｄ１０Ａ）をエンジニアリングしてヌクレアーゼをニッカーゼに変換し（ＳｐＣａｓ９ｎ）（例えば、Ｓａｐｒａｎａｕｓｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，３９：９２７５；Ｇａｓｉｕｎａｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１０９：Ｅ２５７９を参照）、ニックの入ったゲノムＤＮＡが高フィデリティ相同性組換え修復（ＨＤＲ）を起こすようにした。Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイにより、ＳｐＣａｓ９ｎがＥＭＸ１プロトスペーサー標的にインデルを生成しないことが確認された。ＥＭＸ１ターゲティングキメラｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ成分も同様に有する）をＳｐＣａｓ９と同時発現させると標的部

位にインデルが生じたが、ＳｐＣａｓ９ｎとの同時発現では生じなかった（ｎ＝３）。さらに、３２７個のアンプリコンのシーケンシングでは、ＳｐＣａｓ９ｎによって誘導されたインデルは検出されなかった。同じ遺伝子座を選択して、ＥＭＸ１を標的とするキメラＲＮＡ、ｈＳｐＣａｓ９またはｈＳｐＣａｓ９ｎ、ならびに一対の制限部位（ＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｈｅＩ）をプロトスペーサー近傍に導入するためのＨＲテンプレートをＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に同時形質移入することにより、ＣＲＩＳＰＲ媒介性ＨＲを試験した。

【０５４１】

本明細書には好ましいオルソログが記載される。Ｃａｓ酵素は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系の複数のヌクレアーゼドメインを有する最大のヌクレアーゼと相同性を共有する一般的な酵素クラスを指し得るとおりＣａｓ９と同定され得る。最も好ましくは、Ｃａｓ９酵素はｓｐＣａｓ９またはｓａＣａｓ９由来であり、またはそれから誘導される。誘導されるとは、本出願人らは、その誘導された酵素が野生型酵素と高度な配列相同性を有するという意味では主に野生型酵素をベースとするが、しかし本明細書に記載されるとおり何らかの形で突然変異している（改変されている）ものであることを意味する。

【０５４２】

用語ＣａｓおよびＣＲＩＳＰＲ酵素は、特に明らかでない限り、本明細書では概して同義的に使用されることが理解されるであろう。上述のとおり、本明細書で使用される残基の付番の多くは化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座由来のＣａｓ９酵素を参照する。しかしながら、この発明が、ＳｐＣａｓ９、ＳａＣａ９、Ｓｔ１Ｃａｓ９など、他の微生物種由来のさらに多くのＣａｓ９を含むことは理解されるであろう。

【０５４３】

コドン最適化

この場合にはヒトに最適化された（すなわちヒトでの発現に最適化されている）コドン最適化配列の例が本明細書に提供される（ＳａＣａｓ９ヒトコドン最適化配列を参照のこと）。これが好ましいが、他の例が可能であることが理解されるであろうとともに、宿主種に対するコドン最適化は公知である。

【０５４４】

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列は、特に細胞、例えば真核細胞での発現にコドンが最適化される。真核細胞は特定の生物、例えば哺乳動物、例えば限定はされないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、または非ヒト哺乳動物または霊長類のものであるかまたはそれに由来し得る。一部の実施形態では、ヒトの生殖系列の遺伝的アイデンティティを改変する方法および／または動物の遺伝的アイデンティティを改変する方法であって、人または動物に対するいかなる実質的な医学的利益もなしにそれらに苦痛を生じさせる可能性がある方法、およびかかる方法から得られる動物もまた、除外され得る。

【０５４５】

一般に、コドン最適化は、天然配列の少なくとも１つのコドン（例えば、約または約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０、またはそれよりも多い数を超えるコドン）を、その宿主細胞の遺伝子中で使用されるより高頻度または最も高頻度のコドンにより置き換える一方、天然アミノ酸配列を維持することにより目的宿主細胞中の発現の向上のために核酸配列を改変するプロセスを指す。種々の種は、特定のアミノ酸のあるコドンについて特定のバイアスを示す。コドンバイアス（生物間のコドン使用頻度の差）は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳の効率と相関することが多く、このことは、次いで、とりわけ、翻訳されるコドンの特性および特定のトランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）分子の利用可能性に依存的であると考えられる。細胞中で選択されるｔＲＮＡの優位性は、一般に、ペプチド合成において最も高頻度で使用されるコドンの反映である。したがって、遺伝子は、コドン最適化に基づき所与の生物中の最適な遺伝子発現のために調整することができる。コドン使用頻度表は、例えば、ｗｗｗ．ｋａｚｕｓａ．ｏｒｊｐ／ｃｏｄｏｎ／（２００２年７月９日にアクセス）で入手可能な「コドン使用頻度データベース

」において容易に入手可能であり、これらの表は、多数の手法で適応させることができる。Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｙ．，ｅｔ ａｌ．“Ｃｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ ｔａｂｕｌａｔｅｄ ｆｒｏｍ ｔｈｅ ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｄａｔａｂａｓｅｓ：ｓｔａｔｕｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｙｅａｒ ２０００”Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８：２９２（２０００）参照。特定の宿主細胞中の発現のために特定の配列をコドン最適化するためのコンピュータアルゴリズムも入手可能であり、例えば、Ｇｅｎｅ Ｆｏｒｇｅ（Ａｐｔａｇｅｎ；Ｊａｃｏｂｕｓ，ＰＡ）も入手可能である。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする配列中の１つ以上のコドン（例えば、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０、またはそれよりも多い、または全てのコドン）は、特定のアミノ酸について最も高頻度で使用されるコドンに対応する。

【０５４６】

核局在化配列（ＮＬＳ）

一部の実施形態において、ベクターは、１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）、例えば、約また約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれよりも多い数を超えるＮＬＳを含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、アミノ末端またはその付近における約または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれよりも多い数を超えるＮＬＳ、カルボキシ末端またはその付近における約または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれよりも多い数を超えるＮＬＳ、またはそれらの組合せ（例えば、アミノ末端における１つ以上のＮＬＳおよびカルボキシ末端における１つ以上のＮＬＳ）を含む。２つ以上のＮＬＳが存在する場合、それぞれは、単一のＮＬＳが２つ以上のコピーで存在し得るように他のものから独立して、および／または１つ以上のコピーで存在する１つ以上の他のＮＬＳとの組合せで選択することができる。本発明の好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、多くとも６つのＮＬＳを含む。一部の実施形態において、ＮＬＳは、ＮＬＳの最近傍アミノ酸が、ＮまたはＣ末端からポリペプチド鎖に沿って約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、またはそれよりも多いアミノ酸内である場合、ＮまたはＣ末端付近に存在するとみなす。ＮＬＳの非限定的な例としては、アミノ酸配列ＰＫＫＫＲＫＶを有するＳＶ４０ウイルスラージＴ抗原のＮＬＳ；ヌクレオプラスミンからのＮＬＳ（例えば、配列ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫを有するヌクレオプラスミン二分（ｂｉｐａｒｔｉｔｅ）ＮＬＳ）；アミノ酸配列ＰＡＡＫＲＶＫＬＤまたはＲＱＲＲＮＥＬＫＲＳＰを有するｃ－ｍｙｃＮＬＳ；配列ＮＱＳＳＮＦＧＰＭＫＧＧＮＦＧＧＲＳＳＧＰＹＧＧＧＱＹＦＡＫＰＲＮＱＧＧＹを有するｈＲＮＰＡ１ Ｍ９ ＮＬＳ；インポーチンアルファからのＩＢＢドメインの配列ＲＭＲＩＺＦＫＮＫＧＫＤＴＡＥＬＲＲＲＶＥＶＳＶＥＬＲＫＡＫＫＤＥＱＩＬＫＲＲＮＶ；筋腫Ｔタンパク質の配列ＶＳＲＫＲＰＲＰおよびＰＰＫＫＡＲＥＤ；ヒトｐ５３の配列ＰＯＰＫＫＫＰＬ；マウスｃ－ａｂｌ ＩＶの配列ＳＡＬＩＫＫＫＫＭＡＰ；インフルエンザウイルスＮＳ１の配列ＤＲＬＲＲおよびＰＫＱＫＫＲＫ；肝炎ウイルスデルタ抗原の配列ＲＫＬＫＫＫＩＫＫＬ；マウスＭｘ１タンパク質の配列ＲＥＫＫＫＦＬＫＲＲ；ヒトポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼの配列ＫＲＫＧＤＥＶＤＧＶＤＥＶＡＫＫＫＳＫＫ；ならびにステロイドホルモン受容体（ヒト）グルココルチコイドの配列ＲＫＣＬＱＡＧＭＮＬＥＡＲＫＴＫＫに由来するＮＬＳ配列が挙げられる。

【０５４７】

一般に、１つ以上のＮＬＳは、真核細胞の核中の検出可能な量のＣＲＩＳＰＲ酵素の蓄積をドライブするために十分な強度である。一般に、核局在化活性の強度は、ＣＲＩＳＰＲ酵素中のＮＬＳの数、使用される特定のＮＬＳ、またはそれらの因子の組合せに由来し得る。核中の蓄積の検出は、任意の好適な技術により実施することができる。例えば、検出可能なマーカーをＣＲＩＳＰＲ酵素に融合させることができ、その結果、細胞内の局在を、例えば、核の局在を検出する手段（例えば、核に特異的な染色、例えば、ＤＡＰＩ）との組合せで可視化することができる。細胞核を細胞から単離することもでき、次いでそ

の含有物を、タンパク質を検出する任意の好適なプロセス、例えば、免疫組織学的分析、ウエスタンブロット、または酵素活性アッセイにより分析することができる。核中の蓄積は、例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体形成の効果についてのアッセイ（例えば、標的配列におけるＤＮＡ開裂もしくは突然変異についてのアッセイ、またはＣＲＩＳＰＲ複合体形成および／もしくはＣＲＩＳＰＲ酵素活性により影響される遺伝子発現活性の変化についてのアッセイ）により、ＣＲＩＳＰＲ酵素にも複合体にも曝露されず、または１つ以上のＮＬＳを欠くＣＲＩＳＰＲ酵素に曝露される対照と比較して間接的に測定することもできる。

【０５４８】

ガイド配列

特に好ましいガイドは、本明細書に記載されるとおり２０～２２ｎｔｄの範囲であり、実施例４０を参照のこと。

【０５４９】

一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向するために標的ポリヌクレオチド配列との十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。一部の実施形態において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを使用して最適にアラインされた場合、約または約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、またはそれよりも大きい数を超える。最適なアラインメントは、配列をアラインするための任意の好適なアルゴリズムを使用して決定することができ、その非限定的な例としては、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム、Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍをベースとするアルゴリズム（例えば、Ｂｕｒｒｏｗｓ Ｗｈｅｅｌｅｒ Ａｌｉｇｎｅｒ）、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｘ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；ｗｗｗ．ｎｏｖｏｃｒａｆｔ．ｃｏｍにおいて入手可能）、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎにおいて入手可能）、およびＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔにおいて入手可能）が挙げられる。一部の実施形態において、ガイド配列は、約または約５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、７５、またはそれよりも大きい数を超えるヌクレオチド長である。一部の実施形態において、ガイド配列は、約７５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１２、またはそれよりも小さい数未満のヌクレオチド長である。標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向するガイド配列の能力は、任意の好適なアッセイにより評価することができる。例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体を形成するために十分なＣＲＩＳＰＲ系の成分、例として、試験すべきガイド配列は、対応する標的配列を有する宿主細胞に、例えば、ＣＲＩＳＰＲ配列の成分をコードするベクターによる形質移入により提供することができ、次いで標的配列内の優先的開裂を例えば本明細書に記載のＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイにより評価する。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の開裂は、試験管中で標的配列、ＣＲＩＳＰＲ複合体の成分、例として、試験すべきガイド配列および試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を提供し、試験および対照ガイド配列反応間の標的配列における結合または開裂の比率を比較することにより評価することができる。他のアッセイが考えられ、当業者はそれを認識する。

【０５５０】

ガイド配列は、任意の標的配列をターゲティングするように選択することができる。一部の実施形態において、標的配列は、細胞のゲノム内の配列である。例示的な標的配列としては、標的ゲノム中でユニークなものが挙げられる。例えば、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９について、ゲノム中のユニーク標的配列としては、フォームＭＭＭＭＭＭＭＭＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＧＧのＣａｓ９標的部位を挙げることができ、ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＧＧ（Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣであり；Ｘは、いずれでもよい）は、ゲノム中の単一発生を有する。ゲノム中のユニーク標的配列としては、フ

ォームＭＭＭＭＭＭＭＭＭＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＧＧの化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９標的部位を挙げることができ、ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＧＧ（Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣであり；Ｘは、いずれであってもよい）は、ゲノム中の単一発生を有する。Ｓ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ１Ｃａｓ９について、ゲノム中のユニーク標的配列としては、フォームＭＭＭＭＭＭＭＭＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＸＡＧＡＡＷのＣａｓ９標的部位を挙げることができ、ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＸＡＧＡＡＷ（Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣであり；Ｘは、いずれであってもよく；Ｗは、ＡまたはＴである）は、ゲノム中の単一発生を有する。ゲノム中のユニーク標的配列としては、フォームＭＭＭＭＭＭＭＭＭＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＸＡＧＡＡＷのＳ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ１Ｃａｓ９標的部位を挙げることができ、ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＸＡＧＡＡＷ（Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣであり；Ｘは、いずれであってもよく；Ｗは、ＡまたはＴである）は、ゲノム中の単一発生を有する。化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９について、ゲノム中のユニーク標的配列としては、フォームＭＭＭＭＭＭＭＭＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＧＧＸＧのＣａｓ９標的部位を挙げることができ、ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＧＧＸＧ（Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣであり；Ｘは、いずれであってもよい）は、ゲノム中の単一発生を有する。ゲノム中のユニーク標的配列としては、フォームＭＭＭＭＭＭＭＭＭＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＧＧＸＧの化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９標的部位を挙げることができ、ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＧＧＸＧ（Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣであり；Ｘは、いずれであってもよい）は、ゲノム中の単一発生を有する。これらの配列のそれぞれにおいて、「Ｍ」は、Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣであり得、配列をユニークと同定するにあたり考慮する必要はない。

【０５５１】

一部の実施形態において、ガイド配列は、ガイド配列内の二次構造の程度を低減させるように選択される。一部の実施形態では、最適に折り畳まれたとき、ガイド配列のヌクレオチドの約７５％前後またはそれ未満、５０％、４０％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、１％、またはそれ未満が、自己相補的塩基対合に関与する。最適な折り畳みは任意の好適なポリヌクレオチド折り畳みアルゴリズムによって決定され得る。一部のプログラムは、最小ギブズ自由エネルギーを計算することに基づく。一つのかかるアルゴリズムの例は、Ｚｕｋｅｒ ａｎｄ Ｓｔｉｅｇｌｅｒ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．９（１９８１），１３３－１４８）により記載されるとおりのｍＦｏｌｄである。別の例示的な折り畳みアルゴリズムは、重心構造予測アルゴリズムを使用した、ウィーン大学（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｖｉｅｎｎａ）のＩｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙで開発されたオンラインウェブサーバＲＮＡｆｏｌｄである（例えば、Ａ．Ｒ．Ｇｒｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｃｅｌｌ １０６（１）：２３－２４；およびＰＡ Ｃａｒｒ ａｎｄ ＧＭ Ｃｈｕｒｃｈ，２００９，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２７（１２）：１１５１－６２を参照）。

【０５５２】

Ｔｒａｃｒメイト配列

一般に、ｔｒａｃｒメイト配列は、（１）対応するｔｒａｃｒ配列を含有する細胞中でｔｒａｃｒメイト配列によりフランキングされているガイド配列の切り出し；および（２）標的配列におけるＣＲＩＳＰＲ複合体の形成（ＣＲＩＳＰＲ複合体は、ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされるｔｒａｃｒメイト配列を含む）の１つ以上を促進するためにｔｒａｃｒ配列との十分な相補性を有する任意の配列を含む。一般に、相補性の程度は、２つの配列の短い方の長さに沿うｔｒａｃｒメイト配列およびｔｒａｃｒ配列の最適なアラインメントに準拠する。最適なアラインメントは、任意の好適なアラインメントアルゴリズムにより決定することができ、二次構造、例えばｔｒａｃｒ配列またはｔｒａｃｒメイト配列内の自己相補性をさらに説明し得る。一部の実施形態において、２つの短い方の長さに沿ったｔｒａｃｒ配列とｔｒａｃｒメイト配列との間の相補性の程度は、最適にアライ

ンされた場合、約または約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、またはそれよりも大きい数を超える。一部の実施形態において、ｔｒａｃｒ配列は、約または約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、４０、５０、またはそれよりも大きい数を超えるヌクレオチド長である。一部の実施形態において、ｔｒａｃｒ配列およびｔｒａｃｔメイト配列は、単一転写物内に含有され、その結果、２つの間のハイブリダイゼーションが二次構造、例えば、ヘアピンを有する転写物を産生する。本発明の一実施形態において、転写物または転写されるポリヌクレオチド配列は、少なくとも２つ以上のヘアピンを有する。好ましい実施形態において、転写物は、２、３、４または５つのヘアピンを有する。本発明の別のさらなる実施形態において、転写物は、多くとも５つのヘアピンを有する。ヘアピン構造において、最後の「Ｎ」およびループの上流の５’側の配列の部分は、ｔｒａｃｒメイト配列に対応し、ループの３’側の配列の部分は、ｔｒａｃｒ配列に対応する。ガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列、およびｔｒａｃｒ配列を含む単一ポリヌクレオチドのさらなる非限定的な例は、以下のとおりであり（５’から３’に列記）、「Ｎ」は、ガイド配列の塩基を表し、第１の小文字のブロックは、ｔｒａｃｒメイト配列を表し、第２の小文字のブロックは、ｔｒａｃｒ配列を表し、最後のポリＴ配列は、転写ターミネーターを表す：

【化１】

(1)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgtttttgtactctcaagatttaGAAAtaaatcttgcagaagctacaaagataaggcttcatgccgaaatcaacaccctgtcattttatggcagggtgttttcgttatttaaTTTTTT;

(2)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgtttttgtactctcaGAAAtgcagaagctacaaagataaggcttcatgccgaaatcaacaccctgtcattttatggcagggtgttttcgttatttaaTTTTTT;

(3)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgtttttgtactctcaGAAAtgcagaagctacaaagataaggcttcatgccgaaatcaacaccctgtcattttatggcagggtgtTTTTTT;

(4)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcTTTTTT;

(5)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctaGAAATAGcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtgTTTTTTT;

および

(6)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctagAAATAGcaagttaaaataaggctagtccgttatcaTTTTTTTT

一部の実施形態において、配列（１）から（３）は、Ｓ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ１からのＣａｓ９との組合せで使用される。一部の実施形態において、配列（４）から（６）は、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）からのＣａｓ９との組合せで使用される。一部の実施形態において、ｔｒａｃｒ配列は、ｔｒａｃｒメイト配列を含む転写物と別個の転写物である。

【０５５３】

組換えテンプレート

一部の実施形態において、組換えテンプレートも提供される。組換えテンプレートは、本明細書に記載の別のベクターの成分であり、別個のベクター中で含有させ、または別個のポリヌクレオチドとして提供することができる。一部の実施形態において、組換えテンプレートは、例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体の一部としてのＣＲＩＳＰＲ酵素によりニック形成または開裂される標的配列内またはその付近での相同組換えにおけるテンプレートとして機能するように設計される。テンプレートポリヌクレオチドは、任意の好適な長さ、例えば、約または約１０、１５、２０、２５、５０、７５、１００、１５０、２００、５

００、１０００、またはそれよりも大きい数を超えるヌクレオチド長であり得る。一部の実施形態において、テンプレートポリヌクレオチドは、標的配列を含むポリヌクレオチドの一部に相補的である。最適にアラインされた場合、テンプレートポリヌクレオチドは、標的配列の１つ以上のヌクレオチド（例えば、約または約１、５、１０、１５、２０またはそれよりも多い数を超えるヌクレオチド）と重複し得る。一部の実施形態において、テンプレート配列および標的配列を含むポリヌクレオチドが最適にアラインされた場合、テンプレートポリヌクレオチドの最近傍ヌクレオチドは、標的配列から約１、５、１０、１５、２０、２５、５０、７５、１００、２００、３００、４００、５００、１０００、５０００、１００００、またはそれよりも多いヌクレオチド内に存在する。

【０５５４】

融合タンパク質

一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、１つ以上の異種タンパク質ドメイン（例えば、ＣＲＩＳＰＲ酵素の他の約または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれよりも多い数を超えるドメイン）を含む融合タンパク質の一部である。ＣＲＩＳＰＲ酵素融合タンパク質は、任意の追加のタンパク質配列、および場合により任意の２つのドメイン間のリンカー配列を含み得る。ＣＲＩＳＰＲ酵素に融合させることができるタンパク質ドメインの例としては、限定されるものではないが、エピトープタグ、レポーター遺伝子配列、ならびに以下の活性：メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン修飾活性、ＲＮＡ開裂活性および核酸結合活性の１つ以上を有するタンパク質ドメインが挙げられる。エピトープタグの非限定的な例としては、ヒスチジン（Ｈｉｓ）タグ、Ｖ５タグ、ＦＬＡＧタグ、インフルエンザヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、Ｍｙｃタグ、ＶＳＶ－Ｇタグ、およびチオレドキシン（Ｔｒｘ）タグが挙げられる。レポーター遺伝子の例としては、限定されるものではないが、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、セイヨウ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）ベーターガラクトシダーゼ、ベーターグルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ＨｃＲｅｄ、ＤｓＲｅｄ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、および自己蛍光タンパク質、例として、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）が挙げられる。ＣＲＩＳＰＲ酵素は、ＤＮＡ分子に結合し、または他の細胞分子に結合するタンパク質またはタンパク質の断片、例として、限定されるものではないが、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、Ｓ－タグ、Ｌｅｘ　Ａ　ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）融合物、ＧＡＬ４ＤＮＡ結合ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）ＢＰ１６タンパク質融合物をコードする遺伝子配列に融合させることができる。ＣＲＩＳＰＲ酵素を含む融合タンパク質の一部を形成し得る追加のドメインは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１１００５９５０２号明細書に記載されている。一部の実施形態において、タグ化ＣＲＩＳＰＲ酵素を使用して標的配列の局在を同定する。

【０５５５】

誘導性システム

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は誘導性システムの成分をなし得る。このシステムの誘導可能である性質により、エネルギーの形態を用いた遺伝子編集または遺伝子発現の時空間的制御が可能となり得る。エネルギーの形態としては、限定はされないが、電磁放射線、音響エネルギー、化学エネルギーおよび熱エネルギーを挙げることができる。誘導性システムの例には、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Ｔｅｔ－ＯｎまたはＴｅｔ－Ｏｆｆ）、小分子２ハイブリッド転写活性化システム（ＦＫＢＰ、ＡＢＡ等）、または光誘導性システム（フィトクロム、ＬＯＶドメイン、またはクリプトクロム）が含まれる。一実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、配列特異的に転写活性の変化を誘導する光誘導性転写エフェクター（ＬＩＴＥ）の一部であり得る。光の成分には、ＣＲＩＳＰＲ酵素、光応答性シトクロムヘテロ二量体（例えばシロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ）由来）、および転写活性化／抑制ドメインが含まれ得る。誘導性ＤＮＡ結合タンパク質およびその使用方法のさらなる例は、米国仮特許出願第６１／７

３６４６５号明細書および米国特許出願第６１／７２１，２８３号明細書（本明細書によって全体として参照により組み込まれる）に提供される。

【０５５６】

送達

一部の態様において、本発明は、１つ以上のポリヌクレオチド、例えば、または本明細書に記載の１つ以上のベクター、１つ以上のその転写物、および／またはそれから転写された１つまたはタンパク質を宿主細胞に送達することを含む方法を提供する。一部の態様において、本発明は、そのような細胞により産生された細胞、およびそのような細胞を含み、またはそれから産生された動物をさらに提供する。一部の実施形態において、ガイド配列との組合せの（および場合によりそれと複合体形成している）ＣＲＩＳＰＲ酵素を細胞に送達する。慣用のウイルスおよび非ウイルスベース遺伝子移入法を使用して核酸を哺乳動物細胞または標的組織中に導入することができる。このような方法を使用してＣＲＩＳＰＲ系の成分をコードする核酸を培養物中の細胞に、または宿主生物中に投与することができる。非ウイルスベクター送達系としては、ＤＮＡプラスミド、ＲＮＡ（例えば、本明細書に記載のベクターの転写物）、ネイキッド核酸、および送達ビヒクル、例えば、リポソームと複合体形成している核酸が挙げられる。ウイルスベクター送達系としては、細胞への送達後にエピソーム性またはインテグレートされるゲノムを有するＤＮＡおよびＲＮＡウイルスが挙げられる。遺伝子療法手順の概要については、Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６：８０８－８１３（１９９２）；Ｎａｂｅｌ ＆ Ｆｅｌｇｎｅｒ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：２１１－２１７（１９９３）；Ｍｉｔａｎｉ ＆ Ｃａｓｋｅｙ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：１６２－１６６（１９９３）；Ｄｉｌｌｏｎ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：１６７－１７５（１９９３）；Ｍｉｌｌｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ ３５７：４５５－４６０（１９９２）；Ｖａｎ Ｂｒｕｎｔ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６（１０）：１１４９－１１５４（１９８８）；Ｖｉｇｎｅ，Ｒｅｓｔｏｒａｔｉｖｅ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ ８：３５－３６（１９９５）；Ｋｒｅｍｅｒ ＆ Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｂｕｌｌｅｔｉｎ ５１（１）：３１－４４（１９９５）；Ｈａｄｄａｄａ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｄｏｅｒｆｌｅｒ ａｎｄ Ｂｏｅｈｍ（ｅｄｓ）（１９９５）；およびＹｕ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：１３－２６（１９９４）参照。

【０５５７】

核酸の非ウイルス送達の方法としては、リポフェクション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、ネイキッドＤＮＡ、人工ビリオン、および薬剤により向上されるＤＮＡの取り込みが挙げられる。リポフェクションは、例えば、米国特許第５，０４９，３８６号明細書、同第４，９４６，７８７号明細書；および同第４，８９７，３５５号明細書）に記載されており、リポフェクション試薬は、市販されている（例えば、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ（商標）およびＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎ（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適なカチオンおよび中性脂質としては、Ｆｅｌｇｎｅｒ、国際公開第９１／１７４２４号パンフレット；国際公開第９１／１６０２４号パンフレットのものが挙げられる。送達は、細胞（例えば、インビトロまたはエクスビボ投与）または標的組織（例えば、インビボ投与）に対するものであり得る。

【０５５８】

脂質：核酸複合体、例として、ターゲティングされるリポソーム、例えば、免疫脂質複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、Ｃｒｙｓｔａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４０４－４１０（１９９５）；Ｂｌａｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２：２９１－２９７（１９９５）；Ｂｅｈｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：３８２－３８９（１９９４）；Ｒｅｍｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：６４７－６５４（１９９４）；Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２：７１０－７２２（１９９５）；Ａｈｍａｄ

ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５２：４８１７－４８２０（１９９２）；米国特許第４，１８６，１８３号明細書、同第４，２１７，３４４号明細書、同第４，２３５，８７１号明細書、同第４，２６１，９７５号明細書、同第４，４８５，０５４号明細書、同第４，５０１，７２８号明細書、同第４，７７４，０８５号明細書、同第４，８３７，０２８号明細書、および同第４，９４６，７８７号明細書参照）。

【０５５９】

核酸の送達のためのＲＮＡまたはＤＮＡウイルスベース系の使用は、ウイルスを体内の規定の細胞にターゲティングし、ウイルスペイロードを核に輸送する高度に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターは、患者に直接投与することができ（インビボ）、またはそれらを使用してインビトロで細胞を治療することができ、場合により、改変された細胞を患者に投与することができる（エクスビボ）。慣用のウイルスベース系としては、遺伝子移入のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴および単純ヘルペスウイルスベクターを挙げることができる。宿主ゲノム中のインテグレーションは、レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルス遺伝子移入法について考えられ、挿入されたトランス遺伝子の長期発現をもたらすことが多い。さらに、高い形質導入効率が多くの異なる細胞タイプおよび標的組織において観察されている。

【０５６０】

レトロウイルスの向性は、外来エンベロープタンパク質を取り込むことにより変え、標的細胞の潜在的な標的集団を拡大することができる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入または感染し、典型的には、高ウイルス力価を産生し得るレトロウイルスベクターである。したがって、レトロウイルス遺伝子移入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、６～１０ｋｂまでの外来配列のためのパッケージング能を有するシス作用長鎖末端リピートを含む。最小シス作用ＬＴＲは、ベクターの複製およびパッケージングに十分であり、次いでそれを使用して治療遺伝子を標的細胞中にインテグレートして恒久的なトランス遺伝子発現を提供する。広く使用されるレトロウイルスベクターとしては、ネズミ白血病ウイルス（ＭｕＬＶ）、テナガザル白血病ウイルス（ＧａＬＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）をベースとするもの、またはそれらの組合せが挙げられる（例えば、Ｂｕｃｈｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：２７３１－２７３９（１９９２）；Ｊｏｈａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：１６３５－１６４０（１９９２）；Ｓｏｍｍｎｅｒｆｅｌｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌ．１７６：５８－５９（１９９０）；Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：２３７４－２３７８（１９８９）；Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６５：２２２０－２２２４（１９９１）；ＰＣＴ／ＵＳ９４／０５７００号明細書参照）。

【０５６１】

別の実施形態において、コカル（Ｃｏｃａｌ）ベシクロウイルスエンベロープ偽型レトロウイルスベクター粒子が企図される（例えば、フレッド・ハッチンソン癌研究センター（Ｆｒｅｄ Ｈｕｔｃｈｉｎｓｏｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｅｒ）に譲渡された米国特許出願公開第２０１２０１６４１１８号明細書を参照のこと）。コカルウイルスはベシクロウイルス属（Ｖｅｓｉｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）であり、哺乳動物における水疱性口内炎の原因病原体である。コカルウイルスは、当初はトリニダードでダニから分離されたもので（Ｊｏｎｋｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｖｅｔ．Ｒｅｓ．２５：２３６－２４２（１９６４））、トリニダード、ブラジル、およびアルゼンチンで昆虫、ウシ、およびウマから感染が同定されている。哺乳動物に感染するベシクロウイルスの多くは、自然感染した節足動物から分離されており、ベシクロウイルスがベクター媒介性であることが示唆される。ベシクロウイルスに対する抗体は農村地域に住む人々によく見られ、このウイルスは地方病性であり、実験室内感染性である；ヒトにおける感染は、通常はインフルエンザ様症状をもたらす。コカルウイルスエンベロープ糖タンパク質はアミノ酸レベルでＶＳＶ－Ｇインディアナと７１．５％の同一性を共有し、ベシクロウイルスのエンベロープ遺伝子の系統発生学的比較では、ベシクロウイルスの中でコカルウイルス

がＶＳＶ－Ｇインディアナ株と血清学的には異なるが、最も近縁であることが示される。Ｊｏｎｋｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｖｅｔ．Ｒｅｓ．２５：２３６－２４２（１９６４）およびＴｒａｖａｓｓｏｓ ｄａ Ｒｏｓａ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｔｒｏｐｉｃａｌ Ｍｅｄ．＆ Ｈｙｇｉｅｎｅ ３３：９９９－１００６（１９８４）。コカルベシクロウイルスエンベロープ偽型レトロウイルスベクター粒子には、例えば、レトロウイルスのＧａｇ、Ｐｏｌ、および／または１つ以上のアクセサリータンパク質およびコカルベシクロウイルスエンベロープタンパク質を含み得るレンチウイルス、アルファレトロウイルス、ベータレトロウイルス、ガンマレトロウイルス、デルタレトロウイルス、およびイプシロンレトロウイルスベクター粒子が含まれ得る。これらの実施形態の特定の態様の範囲内において、Ｇａｇ、Ｐｏｌ、およびアクセサリータンパク質はレンチウイルスおよび／またはガンマレトロウイルスのものである。

【０５６２】

一過的発現が好ましい用途においては、アデノウイルスベース系を使用することができる。アデノウイルスベースベクターは、多くの細胞タイプにおいて極めて高い形質導入効率を示し得、細胞分裂を要求しない。このようなベクターについて、高い力価および発現のレベルが得られている。このベクターは、比較的単純な系で大量に産生することができる。

【０５６３】

例えば、核酸およびペプチドのインビトロ産生において、ならびにインビボおよびエクスビボ遺伝子療法手順のためにアデノ随伴ウイルス（「ＡＡＶ」）ベクターを使用して細胞に標的核酸を形質導入することもできる（例えば、Ｗｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １６０：３８－４７（１９８７）；米国特許第４，７９７，３６８号明細書；国際公開第９３／２４６４１号パンフレット；Ｋｏｔｉｎ，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：７９３－８０１（１９９４）；Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９４：１３５１（１９９４）参照。組換えＡＡＶベクターの構築は、多数の刊行物、例として、米国特許第５，１７３，４１４号明細書；Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３２５１－３２６０（１９８５）；Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４：２０７２－２０８１（１９８４）；Ｈｅｒｍｏｎａｔ ＆ Ｍｕｚｙｃｚｋａ，ＰＮＡＳ ８１：６４６６－６４７０（１９８４）；およびＳａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：０３８２２－３８２８（１９８９）に記載されている。

【０５６４】

典型的には、パッケージング細胞を使用して宿主細胞に感染し得るウイルス粒子を形成する。このような細胞としては、アデノウイルスをパッケージングする２９３細胞、およびレトロウイルスをパッケージングするψ２細胞またはＰＡ３１７細胞が挙げられる。遺伝子療法において使用されるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子中にパッケージングする細胞系を産生することにより生成する。ベクターは、典型的には、パッケージングおよび後続の宿主中へのインテグレーションに要求される最小ウイルス配列を含有し、他のウイルス配列は、発現させるべきポリヌクレオチドのための発現カセットにより置き換えられている。欠損ウイルス機能は、典型的には、パッケージング細胞系によりトランスで供給する。例えば、遺伝子療法において使用されるＡＡＶベクターは、典型的には、宿主ゲノム中へのパッケージングおよびインテグレーションに要求されるＡＡＶゲノムからのＩＴＲ配列のみを有する。ウイルスＤＮＡは、他のＡＡＶ遺伝子、すなわち、ｒｅｐおよびｃａｐをコードするが、ＩＴＲ配列を欠くヘルパープラスミドを含有する細胞系中にパッケージングされる。細胞系は、ヘルパーとしてのアデノウイルスにより感染させることもできる。ヘルパーウイルスは、ＡＡＶベクターの複製およびヘルパープラスミドからのＡＡＶ遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ＩＴＲ配列の欠如に起因して顕著な量でパッケージングされない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスがＡＡＶよりも感受性である熱処理により低減させることができる。

【０５６５】

従って、ＡＡＶは形質導入ベクターとして使用するのに理想的な候補と考えられる。かかるＡＡＶ形質導入ベクターは、トランスに提供されるアデノウイルスまたはヘルペスウイルスまたはポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルス）ヘルパー機能の存在下で複製するのに十分なシス作用性機能を含み得る。組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）を使用して種々の系統の細胞に外来性遺伝子を運び込むことができる。これらのベクターでは、ＡＡＶｃａｐおよび／またはｒｅｐ遺伝子をウイルスゲノムから欠失させ、選択のＤＮＡセグメントに置き換える。現在のＡＡＶベクターは、最大４３００塩基の挿入ＤＮＡを収容し得る。

【０５６６】

ｒＡＡＶの作製方法は数多くあり、本発明はｒＡＡＶおよびｒＡＡＶの調製方法を提供する。例えば、所望の構築物を含むまたはそれから本質的になる１つまたは複数のプラスミドが、ＡＡＶ感染細胞に形質移入される。加えて、第２のまたは追加のヘルパープラスミドがこれらの細胞に同時形質移入され、組換え構築物の複製およびパッケージングに必須のＡＡＶ　ｒｅｐおよび／またはｃａｐ遺伝子が提供される。これらの条件下で、ＡＡＶのｒｅｐおよび／またはｃａｐタンパク質はトランスに作用してｒＡＡＶ構築物の複製およびパッケージングを刺激する。形質移入後２～３日でｒＡＡＶは回収される。従来、ｒＡＡＶはアデノウイルスと共に細胞から回収される。次に汚染アデノウイルスが熱処理によって不活性化される。本発明では、ｒＡＡＶは有利には、細胞それ自体からではなく、細胞上清から回収される。従って、最初の態様では本発明はｒＡＡＶを調製することを提供し、および前述に加えて、以下を含むまたはそれから本質的になる方法によりｒＡＡＶを調製することができる：発現用ＤＮＡを含む外来性ＤＮＡと、ヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスなどのポックスウイルス）とを含有するｒＡＡＶを感受性細胞に感染させるステップであって、ｒＡＡＶが機能性ｃａｐおよび／またはｒｅｐを欠損している（およびヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスなどのポックスウイルス）はｒＡＡＶに欠損しているｃａｐおよび／またはｒｅｖ機能を提供する）ステップ；または発現用ＤＮＡを含む外来性ＤＮＡを含有するｒＡＡＶを感受性細胞に感染させるステップであって、組換え体が機能性ｃａｐおよび／またはｒｅｐを欠損しているステップと、ｒＡＡＶに欠損しているｃａｐおよび／またはｒｅｐ機能を提供するプラスミドを前記細胞に形質移入すること；または発現用ＤＮＡを含む外来性ＤＮＡを含有するｒＡＡＶを感受性細胞に感染させるステップであって、組換え体が機能性ｃａｐおよび／またはｒｅｐを欠損しており、前記細胞が、組換え体に欠損しているｃａｐおよび／またはｒｅｐ機能を提供すること；または機能性ｃａｐおよび／またはｒｅｐを欠損しているＡＡＶと、外来性ＤＮＡが組換え体によって発現されるように外来性ＤＮＡを組換え体に挿入するための、かつｒｅｐおよび／またはｃａｐ機能を提供するためのプラスミドとを感受性細胞に形質移入することであって、従って形質移入により、機能性ｃａｐおよび／またはｒｅｐが欠損した、発現用ＤＮＡを含む外来性ＤＮＡを含有するｒＡＡＶがもたらされること。

【０５６７】

ｒＡＡＶは、本明細書に記載されるとおりＡＡＶ由来であってもよく、有利には、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはそれらの任意の組み合わせを含み得るハイブリッドカプシドを有するｒＡＡＶ１、ｒＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはｒＡＡＶであり得る。ｒＡＡＶのＡＡＶは、ｒＡＡＶが標的とする細胞に関連して選択することができる；例えば、脳または神経細胞のターゲティングには、ＡＡＶ血清型１、２、５またはハイブリッドカプシドＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはそれらの任意の組み合わせを選択することができ；および心臓組織のターゲティングには、ＡＡＶ４を選択することができる。

【０５６８】

２９３細胞に加えて、本発明の実施に用いることのできる他の細胞およびそれらの細胞に関するインビトロでの特定のＡＡＶ血清型の相対的感染力（Ｇｒｉｍｍ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．８２：５８８７－５９１１（２００８）を参照）は以下のとおりである。

【０５６９】
【表１１】

細胞系	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-8	AAV-9
Huh-7	13	100	2.5	0.0	0.1	10	0.7	0.0
HEK293	25	100	2.5	0.1	0.1	5	0.7	0.1
HeLa	3	100	2.0	0.1	6.7	1	0.2	0.1
HepG2	3	100	16.7	0.3	1.7	5	0.3	ND
Hep1A	20	100	0.2	1.0	0.1	1	0.2	0.0
911	17	100	11	0.2	0.1	17	0.1	ND
CHO	100	100	14	1.4	333	50	10	1.0
COS	33	100	33	3.3	5.0	14	2.0	0.5
MeWo	10	100	20	0.3	6.7	10	1.0	0.2
NIH3T3	10	100	2.9	2.9	0.3	10	0.3	ND
A549	14	100	20	ND	0.5	10	0.5	0.1
HT1180	20	100	10	0.1	0.3	33	0.5	0.1
単球	1111	100	ND	ND	125	1429	ND	ND
未成熟 DC	2500	100	ND	ND	222	2857	ND	ND
成熟 DC	2222	100	ND	ND	333	3333	ND	ND

【０５７０】
本発明は、ＣＲＩＳＰＲ（クラスター化等間隔短鎖回分リピート）系をコードする外来性核酸分子、例えば、プロモーターと、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質（推定ヌクレアーゼまたはヘリカーゼタンパク質）、例えばＣａｓ９をコードする核酸分子と、ターミネーターとを含むまたはそれから本質的になる第１のカセット、およびプロモーターと、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードする核酸分子と、ターミネーターとを含むまたはそれから本質的になる２つ、またはそれ以上の、有利にはベクターのパッケージングサイズ限界に至るまでの、例えば合計で（第１のカセットを含めて）５つのカセット（例えば、各カセットは概略的に、プロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター、プロモーター－ｇＲＮＡ２－ターミネーター．．．プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーター（式中、Ｎは、ベクターのパッケージングサイズ限界の上限である挿入可能な数である）と表される）を含むまたはそれからなる複数のカセットを含むまたはそれから本質的になるｒＡＡＶ、または２つ以上の個々のｒＡＡＶであって、各々がＣＲＩＳＰＲ系の１つまたは２つ以上のカセットを含み、例えば、第１のｒＡＡＶが、プロモーターと、Ｃａｓ、例えばＣａｓ９をコードする核酸分子と、ターミネーターとを含むまたはそれから本質的になる第１のカセットを含み、および第２のｒＡＡＶが、プロモーターと、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードする核酸分子と、ターミネーターとを含むまたはそれから本質的になる複数の４つのカセット（例えば、各カセットは概略的に、プロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター、プロモーター－ｇＲＮＡ２－ターミネーター．．．プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーター（式中、Ｎは、ベクターのパッケージングサイズ限界の上限である挿入可能な数である）と表される）を含むｒＡＡＶを提供する。ｒＡＡＶはＤＮＡウイルスであるため、ＡＡＶまたはｒＡＡＶに関する本明細書の考察における核酸分子は、有利にはＤＮＡである。プロモーターは、一部の実施形態では有利にはヒトシナプシンＩ

プロモーター（ｈＳｙｎ）である。

【０５７１】

核酸を細胞に送達する追加の方法は、当業者に公知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２００３００８７８１７号明細書参照。同様に参照によって援用され、かつ本明細書で考察されるＫａｎａｓｔｙもまた参照のこと。

【０５７２】

一部の実施形態において、宿主細胞を、本明細書に記載の１つ以上のベクターにより一過的にまたは非一過的に形質移入する。一部の実施形態において、細胞を、それが対象中で天然に生じるままで形質移入する。一部の実施形態において、形質移入される細胞を対象から採取する。一部の実施形態において、細胞は、対象から採取された細胞、例えば、細胞系に由来する。組織培養のための広範な細胞系は、当技術分野において公知である。細胞系の例としては、限定されるものではないが、Ｃ８１６１、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ、ＭＯＬＴ、ｍＩＭＣＤ－３、ＮＨＤＦ、ＨｅＬａ－Ｓ３、Ｈｕｈ１、Ｈｕｈ４、Ｈｕｈ７、ＨＵＶＥＣ、ＨＡＳＭＣ、ＨＥＫｎ、ＨＥＫａ、ＭｉａＰａＣｅｌｌ、Ｐａｎｃ１、ＰＣ－３、ＴＦ１、ＣＴＬＬ－２、Ｃ１Ｒ、Ｒａｔ６、ＣＶ１、ＲＰＴＥ、Ａ１０、Ｔ２４、Ｊ８２、Ａ３７５、ＡＲＨ－７７、Ｃａｌｕ１、ＳＷ４８０、ＳＷ６２０、ＳＫＯＶ３、ＳＫ－ＵＴ、ＣａＣｏ２、Ｐ３８８Ｄ１、ＳＥＭ－Ｋ２、ＷＥＨＩ－２３１、ＨＢ５６、ＴＩＢ５５、Ｊｕｒｋａｔ、Ｊ４５．０１、ＬＲＭＢ、Ｂｃｌ－１、ＢＣ－３、ＩＣ２１、ＤＬＤ２、Ｒａｗ２６４．７、ＮＲＫ、ＮＲＫ－５２Ｅ、ＭＲＣ５、ＭＥＦ、Ｈｅｐ Ｇ２、ＨｅＬａ Ｂ、ＨｅＬａ Ｔ４、ＣＯＳ、ＣＯＳ－１、ＣＯＳ－６、ＣＯＳ－Ｍ６Ａ、ＢＳ－Ｃ－１サル腎臓上皮、ＢＡＬＢ／３Ｔ３マウス胚線維芽細胞、３Ｔ３Ｓｗｉｓｓ、３Ｔ３－Ｌ１、１３２－ｄ５ヒト胎児線維芽細胞；１０．１マウス線維芽細胞、２９３－Ｔ、３Ｔ３、７２１、９Ｌ、Ａ２７８０、Ａ２７８０ＡＤＲ、Ａ２７８０ｃｉｓ、Ａ１７２、Ａ２０、Ａ２５３、Ａ４３１、Ａ－５４９、ＡＬＣ、Ｂ１６、Ｂ３５、ＢＣＰ－１細胞、ＢＥＡＳ－２Ｂ、ｂＥｎｄ．３、ＢＨＫ－２１、ＢＲ２９３、ＢｘＰＣ３、Ｃ３Ｈ－１０Ｔ１／２、Ｃ６／３６、Ｃａｌ－２７、ＣＨＯ、ＣＨＯ－７、ＣＨＯ－ＩＲ、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－Ｋ２、ＣＨＯ－Ｔ、ＣＨＯ Ｄｈｆｒ－／－、ＣＯＲ－Ｌ２３、ＣＯＲ－Ｌ２３／ＣＰＲ、ＣＯＲ－Ｌ２３／５０１０、ＣＯＲ－Ｌ２３／Ｒ２３、ＣＯＳ－７、ＣＯＶ－４３４、ＣＭＬ Ｔ１、ＣＭＴ、ＣＴ２６、Ｄ１７、ＤＨ８２、ＤＵ１４５、ＤｕＣａＰ、ＥＬ４、ＥＭ２、ＥＭ３、ＥＭＴ６／ＡＲ１、ＥＭＴ６／ＡＲ１０．０、ＦＭ３、Ｈ１２９９、Ｈ６９、ＨＢ５４、ＨＢ５５、ＨＣＡ２、ＨＥＫ－２９３、ＨｅＬａ、Ｈｅｐａ１ｃ１ｃ７、ＨＬ－６０、ＨＭＥＣ、ＨＴ－２９、Ｊｕｒｋａｔ、ＪＹ細胞、Ｋ５６２細胞、Ｋｕ８１２、ＫＣＬ２２、ＫＧ１、ＫＹＯ１、ＬＮＣａｐ、Ｍａ－Ｍｅｌ１－４８、ＭＣ－３８、ＭＣＦ－７、ＭＣＦ－１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５、ＭＤＣＫ ＩＩ、ＭＤＣＫ ＩＩ、ＭＯＲ／０．２Ｒ、ＭＯＮＯ－ＭＡＣ６、ＭＴＤ－１Ａ、ＭｙＥｎｄ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＣＰＲ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ１０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ２０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ４、ＮＩＨ－３Ｔ３、ＮＡＬＭ－１、ＮＷ－１４５、ＯＰＣＮ／ＯＰＣＴ細胞系、Ｐｅｅｒ、ＰＮＴ－１Ａ／ＰＮＴ２、ＲｅｎＣａ、ＲＩＮ－５Ｆ、ＲＭＡ／ＲＭＡＳ、Ｓａｏｓ－２細胞、Ｓｆ－９、ＳｋＢｒ３、Ｔ２、Ｔ－４７Ｄ、Ｔ８４、ＴＨＰ１細胞系、Ｕ３７３、Ｕ８７、Ｕ９３７、ＶＣａＰ、Ｖｅｒｏ細胞、ＷＭ３９、ＷＴ－４９、Ｘ６３、ＹＡＣ－１、ＹＡＲ、およびそれらのトランスジェニック変種が挙げられる。細胞系は、当業者に公知の種々の資源から入手可能である（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（Ｍａｎａｓｓｕｓ，Ｖａ．）参照）。一部の実施形態において、本明細書に記載の１つ以上のベクターにより形質移入された細胞を使用して１つ以上のベクター由来配列を含む新たな細胞系を樹立する。一部の実施形態において、本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ系の成分により一過的に形質移入され（例えば、１つ以上のベクターの一過的形質移入、またはＲＮＡによる形質移入により）、ＣＲＩＳＰＲ複合体の活性を通して改変された細胞を使用して改変を含有するがあらゆる他の外因性配列を欠く細胞を含む新たな細胞系を樹立する。一部の実施形態において、本明細書に記載の１

つ以上のベクターにより一過的にまたは非一過的に形質移入された細胞、またはそのような細胞に由来する細胞系を、１つ以上の試験化合物の評価において使用する。

【０５７３】

一部の実施形態において、本明細書に記載の１つ以上のベクターを使用して非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物を産生する。一部の実施形態において、トランスジェニック動物は、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、またはウサギである。トランスジェニック動物および植物を産生する方法は、当技術分野において公知であり、一般に、例えば、本明細書に記載の細胞形質移入の方法から出発する。

【０５７４】

別の実施形態において、針のアレイを備える流体送達装置（例えば、フレッド・ハッチンソン癌研究センター（Ｆｒｅｄ Ｈｕｔｃｈｉｎｓｏｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｅｒ）に譲渡された米国特許出願公開第２０１１０２３０８３９号明細書を参照のこと）が、固形組織に対するＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの送達に企図され得る。流体を固形組織に送達するための米国特許出願公開第２０１１０２３０８３９号明細書の装置は、アレイ状に配置された複数の針と；各々が複数の針のそれぞれ１つと流体連通している複数のリザーバと；複数のリザーバのそれぞれ１つに動作可能に結合されかつリザーバ内の流体圧力を制御するように構成された複数のアクチュエータとを含み得る。特定の実施形態では、複数のアクチュエータの各々が複数のプランジャの１つを含むことができ、複数のプランジャの各々の第１の端部が複数のリザーバのそれぞれ１つに受け入れられ、および特定の実施形態では複数のプランジャのプランジャがそれぞれの第２の端部で一体に動作可能に結合され、同時に押し下げることが可能である。特定のさらに別の実施形態は、複数のプランジャの全てを選択的に変更可能な速度で押し下げるように構成されたプランジャ駆動装置を含み得る。他の実施形態では、複数のアクチュエータの各々が、第１の端部と第２の端部とを有する複数の流体送出路の１つを含むことができ、複数の流体送出路の各々の第１の端部が複数のリザーバのそれぞれ１つに結合される。他の実施形態では、この装置は流体圧力源を含むことができ、および複数のアクチュエータの各々が流体圧力源と複数のリザーバのそれぞれ１つとの間の流体継手を含む。さらなる実施形態では、流体圧力源は、圧縮機、真空アキュムレータ、蠕動ポンプ、マスターシリンダー、マイクロ流体ポンプ、およびバルブのうちの少なくとも１つを含み得る。別の実施形態において、複数の針の各々は、その長さに沿って配置された複数のポートを含み得る。

【０５７５】

標的の改変

一態様において、本発明は、真核細胞における標的ポリヌクレオチドを改変する方法を提供し、これはインビボ、エキソビボまたはインビトロであってよい。一部の実施形態では、本方法は、ヒトまたは非ヒト動物または植物から細胞または細胞集団を採取することまたは生検を行うこと、および１つまたは複数の細胞を改変することを含む。培養は任意の段階でエキソビボで行われ得る。１つまたは複数の細胞は、さらには非ヒト動物または植物に再導入されてもよい。再導入される細胞に関して、細胞が幹細胞であることが特に好ましい。

【０５７６】

一部の実施形態では、本方法は、ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ、それにより標的ポリヌクレオチドを改変することを含み、ここでＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体形成するＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、前記ガイド配列はｔｒａｃｒメイト配列に結合し、次にはｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする。

【０５７７】

一態様において、本発明は、真核細胞におけるポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、ＣＲＩＳＰＲ複合体をポリヌクレオチドに結合させるステップであって、前記結合により前記ポリヌクレオチドの発現の増加または

減少がもたらされることを含み；ここでＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体形成するＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、前記ガイド配列はｔｒａｃｒメイト配列に結合し、次にはｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする。同様の考慮事項および条件が、上記のとおり標的ポリヌクレオチドを改変する方法に適用される。実際上、これらの採取、培養および再導入のオプションは本発明の全態様に適用される。

【０５７８】

実際、本発明の任意の態様において、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体形成するＣＲＩＳＰＲ酵素を含むことができ、ここで前記ガイド配列はｔｒａｃｒメイト配列に結合することができ、次にはｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズすることができる。同様の考慮事項および条件が、上記のとおり標的ポリヌクレオチドを改変する方法に適用される。

【０５７９】

キット

一態様において、本発明は、上記の方法および組成物に開示されるエレメントの任意の１つ以上を含むキットを提供する。エレメントは個々にまたは組み合わせで提供されてもよく、および任意の好適な容器、例えば、バイアル、ボトル、またはチューブに提供されてもよい。一部の実施形態では、キットは１つ以上の言語、例えば２つ以上の言語による説明書を含む。

【０５８０】

一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載のエレメントの１つ以上を利用するプロセスにおいて使用される１つ以上の試薬を含む。試薬は、任意の好適な容器中で提供することができる。例えば、キットは、１つ以上の反応または貯蔵緩衝液を提供し得る。試薬は、特定のアッセイにおいて使用可能な形態で、または使用前に１つ以上の他の成分の添加を要求する形態（例えば、濃縮物または凍結乾燥形態）で提供することができる。緩衝液は、任意の緩衝液、例として、限定されるものではないが、炭酸ナトリウム緩衝液、重炭酸ナトリウム緩衝液、ホウ酸緩衝液、Ｔｒｉｓ緩衝液、ＭＯＰＳ緩衝液、ＨＥＰＥＳ緩衝液、およびそれらの組合せであり得る。一部の実施形態において、緩衝液はアルカリ性である。一部の実施形態において、緩衝液は、約７から約１０のｐＨを有する。一部の実施形態において、キットは、ガイド配列および調節エレメントを作動可能に結合させるためのベクター中への挿入のためのガイド配列に対応する１つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、キットは、相同組換えテンプレートポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載されるベクターの１つ以上および／またはポリヌクレオチドの１つ以上を含む。キットは、有利には本発明のシステムの全てのエレメントを提供することが可能である。

【０５８１】

ＣＲＩＳＰＲ複合体

一態様において、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上のエレメントを使用する方法を提供する。本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的ポリヌクレオチドを改変する有効な手段を提供する。本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、広範な有用性、例として、非常に多数の細胞タイプ中の標的ポリヌクレオチドの改変（例えば、欠失、挿入、転座、不活性化、活性化）を有する。したがって、本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、例えば、遺伝子療法、薬物スクリーニング、疾患診断、および予後における幅広い用途範囲を有する。例示的ＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む。ガイド配列は、次いでｔｒａｃｔ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列に結合している。

【０５８２】

一実施形態において、本発明は、標的ポリヌクレオチドを開裂する方法を提供する。本方法は、標的ポリヌクレオチドに結合して前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせるＣＲＩＳＰＲ複合体を使用して標的ポリヌクレオチドを改変することを含む。典型的には

、本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、細胞に導入されると、ゲノム配列に切断（例えば、一本鎖または二本鎖切断）を作り出す。例えば、本方法を用いて細胞中の疾患遺伝子を開裂させることができる。

【０５８３】

ＣＲＩＳＰＲ複合体によって作り出された切断は、エラープローン非相同末端結合（ＮＨＥＪ）経路または高フィデリティ相同性組換え修復（ＨＤＲ）（図２９）などの修復プロセスによって修復され得る。これらの修復プロセスの間、ゲノム配列に外来性ポリヌクレオチドテンプレートを導入することができる。一部の方法では、ＨＤＲプロセスを用いてゲノム配列が改変される。例えば、上流配列および下流配列が隣接するインテグレートしようとする配列を含む外来性ポリヌクレオチドテンプレートが細胞に導入される。上流および下流配列は、染色体におけるインテグレーション部位の両側と配列類似性を共有する。

【０５８４】

望ましい場合、ドナーポリヌクレオチドは、ＤＮＡ、例えばＤＮＡプラスミド、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、ウイルスベクター、線状ＤＮＡ片、ＰＣＲ断片、ネイキッド核酸、またはリポソームまたはポロキサマーなどの送達ビヒクルと複合体化した核酸であってもよい。

【０５８５】

外来性ポリヌクレオチドテンプレートは、インテグレートされる配列（例えば変異遺伝子）を含む。インテグレートする配列は、細胞にとって内因性または外来性の配列であってもよい。インテグレートされる配列の例としては、タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたは非コードＲＮＡ（例えばマイクロＲＮＡ）が挙げられる。従って、インテグレートする配列は、１つまたは複数の適切な制御配列に作動可能に結合され得る。あるいは、インテグレートされる配列が調節機能を提供し得る。

【０５８６】

外来性ポリヌクレオチドテンプレート中の上流および下流配列は、目的の染色体配列とドナーポリヌクレオチドとの間の組換えを促進するように選択される。上流配列は、標的インテグレーション部位の上流のゲノム配列と配列類似性を共有する核酸配列である。同様に、下流配列は、標的インテグレーション部位の下流の染色体配列と配列類似性を共有する核酸配列である。外来性ポリヌクレオチドテンプレート中の上流および下流配列は、標的ゲノム配列と７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％の配列同一性を有し得る。好ましくは、外来性ポリヌクレオチドテンプレート中の上流および下流配列は、標的ゲノム配列と約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する。一部の方法では、外来性ポリヌクレオチドテンプレート中の上流および下流配列は、標的ゲノム配列と約９９％または１００％の配列同一性を有する。

【０５８７】

上流または下流配列は、約２０ｂｐ～約２５００ｂｐ、例えば、約５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、または２５００ｂｐを含み得る。一部の方法では、例示的上流または下流配列は、約２００ｂｐ～約２０００ｂｐ、約６００ｂｐ～約１０００ｂｐ、またはより詳細には約７００ｂｐ～約１０００ｂｐを有する。

【０５８８】

一部の方法では、外来性ポリヌクレオチドテンプレートはマーカーをさらに含み得る。かかるマーカーは標的インテグレーションのスクリーニングを容易にし得る。好適なマーカーの例としては、制限部位、蛍光タンパク質、または選択可能なマーカーが挙げられる。本発明の外来性ポリヌクレオチドテンプレートは組換え技術を用いて構築することができる（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００１およびＡｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６を参照）。

【０５８９】

外来性ポリヌクレオチドテンプレートをインテグレートすることにより標的ポリヌクレオチドを改変する例示的方法においては、ＣＲＩＳＰＲ複合体によってゲノム配列に二本鎖切断が導入され、その切断が、外来性ポリヌクレオチドテンプレートによる相同組換えでテンプレートがゲノムにインテグレートされることにより修復される。二本鎖切断の存在がテンプレートのインテグレーションを促進する。

【０５９０】

他の実施形態では、この発明は、真核細胞におけるポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。本方法は、そのポリヌクレオチドに結合するＣＲＩＳＰＲ複合体を使用して標的ポリヌクレオチドの発現を増加または低下させることを含む。

【０５９１】

一部の方法では、細胞における発現の改変を達成するため標的ポリヌクレオチドを不活性化させることができる。例えば、細胞中の標的配列にＣＲＩＳＰＲ複合体が結合すると、配列が転写されないか、コードされたタンパク質が産生されないか、または野生型配列が機能するとおりには配列が機能しないように、標的ポリヌクレオチドが不活性化される。例えば、タンパク質が産生されないようにタンパク質またはマイクロＲＮＡコード配列が不活性化されてもよい。

【０５９２】

一部の方法では、それ以上制御配列として機能しないように制御配列を不活性化することができる。本明細書で使用されるとき、「制御配列」は、核酸配列の転写、翻訳、または接触可能性を実現する任意の核酸配列を指す。制御配列の例としては、プロモーター、転写ターミネーターが挙げられ、およびエンハンサーが制御配列である。

【０５９３】

不活性化された標的配列は、欠失突然変異（すなわち、１つ以上のヌクレオチドの欠失）、挿入突然変異（すなわち、１つ以上のヌクレオチドの挿入）、またはナンセンス突然変異（すなわち、終止コドンが導入されるような単一のヌクレオチドによる別のヌクレオチドとの置換）を含み得る。一部の方法では、標的配列の不活性化は標的配列の「ノックアウト」をもたらす。

【０５９４】

疾患モデル

本発明の方法を用いて、疾患モデルとして使用し得る植物、動物または細胞を作り出すことができる。本明細書で使用されるとき、「疾患」は、対象における疾患、障害、または徴候を指す。例えば、本発明の方法を用いて、疾患に関連する１つ以上の核酸配列に改変を含む動物もしくは細胞、または疾患に関連する１つ以上の核酸配列の発現が変化している植物、動物もしくは細胞を作り出すことができる。かかる核酸配列は疾患関連タンパク質配列をコードしてもよく、または疾患関連制御配列であってもよい。従って、本発明の実施形態において植物、対象、患者、生物または細胞は、非ヒトの対象、患者、生物または細胞であり得ることが理解される。従って、本発明は、本方法により作製された植物、動物もしくは細胞、またはその子孫を提供する。子孫は、作製された植物または動物のクローンであってもよく、またはさらに望ましい形質をその子孫に遺伝子移入させるため同じ種の他の個体と交配させることによる有性生殖から生じてもよい。細胞は、多細胞生物、特に動物または植物の場合にインビボまたはエキソビボであってよい。細胞が培養下にある例では、適切な培養条件が満たされる場合、かつ好ましくは細胞がこの目的に好適に適合する場合（例えば幹細胞）、細胞系が樹立され得る。本発明により生成される細菌性細胞系もまた想定される。ひいては細胞系もまた想定される。

【０５９５】

一部の方法では、疾患モデルを使用することにより、疾患の研究で一般的に用いられる手段を用いて突然変異が動物または細胞および疾患の発症および／または進行に及ぼす効果を研究することができる。あるいは、かかる疾患モデルは、薬学的に活性な化合物が疾患に及ぼす効果の研究に有用である。

【０５９６】

一部の方法では、疾患モデルを使用して、見込みのある遺伝子治療戦略の有効性を評価することができる。すなわち、疾患の発症および／または進行が阻害または軽減されるように疾患関連遺伝子またはポリヌクレオチドを改変することができる。詳細には、本方法は、変化したタンパク質が産生され、結果として動物または細胞が変化した反応を有するように疾患関連遺伝子またはポリヌクレオチドを改変することを含む。従って、一部の方法では、遺伝子治療イベントの効果を評価し得るように、遺伝子改変を受けた動物が、疾患を発症する素因のある動物と比較され得る。

【０５９７】

別の実施形態において、本発明は、疾患遺伝子に関連する細胞シグナル伝達イベントを調節する生物学的に活性な薬剤を開発する方法を提供する。本方法は、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ｔｒａｃｒメイト配列に結合したガイド配列、およびｔｒａｃｒ配列の１つ以上の発現をドライブする１つ以上のベクターを含む細胞に試験化合物を接触させるステップ；および例えば細胞に含まれる疾患遺伝子の突然変異に関連する細胞シグナル伝達イベントの減少または増加を示す読み取り値の変化を検出することを含む。

【０５９８】

細胞機能の変化をスクリーニングするため本発明の方法と組み合わせて、本明細書に記載のオルガノイドまたは細胞集合を含む細胞モデルまたは動物モデルを構築することができる。かかるモデルを使用して、本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体により改変されたゲノム配列が目的の細胞機能に及ぼす効果を研究し得る。例えば、細胞機能モデルを使用して、改変ゲノム配列が細胞内シグナル伝達または細胞外シグナル伝達に及ぼす効果を研究することができる。あるいは、細胞機能モデルを使用して、改変ゲノム配列が感覚認知に及ぼす効果を研究することができる。一部のかかるモデルにおいては、モデルにおける生化学的シグナル伝達経路に関連する１つ以上のゲノム配列が改変される。

【０５９９】

いくつかの疾患モデルが特に研究されている。それらには、デノボ自閉症リスク遺伝子ＣＨＤ８、ＫＡＴＮＡＬ２、およびＳＣＮ２Ａ；ならびに症候性自閉症（アンジェルマン症候群）遺伝子ＵＢＥ３Ａが含まれる。これらの遺伝子および得られる自閉症モデルは当然ながら好ましいが、遺伝子および対応するモデル全体にわたる本発明の広範な適用性を明らかにすることに役立つ。

【０６００】

生化学的シグナル伝達経路に関連する１つ以上のゲノム配列の発現の変化は、候補薬剤に接触させたときの試験モデル細胞と対照細胞との間における対応する遺伝子のｍＲＮＡレベルの差をアッセイすることにより決定され得る。あるいは、生化学的シグナル伝達経路に関連する配列の発現の差は、コードされたポリペプチドまたは遺伝子産物のレベルの差を検出することにより決定される。

【０６０１】

ｍＲＮＡ転写物または対応するポリヌクレオチドのレベルの薬剤により引き起こされた変化をアッセイするため、初めに試料中に含まれる核酸が当該技術分野の標準方法に従い抽出される。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）に示される手順に従い種々の溶菌酵素または化学溶液を使用してｍＲＮＡを単離することができ、または製造者により提供される付属の説明書に従い核酸結合樹脂で抽出することができる。抽出した核酸試料に含まれるｍＲＮＡは、次に当該技術分野において広く知られている方法に従うかまたは本明細書に例示する方法に基づき、増幅手順または従来のハイブリダイゼーションアッセイ（例えばノーザンブロット解析）により検出される。

【０６０２】

本発明の目的上、増幅は、妥当なフィデリティで標的配列を複製する能力を有するプライマーおよびポリメラーゼを用いる任意の方法を意味する。増幅は、天然または組換えＤＮＡポリメラーゼ、例えば、ＴａｑＧｏｌｄ（商標）、Ｔ７　ＤＮＡポリメラーゼ、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＤＮＡポリメラーゼのクレノウ断片、および逆転写酵素によって行われ得る。好ましい増幅方法はＰＣＲである。詳細には、単離されたＲＮＡが、生化学的シ

グナル伝達経路に関連する配列の発現レベルを定量化するため定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）と組み合わされた逆転写アッセイに供され得る。

【０６０３】

遺伝子発現レベルの検出は、増幅アッセイ中にリアルタイムで行うことができる。一態様では、増幅産物が、蛍光ＤＮＡ結合剤、例えば限定はされないがＤＮＡインターカレート剤およびＤＮＡ溝結合剤で直接可視化され得る。二本鎖ＤＮＡ分子に組み込まれるインターカレート剤の量は、典型的には増幅されたＤＮＡ産物の量に比例するため、好都合には、当該技術分野における従来の光学的システムを使用してインターカレート色素の蛍光を定量化することにより、増幅産物の量を決定することができる。この適用に好適なＤＮＡ結合色素としては、ＳＹＢＲグリーン、ＳＹＢＲブルー、ＤＡＰＩ、プロピジウムヨウ素、Ｈｏｅｓｔｅ、ＳＹＢＲゴールド、臭化エチジウム、アクリジン、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリフラビン、蛍光クマリン（ｆｌｕｏｒｃｏｕｍａｎｉｎ）、エリプチシン、ダウノマイシン、クロロキン、ジスタマイシンＤ、クロモマイシン、ホミジウム、ミトラマイシン、ルテニウムポリピリジル、アントラマイシンなどが挙げられる。

【０６０４】

別の態様では、配列特異的プローブなどの他の蛍光標識を増幅反応に用いて増幅産物の検出および定量化を促進し得る。プローブベースの定量的増幅は、所望の増幅産物の配列特異的検出に頼る。この増幅は、特異性および感度の増加をもたらす蛍光性の標的特異的プローブ（例えば、ＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブ）を利用する。プローブベースの定量的増幅を実施する方法は当該技術分野で十分に確立されており、米国特許第５，２１０，０１５号明細書に教示される。

【０６０５】

さらに別の態様では、生化学的シグナル伝達経路に関連する配列と配列相同性を共有するハイブリダイゼーションプローブを使用して従来のハイブリダイゼーションアッセイを実施し得る。典型的には、プローブは、被験対象から得られた生体試料内に含まれる生化学的シグナル伝達経路に関連する配列と安定した複合体をハイブリダイゼーション反応で形成することが可能である。アンチセンスがプローブ核酸として使用される場合、試料中に提供される標的ポリヌクレオチドがアンチセンス核酸の配列と相補的であるように選択されることは、当業者に理解されるであろう。逆に、ヌクレオチドプローブがセンス核酸である場合、標的ポリヌクレオチドはセンス核酸の配列と相補的であるように選択される。

【０６０６】

ハイブリダイゼーションは、種々のストリンジェンシーの条件下で実施することができる。本発明の実施に好適なハイブリダイゼーション条件は、プローブと生化学的シグナル伝達経路に関連する配列との間の認識相互作用が十分に特異的であるとともに十分に安定しているものである。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーが増加する条件は当該技術分野で広く知られており、発表されている。例えば、（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，（１９８９）；Ｎｏｎｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ Ｉｎ Ｓｉｔｕ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ Ｍａｎｕａｌ，Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ，ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ）を参照のこと。ハイブリダイゼーションアッセイは、限定はされないが、ニトロセルロース、ガラス、ケイ素、および種々の遺伝子アレイを含めた任意の固体支持体上に固定化されたプローブを使用して形成され得る。好ましいハイブリダイゼーションアッセイは、米国特許第５，４４５，９３４号明細書に記載されるとおりの高密度遺伝子チップで実施される。

【０６０７】

ハイブリダイゼーションアッセイ中に形成されるプローブ－標的複合体を好都合に検出するため、ヌクレオチドプローブが検出可能標識にコンジュゲートされる。本発明における使用に好適な検出可能標識には、光化学的、生化学的、分光学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段で検出可能な任意の組成物が含まれる。幅広い種類の適切な検出可能標識が当該技術分野において公知であり、それには、蛍光または化学発光標識、放

射性同位元素標識、酵素または他のリガンドが含まれる。好ましい実施形態では、ジゴキシゲニン、β－ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼ、アビジン／ビオチン複合体など、蛍光標識または酵素タグを用いることが所望されるものと思われる。

【０６０８】

ハイブリダイゼーション強度の検出または定量化に用いられる検出方法は、典型的には上記で選択される標識に依存することになる。例えば、放射標識は、写真フィルムまたはホスフォイメージャー（ｐｈｏｓｐｈｏｉｍａｇｅｒ）を使用して検出し得る。蛍光マーカーは、放出される光を検出するため光検出器を使用して検出および定量化し得る。酵素標識は、典型的には酵素に基質を提供し、基質に対する酵素の作用によって産生された反応産物を計測することにより検出される；および最後に、比色標識は、単純に、着色した標識を可視化することにより検出される。

【０６０９】

薬剤により引き起こされる、生化学的シグナル伝達経路に関連する配列の発現の変化はまた、対応する遺伝子産物を調べることによっても決定し得る。タンパク質レベルの決定には、典型的には、ａ）生体試料中に含まれるタンパク質を、生化学的シグナル伝達経路に関連するタンパク質に特異的に結合する薬剤と接触させること；および（ｂ）そのようにして形成された任意の薬剤：タンパク質複合体を同定することが関わる。この実施形態の一態様において、生化学的シグナル伝達経路に関連するタンパク質に特異的に結合する薬剤は、抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。

【０６１０】

反応は、薬剤と生化学的シグナル伝達経路に関連するタンパク質との間で複合体が形成されることを可能にする条件下で、被験試料から得られた生化学的シグナル伝達経路に関連するタンパク質の試料に薬剤を接触させることにより実施される。複合体の形成は、当該技術分野の標準的手順に従い直接的または間接的に検出することができる。直接的な検出方法では、薬剤に検出可能標識が提供され、複合体から未反応薬剤が除去され得る；従って残る標識の量が、形成された複合体の量を示す。かかる方法には、ストリンジェントな洗浄条件の中にあっても薬剤に結合したまま留まる標識を選択することが好ましい。標識は結合反応を妨げないことが好ましい。代替として、間接的な検出手順では、化学的に、あるいは酵素的に導入された標識を含む薬剤を使用し得る。望ましい標識は、概して得られる薬剤：ポリペプチド複合体の結合または安定性を妨げない。しかしながら、標識は典型的には、有効な結合、ひいては検出可能なシグナルの生成のため抗体に接触可能であるように設計される。

【０６１１】

タンパク質レベルの検出に好適な幅広い種類の標識が当該技術分野において公知である。非限定的な例としては、放射性同位元素、酵素、コロイド金属、蛍光化合物、生物発光化合物、および化学発光化合物が挙げられる。

【０６１２】

結合反応中に形成された薬剤：ポリペプチド複合体の量は、標準的な定量アッセイにより定量化することができる。上記に説明したとおり、薬剤：ポリペプチド複合体の形成は、結合部位に残る標識の量によって直接計測することができる。代替例では、生化学的シグナル伝達経路に関連するタンパク質が、特定の薬剤上の結合部位に関して標識類似体と競合するその能力に関して試験される。この競合アッセイでは、捕捉される標識の量は、被験試料中に存在する生化学的シグナル伝達経路に関連するタンパク質配列の量に反比例する。

【０６１３】

上記に概説した一般的原理に基づく多くのタンパク質分析技術は、当該技術分野において利用可能である。これには、限定はされないが、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合イムノラジオメトリックアッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、インサイチューイムノアッセイ（例えば、コロイド金、酵素

または放射性同位元素標識を使用する）、ウエスタンブロット分析、免疫沈降アッセイ、免疫蛍光アッセイ、およびＳＤＳ－ＰＡＧＥが含まれる。

【０６１４】

前述のタンパク質分析の実施には、生化学的シグナル伝達経路に関連するタンパク質を特異的に認識しまたは結合する抗体が好ましい。望ましい場合、特定のタイプの翻訳後改変（例えば、生化学的シグナル伝達経路誘導性改変）を認識する抗体を使用することができる。翻訳後改変としては、限定はされないが、グリコシル化、脂質化、アセチル化、およびリン酸化が挙げられる。これらの抗体は、商業的な供給業者から購入してもよい。例えば、チロシンリン酸化タンパク質を特異的に認識する抗ホスホチロシン抗体が、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎおよびＰｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒを含む多くの供給業者から入手可能である。抗ホスホチロシン抗体は、ＥＲストレスに応答してそのチロシン残基で別様にリン酸化されるタンパク質の検出において特に有用である。かかるタンパク質としては、限定はされないが、真核生物翻訳開始因子２α（ｅＩＦ－２α）が挙げられる。あるいは、これらの抗体は、従来のポリクローナルまたはモノクローナル抗体技術を用いて、所望の翻訳後改変を呈する標的タンパク質で宿主動物または抗体産生細胞を免疫することにより作成し得る。

【０６１５】

主題の方法を実施するにおいて、異なる体組織、異なる細胞型、および／または異なる細胞内構造における生化学的シグナル伝達経路に関連するタンパク質の発現パターンを識別することが望ましいこともある。こうした試験は、特定の組織、細胞型、または細胞内構造で優先的に発現するタンパク質マーカーと結合する能力を有する組織特異的、細胞特異的または細胞内構造特異抗体を使用して実施することができる。

【０６１６】

生化学的シグナル伝達経路に関連する遺伝子の発現の変化はまた、対照細胞と比べた遺伝子産物の活性の変化を調べることにより決定し得る。薬剤により引き起こされる、生化学的シグナル伝達経路に関連するタンパク質の活性の変化に関するアッセイは、調べている生物学的活性および／またはシグナル伝達経路に依存し得る。例えば、タンパク質がキナーゼである場合、下流の１つまたは複数の基質をリン酸化するその能力の変化を当該技術分野において公知の種々のアッセイにより決定することができる。代表的なアッセイとしては、限定はされないが、リン酸化タンパク質を認識する抗ホスホチロシン抗体などの抗体による免疫ブロットおよび免疫沈降が挙げられる。加えて、キナーゼ活性は、ＡｌｐｈａＳｃｒｅｅｎ（商標）（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒから入手可能）およびｅＴａｇ（商標）アッセイ（Ｃｈａｎ－Ｈｕｉ，ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１１１：１６２－１７４）などのハイスループット化学発光アッセイにより検出することができる。

【０６１７】

生化学的シグナル伝達経路に関連するタンパク質が細胞内ｐＨ条件の変動をもたらすシグナル伝達カスケードの一部である場合、蛍光ｐＨ色素などのｐＨ感受性分子をレポーター分子として使用することができる。生化学的シグナル伝達経路に関連するタンパク質がイオンチャネルである別の例では、膜電位および／または細胞内イオン濃度の変動をモニタすることができる。多くの市販キットおよびハイスループット装置が、イオンチャネルの調節因子に関する迅速かつロバストなスクリーニングに特に適している。代表的な機器としては、ＦＬＩＰＲ（商標）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｉｎｃ．）およびＶＩＰＲ（Ａｕｒｏｒａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）が挙げられる。これらの機器は、マイクロプレートの１０００個を超えるサンプルウェルで同時に反応を検出し、かつ１秒またはさらには１ミリ秒以内にリアルタイムの計測値および機能データを提供する能力を有する。

【０６１８】

本明細書に開示される任意の方法の実施においては、限定なしに、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、ソノポレーション、微粒子銃、リン酸カルシウム媒介

性形質移入、カチオン性形質移入、リポソーム形質移入、デンドリマー形質移入、熱ショック形質移入、ヌクレオフェクション形質移入、マグネトフェクション、リポフェクション、インペイルフェクション（ｉｍｐａｌｅｆｅｃｔｉｏｎ）、光学的形質移入、有標の薬剤により増強される核酸取り込み、およびリポソーム、免疫リポソーム、ビロソーム、または人工ビリオンを介した送達を含めた当該技術分野で公知の１つ以上の方法によって細胞または胚に好適なベクターを導入することができる。一部の方法では、ベクターはマイクロインジェクションにより胚に導入される。１つまたは複数のベクターが胚の核または細胞質に微量注入され得る。一部の方法では、１つまたは複数のベクターはヌクレオフェクションにより細胞に導入され得る。

【０６１９】

ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチドは、真核細胞に対して内因性または外因性である任意のポリヌクレオチドであり得る。例えば、標的ポリヌクレオチドは、真核細胞の核中に残留するポリヌクレオチドであり得る。標的ポリヌクレオチドは、遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードする配列または非コード配列（例えば、調節ポリヌクレオチドまたはジャンクＤＮＡ）であり得る。

【０６２０】

標的ポリヌクレオチドの例としては、生化学的シグナル伝達経路に関連する配列、例えば、生化学的シグナル伝達経路関連遺伝子またはポリヌクレオチドが挙げられる。標的ポリヌクレオチドの例としては、疾患関連遺伝子またはポリヌクレオチドが挙げられる。「疾患関連」遺伝子またはポリヌクレオチドとは、罹患組織に由来する細胞において非疾患対照の組織または細胞と比較して異常なレベルでまたは異常な形態で転写または翻訳産物を産生している任意の遺伝子またはポリヌクレオチドを指す。それは異常に高いレベルで発現するようになる遺伝子であってもよく；異常に低いレベルで発現するようになる遺伝子であってもよく、ここで発現の変化は疾患の発生および／または進行と相関する。疾患関連遺伝子はまた、疾患の原因に直接関与するかまたはそれに関与する１つまたは複数の遺伝子との連鎖不平衡がある１つまたは複数の突然変異または遺伝的変異を有する遺伝子も指す。転写または翻訳された産物は既知であってもまたは未知であってもよく、および正常レベルであってもまたは異常レベルであってもよい。

【０６２１】

ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチドは、真核細胞にとって内因性または外来性の任意のポリヌクレオチドであり得る。例えば、標的ポリヌクレオチドは、真核細胞の核に存在するポリヌクレオチドであり得る。標的ポリヌクレオチドは、遺伝子産物（例えばタンパク質）をコードする配列または非コード配列（例えば調節ポリヌクレオチドまたはジャンクＤＮＡ）であり得る。理論により拘束されるものではないが、標的配列がＰＡＭ（プロトスペーサー隣接モチーフ）；すなわち、ＣＲＩＳＰＲ複合体により認識される短い配列と会合するはずであることが考えられる。ＰＡＭについての正確な配列および長さの条件は、使用されるＣＲＩＳＰＲ酵素に応じて異なるが、ＰＡＭは、典型的には、プロトスペーサー（すなわち、標的配列）に隣接する２～５塩基対配列である。ＰＡＭ配列の例を以下の実施例セクションに挙げ、当業者は、所与のＣＲＩＳＰＲ酵素について使用されるさらなるＰＡＭ配列を同定することができる。

【０６２２】

ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチドとしては、それぞれＢｒｏａｄ参照番号ＢＩ－２０１１／００８／ＷＳＧＲ整理番号４４０６３－７０１．１０１およびＢＩ－２０１１／００８／ＷＳＧＲ整理番号４４０６３－７０１．１０２を有する米国仮特許出願第６１／７３６，５２７号明細書および同第６１／７４８，４２７号明細書（両方とも、標題ＳＹＳＴＥＭＳ ＭＥＴＨＯＤＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＦＯＲ ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＯＮ、それぞれ２０１２年１２月１２日および２０１３年１月２日に出願、これらの全ての内容は参照により全体として本明細書に組み込まれる）に列記の多数の疾患関連遺伝子およびポリヌクレオチドならびにシグナリング生化学経路関連遺伝子およびポリヌクレオチドを挙げることができる。

【０６２３】
標的ポリヌクレオチドの例としては、シグナリング生化学経路に関連する配列、例えば、シグナリング生化学経路関連遺伝子またはポリヌクレオチドが挙げられる。標的ポリヌクレオチドの例としては、疾患関連遺伝子またはポリヌクレオチドが挙げられる。「疾患関連」遺伝子またはポリヌクレオチドは、非疾患対照の組織または細胞と比較して患部組織に由来する細胞中で異常なレベルにおいてまたは異常な形態で転写または翻訳産物を生じさせている任意の遺伝子またはポリヌクレオチドを指す。これは、異常に高いレベルにおいて発現されるようになる遺伝子であり得；これは、異常に低いレベルにおいて発現されるようになる遺伝子であり得、発現の変化は、疾患の発生および／または進行と相関する。疾患関連遺伝子は、疾患の病因を直接担い、または疾患の病因を担う遺伝子と連鎖不平衡をなす突然変異または遺伝子変異を有する遺伝子も指す。転写または翻訳される産物は、既知または未知のものであり得、正常または異常レベルにおけるものであり得る。
【０６２４】
疾患関連遺伝子およびポリヌクレオチドの例を表ＡおよびＢに列記する。疾患特異的情報は、ＭｃＫｕｓｉｃｋ－Ｎａｔｈａｎｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ（Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．）およびＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．）から入手可能であり、ワールドワイドウェブから入手可能である。シグナリング生化学経路関連遺伝子およびポリヌクレオチドの例を表Ｃに列記する。
【０６２５】
これらの遺伝子および経路中の突然変異は、不適切なタンパク質の産生または機能に影響する不適切な量のタンパク質をもたらし得る。遺伝子、疾患およびタンパク質のさらなる例は、２０１２年１２月１２日に出願された米国仮特許出願第６１／７３６，５２７号明細書から参照により本明細書に組み込まれる。このような遺伝子、タンパク質および経路は、ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチドであり得る。
【０６２６】

【表１２】

表A

疾患/障害	遺伝子
新形成	PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4;
	Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF;
	HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR アルファ; PPAR
	ガンマ; WT1 (ウィルムス腫瘍); FGF 受容体ファミリー
	メンバー(5 つメンバー: 1、2、3、4、5); CDKN2a; APC; RB
	(網膜芽細胞腫); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR
	(アンドロゲン受容体); TSG101; IGF; IGF 受容体; Igf1 (4
	つのバリアント); Igf2 (3 つのバリアント); Igf 1 受容体; Igf 2 受容体;
	Bax; Bcl2;カスパーゼファミリー(9 つのメンバー:
	1、2、3、4、6、7、8、9、12); Kras; Apc
加齢黄斑変性症	Abcr; Ccl2; Cc2; cp (セルロプラスミン); Timp3; カテプシン D;
	Vldlr; Ccr2
統合失調症	ニューレグリン 1 (Nrg1); Erb4 (ニューレグリンについての受容体);
	コンプレキシン 1 (Cplx1); Tph1 トリプトファンヒドロキシラーゼ; Tph2
	トリプトファンヒドロキシラーゼ 2; ニューレキシン 1; GSK3; GSK3a;
	GSK3b
障害	5-HTT (Slc6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA;
	DTNBP1; Dao (Dao1)
トリヌクレオチドリピート	HTT (ハンチントン病 Dx); SBMA/SMAX1/AR (ケネディ病
障害	Dx); FXN/X25 (フリードライヒ運動失調症); ATX3 (マシャド・ジョセフ病
	Dx); ATXN1 および ATXN2 (脊髄小脳失調症
	); DMPK (筋強直性ジストロフィー); アトロフィン-1 および Atn1

【０６２７】

【表１３】

	(DRPLA Dx); CBP (Creb-BP - 球状不安定性); VLDLR
	(アルツハイマー病); Atxn7; Atxn10
脆弱性 X 症候群	FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5
セクレターゼ関連	APH-1 (アルファおよびベータ);プレセニリン(Psen1);ニカストリン
障害	(Ncstn); PEN-2
その他	Nos1; Parp1; Nat1; Nat2
プリオン関連障害	Prp
ALS	SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a;
	VEGF-b; VEGF-c)
薬物嗜好	Prkce (アルコール); Drd2; Drd4; ABAT (アルコール); GRIA2;
	Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1 (アルコール)
自閉症	Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A;ニューレキシン 1;脆弱性 X
	(FMR2 (AFF2); FXR1; FXR2; Mglur5)
アルツハイマー病	E1; CHIP; UCH; UBB; Tau; LRP; PICALM;クラステリン; PS1;
	SORL1; CR1; Vldlr; Uba1; Uba3; CHIP28 (Aqp1,
	アクアポリン 1); Uchl1; Uchl3; APP
炎症	IL-10; IL-1 (IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17 (IL-17a (CTLA8); IL-
	17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); II-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa;
	IBD についての NOD2/CARD15; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b);
	CTLA4; Cx3cl1
パーキンソン病	x-シヌクレイン; DJ-1; LRRK2;パーキン; PINK1

【０６２８】
【表１４】

表 B:

血液および凝固疾患および障害	貧血(CDAN1、CDA1、RPS19、DBA、PKLR、PK1、NT5C3、UMPH1、PSN1、RHAG、RH50A、NRAMP2、SPTB、ALAS2、ANH1、ASB、ABCB7、ABC7、ASAT);不全リンパ球症候群(TAPBP、TPSN、TAP2、ABCB3、PSF2、RING11、MHC2TA、C2TA、RFX5、RFXAP、RFX5),出血性疾患(TBXA2R、P2RX1、P2X1);H 因子および H 因子様 1(HF1、CFH、HUS);V 因子および VIII 因子(MCFD2);VII 因子欠損症(F7);X 因子欠損症(F10);XI 因子欠損症(F11);XII 因子欠損症(F12、HAF);XIIIA 因子欠損症(F13A1、F13A); XIIIB 因子欠損症(F13B);ファンコニ貧血(FANCA、FACA、FA1、FA、FAA、FAAP95、FAAP90、FLJ34064、FANCB、FANCC、FACC、BRCA2、FANCD1、FANCD2、FANCD、FACD、FAD、FANCE、FACE、FANCF、XRCC9、FANCG、BRIP1、BACH1、FANCJ、PHF9、FANCL、FANCM、KIAA1596);血球貪食性リンパ組織球増多障害(PRF1、HPLH2、UNC13D、MUNC13-4、HPLH3、HLH3、FHL3); 血友病 A (F8、F8C、HEMA);血友病 B (F9、HEMB),出血性障害(PI、ATT、F5); 白血球欠損および障害(ITGB2、CD18、LCAMB、LAD、EIF2B1、EIF2BA、EIF2B2、EIF2B3、EIF2B5、LVWM、CACH、CLE、EIF2B4);鎌状赤血球貧血(HBB); サラセミア(HBA2、HBB、HBD、LCRB、HBA1).

【０６２９】

【表１５】

細胞機能障害および癌疾患および障害	B 細胞非ホジキンリンパ腫(BCL7A、BCL7);白血球(TAL1、TCL5、SCL、TAL2、FLT3、NBS1、NBS、ZNFN1A1、IK1、LYF1、HOXD4、HOX4B、BCR、CML、PHL、ALL、ARNT、KRAS2、RASK2、GMPS、AF10、ARHGEF12、LARG、KIAA0382、CALM、CLTH、CEBPA、CEBP、CHIC2、BTL、FLT3、KIT、PBT、LPP、NPM1、NUP214、D9S46E、CAN、CAIN、RUNX1、CBFA2、AML1、WHSC1L1、NSD3、FLT3、AF1Q、NPM1、NUMA1、ZNF145、PLZF、PML、MYL、STAT5B、AF10、CALM、CLTH、ARL11、ARLTS1、P2RX7、P2X7、BCR、CML、PHL、ALL、GRAF、NF1、VRNF、WSS、NFNS、PTPN11、PTP2C、SHP2、NS1、BCL2、CCND1、PRAD1、BCL1、TCRA、GATA1、GF1、ERYF1、NFE1、ABL1、NQO1、DIA4、NMOR1、NUP214、D9S46E、CAN、CAIN).
炎症および免疫関連疾患および障害	AIDS (KIR3DL1、NKAT3、NKB1、AMB11、KIR3DS1、IFNG、CXCL12、SDF1);自己免疫リンパ球増殖性症候群(TNFRSF6、APT1、FAS、CD95、ALPS1A);複合型免疫不全症、(IL2RG、SCIDX1、SCIDX、IMD4); HIV-1 (CCL5、SCYA5、D17S136E、TCP228)、HIV感受性または感染 (IL10、CSIF、CMKBR2、CCR2、CMKBR5、CCCKR5 (CCR5));免疫不全症(CD3E、CD3G、AICDA、AID、HIGM2、TNFRSF5、CD40、UNG、DGU、HIGM4、TNFSF5、CD40LG、HIGM1、IGM、FOXP3、IPEX、AIID、XPID、PIDX、TNFRSF14B、TACI);炎症(IL-10、IL-1 (IL-1a、IL-1b)、IL-13、IL-17 (IL-17a (CTLA8)、IL-17b、IL-17c、IL-17d、IL-17f)、II-23、Cx3cr1、ptpn22、TNFa、IBD について NOD2/CARD15、IL-6、IL-12 (IL-12a、IL-12b)、CTLA4、Cx3cl1);重症複合型免疫不全症(SCID)(JAK3、JAKL、DCLRE1C、ARTEMIS、SCIDA、RAG1、RAG2、ADA、PTPRC、CD45、LCA、IL7R、CD3D、T3D、IL2RG、SCIDX1、SCIDX、IMD4).
代謝、肝臓、腎臓およびタンパク質疾患および障害	アミロイドニューロパシー(TTR、PALB);アミロイドーシス(APOA1、APP、AAA、CVAP、AD1、GSN、FGA、LYZ、TTR、PALB); 肝硬変(KRT18、KRT8、CIRH1A、NAIC、TEX292、KIAA1988);嚢胞性線維症(CFTR、ABCC7、CF、MRP7);グリコーゲン蓄積症 (SLC2A2、GLUT2、G6PC、G6PT、G6PT1、GAA、LAMP2、LAMPB、 AGL、GDE、GBE1、GYS2、PYGL、PFKM);肝細胞腺腫、142330 (TCF1、HNF1A、MODY3)、肝不全、早期発症および神経障害(SCOD1、SCO1)、肝性リパーゼ欠損症 (LIPC)、肝芽腫、癌および癌腫(CTNNB1、PDGFRL、PDGRL、PRLTS、AXIN1、AXIN、CTNNB1、TP53、P53、LFS1、IGF2R、MPRI、MET、CASP8、MCH5; 髄質嚢胞腎疾患(UMOD、HNFJ、FJHN、MCKD2、ADMCKD2); フェニルケトン尿症(PAH、PKU1、QDPR、DHPR、PTS); 多嚢胞性腎および肝疾患(FCYT、PKHD1、ARPKD、PKD1、PKD2、PKD4、PKDTS、PRKCSH、G19P1、PCLD、SEC63).

【０６３０】

【表１６】

筋/骨格疾患および障害	ベッカー型筋ジストロフィー(DMD、BMD、MYF6),デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD、BMD);エメリ・ドレヒュス型筋ジストロフィー(LMNA、LMN1、EMD2、FPLD、CMD1A、HGPS、LGMD1B、LMNA、LMN1、EMD2、FPLD、CMD1A);顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHMD1A、FSHD1A);筋ジストロフィー(FKRP、MDC1C、LGMD2I、LAMA2、LAMM、LARGE、KIAA0609、MDC1D、FCMD、TTID、MYOT、CAPN3、CANP3、DYSF、LGMD2B、SGCG、LGMD2C、DMDA1、SCG3、SGCA、ADL、DAG2、LGMD2D、DMDA2、SGCB、LGMD2E、SGCD、SGD、LGMD2F、CMD1L、TCAP、LGMD2G、CMD1N、TRIM32、HT2A、LGMD2H、FKRP、MDC1C、LGMD2I、TTN、CMD1G、TMD、LGMD2J、POMT1、CAV3、LGMD1C、SEPN1、SELN、RSMD1、PLEC1、PLTN、EBS1);大理石骨病 (LRP5、BMND1、LRP7、LR3、OPPG、VBCH2、CLCN7、CLC7、OPTA2、OSTM1、GL、TCIRG1、TIRC7、OC116、OPTB1); 筋萎縮症 (VAPB、VAPC、ALS8、SMN1、SMA1、SMA2、SMA3、SMA4、BSCL2、SPG17、GARS、SMAD1、CMT2D、HEXB、IGHMBP2、SMUBP2、CATF1、SMARD1).
神経学的および神経疾患および障害	ALS (SOD1、ALS2、STEX、FUS、TARDBP、VEGF (VEGF-a、VEGF-b、VEGF-c);アルツハイマー病(APP、AAA、CVAP、AD1、APOE、AD2、PSEN2、AD4、STM2、APBB2、FE65L1、NOS3、PLAU、URK、ACE、DCP1、ACE1、MPO、PACIP1、PAXIP1L、PTIP、A2M、BLMH、BMH、PSEN1、AD3);自閉症(Mecp2、BZRAP1、MDGA2、Sema5A、ニューレキシン 1、GLO1、MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、NLGN3、NLGN4、KIAA1260、AUTSX2);脆弱性 X 症候群(FMR2、FXR1、FXR2、mGLUR5); ハンチントン病およびハンチントン病様障害(HD、IT15、PRNP、PRIP、JPH3、JP3、HDL2、TBP、SCA17);パーキンソン病(NR4A2、NURR1、NOT、TINUR、SNCAIP、TBP、SCA17、SNCA、NACP、PARK1、PARK4、DJ1、PARK7、LRRK2、PARK8、PINK1、PARK6、UCHL1、PARK5、SNCA、NACP、PARK1、PARK4、PRKN、PARK2、PDJ、DBH、NDUFV2);レット症候群(MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、CDKL5、STK9、MECP2、RTT、PPMX、MRX16、MRX79、x-シヌクレイン、DJ-1);統合失調症(ニューレグリン 1 (Nrg1)、Erb4 (ニューレグリンについての受容体)、コンプレキシン 1 (Cplx1)、Tph1 トリプトファンヒドロキシラーゼ、Tph2、トリプトファンヒドロキシラーゼ 2、ニューレキシン 1、GSK3、GSK3a、GSK3b、5-HTT (Slc6a4)、COMT、DRD (Drd1a)、SLC6A3、DAOA、DTNBP1、Dao (Dao1));セクレターゼ関連障害 (APH-1 (アルファおよびベータ)、プレセニリン(Psen1)、ニカストリン、(Ncstn)、PEN-2、Nos1、Parp1、Nat1、Nat2);トリヌクレオチドリピート障害(HTT (ハンチントン病 Dx)、SBMA/SMAX1/AR (ケネディ病 Dx)、FXN/X25 (フリードライヒ運動失調症)、ATX3 (マシャド-ジョセフ病 Dx)、ATXN1 および ATXN2 (脊髄小脳失調症)、DMPK (筋強直性ジストロフィー)、アトロフィン-1 および Atn1 (DRPLA Dx)、CBP (Creb-BP - 球状不安定性)、VLDLR (アルツハイマー病)、Atxn7、Atxn10).

【０６３１】

【表１７】

眼疾患および障害	加齢黄斑変性症(Abcr、Ccl2、Cc2、cp (セルロプラスミン)、Timp3、カテプシン D、Vldlr、Ccr2);白内障(CRYAA、CRYA1、CRYBB2、CRYB2、PITX3、BFSP2、CP49、CP47、CRYAA、CRYA1、PAX6、AN2、MGDA、 CRYBA1、CRYB1、CRYGC、CRYG3、CCL、LIM2、MP19、CRYGD、CRYG4、BFSP2、CP49、CP47、HSF4、CTM、HSF4、CTM、MIP、AQP0、CRYAB、CRYA2、CTPP2、CRYBB1、CRYGD、CRYG4、CRYBB2、CRYB2、CRYGC、CRYG3、CCL、CRYAA、CRYA1、GJA8、CX50、CAE1、GJA3、CX46、CZP3、CAE3、CCM1、CAM、KRIT1);角膜混濁およびジストロフィー(APOA1、TGFBI、CSD2、CDGG1、CSD、BIGH3、CDG2、TACSTD2、TROP2、M1S1、VSX1、RINX、PPCD、PPD、KTCN、COL8A2、FECD、PPCD2、PIP5K3、CFD);先天性遺伝性扁平角膜(KERA、CNA2); 緑内障(MYOC、TIGR、GLC1A、JOAG、GPOA、OPTN、GLC1E、FIP2、HYPL、NRP、CYP1B1、GLC3A、OPA1、NTG、NPG、CYP1B1、GLC3A);レーバー先天性黒内障(CRB1、RP12、CRX、CORD2、CRD、RPGRIP1、LCA6、CORD9、RPE65、RP20、AIPL1、LCA4、GUCY2D、GUC2D、LCA1、CORD6、RDH12、LCA3);黄斑ジストロフィー(ELOVL4、ADMD、STGD2、STGD3、RDS、RP7、PRPH2、PRPH、AVMD、AOFMD、VMD2).

【０６３２】

【表１８】

表C:

細胞機能	遺伝子
PI3K/AKTシグナリング	PRKCE; ITGAM; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2;
	PTEN; EIF4E; PRKCZ; GRK6; MAPK1; TSC1; PLK1;
	AKT2; IKBKB; PIK3CA; CDK8; CDKN1B; NFKB2; BCL2;
	PIK3CB; PPP2R1A; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC2;
	ITGA1; KRAS; EIF4EBP1; RELA; PRKCD; NOS3;
	PRKAA1; MAPK9; CDK2; PPP2CA; PIM1; ITGB7;
	YWHAZ; ILK; TP53; RAF1; IKBKG; RELB; DYRK1A;
	CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1;
	CHUK; PDPK1; PPP2R5C; CTNNB1; MAP2K1; NFKB1;
	PAK3; ITGB3; CCND1; GSK3A; FRAP1; SFN; ITGA2;
	TTK; CSNK1A1; BRAF; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK;
	HSP90AA1; RPS6KB1
ERK/MAPKシグナリング	PRKCE; ITGAM; ITGA5; HSPB1; IRAK1; PRKAA2;
	EIF2AK2; RAC1; RAP1A; TLN1; EIF4E; ELK1; GRK6;
	MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; CREB1;
	PRKCI; PTK2; FOS; RPS6KA4; PIK3CB; PPP2R1A;
	PIK3C3; MAPK8; MAPK3; ITGA1; ETS1; KRAS; MYCN;
	EIF4EBP1; PPARG; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC;
	CDK2; PPP2CA; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; YWHAZ;
	PPP1CC; KSR1; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1;
	MAP2K2; PAK4; PIK3R1; STAT3; PPP2R5C; MAP2K1;
	PAK3; ITGB3; ESR1; ITGA2; MYC; TTK; CSNK1A1;
	CRKL; BRAF; ATF4; PRKCA; SRF; STAT1; SGK
グルココルチコイド受容体	RAC1; TAF4B; EP300; SMAD2; TRAF6; PCAF; ELK1;
シグナリング	MAPK1; SMAD3; AKT2; IKBKB; NCOR2; UBE2I;
	PIK3CA; CREB1; FOS; HSPA5; NFKB2; BCL2;
	MAP3K14; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1;
	MAPK3; TSC22D3; MAPK10; NRIP1; KRAS; MAPK13;
	RELA; STAT5A; MAPK9; NOS2A; PBX1; NR3C1;

【０６３３】

【表１９】

	PIK3C2A; CDKN1C; TRAF2; SERPINE1; NCOA3;
	MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; MAP3K7; CREBBP;
	CDKN1A; MAP2K2; JAK1; IL8; NCOA2; AKT1; JAK2;
	PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1;
	ESR1; SMAD4; CEBPB; JUN; AR; AKT3; CCL2; MMP1;
	STAT1; IL6; HSP90AA1
軸索ガイダンス シグナリング	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; ADAM12;
	IGF1; RAC1; RAP1A; EIF4E; PRKCZ; NRP1; NTRK2;
	ARHGEF7; SMO; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2;
	PTPN11; GNAS; AKT2; PIK3CA; ERBB2; PRKCI; PTK2;
	CFL1; GNAQ; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; WNT11;
	PRKD1; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA;
	PRKCD; PIK3C2A; ITGB7; GLI2; PXN; VASP; RAF1;
	FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; ADAM17; AKT1; PIK3R1;
	GLI1; WNT5A; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3;
	CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; CRKL; RND1; GSK3B;
	AKT3; PRKCA
エフリン受容体 シグナリング	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; IRAK1;
	PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAP1A; GRK6; ROCK2;
	MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; PLK1; AKT2;
	DOK1; CDK8; CREB1; PTK2; CFL1; GNAQ; MAP3K14;
	CXCL12; MAPK8; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1;
	KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2;
	PIM1; ITGB7; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1;
	MAP2K2; PAK4; AKT1; JAK2; STAT3; ADAM10;
	MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2;
	EPHA8; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; PTPN13; ATF4;
	AKT3; SGK
アクチン細胞骨格	ACTN4; PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; IRAK1;
シグナリング	PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; INS; ARHGEF7; GRK6;
	ROCK2; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8;
	PTK2; CFL1; PIK3CB; MYH9; DIAPH1; PIK3C3; MAPK8;
	F2R; MAPK3; SLC9A1; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD;
	PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; ITGB7;
	PPP1CC; PXN; VIL2; RAF1; GSN; DYRK1A; ITGB1;
	MAP2K2; PAK4; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3;
	ITGB3; CDC42; APC; ITGA2; TTK; CSNK1A1; CRKL;
	BRAF; VAV3; SGK
ハンチントン病	PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1; PRKCZ; HDAC4; TGM2;
シグナリング	MAPK1; CAPNS1; AKT2; EGFR; NCOR2; SP1; CAPN2;
	PIK3CA; HDAC5; CREB1; PRKCI; HSPA5; REST;
	GNAQ; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; PRKD1;

【０６３４】

【表２０】

	GNB2L1; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; HDAC2;
	HDAC7A; PRKCD; HDAC11; MAPK9; HDAC9; PIK3C2A;
	HDAC3; TP53; CASP9; CREBBP; AKT1; PIK3R1;
	PDPK1; CASP1; APAF1; FRAP1; CASP2; JUN; BAX;
	ATF4; AKT3; PRKCA; CLTC; SGK; HDAC6; CASP3
アポトーシスシグナリング	PRKCE; ROCK1; BID; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; BAK1;
	BIRC4; GRK6; MAPK1; CAPNS1; PLK1; AKT2; IKBKB;
	CAPN2; CDK8; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8;
	BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; KRAS; RELA;
	PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; TP53; TNF;
	RAF1; IKBKG; RELB; CASP9; DYRK1A; MAP2K2;
	CHUK; APAF1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; LMNA; CASP2;
	BIRC2; TTK; CSNK1A1; BRAF; BAX; PRKCA; SGK;
	CASP3; BIRC3; PARP1
B細胞受容体 シグナリング	RAC1; PTEN; LYN; ELK1; MAPK1; RAC2; PTPN11;
	AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; SYK; NFKB2; CAMK2A;
	MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; ABL1;
	MAPK3; ETS1; KRAS; MAPK13; RELA; PTPN6; MAPK9;
	EGR1; PIK3C2A; BTK; MAPK14; RAF1; IKBKG; RELB;
	MAP3K7; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; MAP2K1;
	NFKB1; CDC42; GSK3A; FRAP1; BCL6; BCL10; JUN;
	GSK3B; ATF4; AKT3; VAV3; RPS6KB1
白血球の血管外遊出	ACTN4; CD44; PRKCE; ITGAM; ROCK1; CXCR4; CYBA;
シグナリング	RAC1; RAP1A; PRKCZ; ROCK2; RAC2; PTPN11;
	MMP14; PIK3CA; PRKCI; PTK2; PIK3CB; CXCL12;
	PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ABL1; MAPK10; CYBB;
	MAPK13; RHOA; PRKCD; MAPK9; SRC; PIK3C2A; BTK;
	MAPK14; NOX1; PXN; VIL2; VASP; ITGB1; MAP2K2;
	CTNND1; PIK3R1; CTNNB1; CLDN1; CDC42; F11R; ITK;
	CRKL; VAV3; CTTN; PRKCA; MMP1; MMP9
インテグリンシグナリング	ACTN4; ITGAM; ROCK1; ITGA5; RAC1; PTEN; RAP1A;
	TLN1; ARHGEF7; MAPK1; RAC2; CAPNS1; AKT2;
	CAPN2; PIK3CA; PTK2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
	CAV1; CAPN1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA;
	SRC; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; ILK; PXN; VASP;
	RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1;
	TNK2; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; RND3; ITGA2;
	CRKL; BRAF; GSK3B; AKT3
急性期反応	IRAK1; SOD2; MYD88; TRAF6; ELK1; MAPK1; PTPN11;
シグナリング	AKT2; IKBKB; PIK3CA; FOS; NFKB2; MAP3K14;
	PIK3CB; MAPK8; RIPK1; MAPK3; IL6ST; KRAS;
	MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; FTL; NR3C1;
	TRAF2; SERPINE1; MAPK14; TNF; RAF1; PDK1;

【０６３５】

【表２１】

	IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1;
	CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; FRAP1; CEBPB; JUN;
	AKT3; IL1R1; IL6
PTENシグナリング	ITGAM; ITGA5; RAC1; PTEN; PRKCZ; BCL2L11;
	MAPK1; RAC2; AKT2; EGFR; IKBKB; CBL; PIK3CA;
	CDKN1B; PTK2; NFKB2; BCL2; PIK3CB; BCL2L1;
	MAPK3; ITGA1; KRAS; ITGB7; ILK; PDGFRB; INSR;
	RAF1; IKBKG; CASP9; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2;
	AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; PDPK1; MAP2K1;
	NFKB1; ITGB3; CDC42; CCND1; GSK3A; ITGA2;
	GSK3B; AKT3; FOXO1; CASP3; RPS6KB1
p53シグナリング	PTEN; EP300; BBC3; PCAF; FASN; BRCA1; GADD45A;
	BIRC5; AKT2; PIK3CA; CHEK1; TP53INP1; BCL2;
	PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; THBS1; ATR; BCL2L1; E2F1;
	PMAIP1; CHEK2; TNFRSF10B; TP73; RB1; HDAC9;
	CDK2; PIK3C2A; MAPK14; TP53; LRDD; CDKN1A;
	HIPK2; AKT1; PIK3R1; RRM2B; APAF1; CTNNB1;
	SIRT1; CCND1; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; JUN;
	SNAI2; GSK3B; BAX; AKT3
アリール炭化水素受容体	HSPB1; EP300; FASN; TGM2; RXRA; MAPK1; NQO1;
シグナリング	NCOR2; SP1; ARNT; CDKN1B; FOS; CHEK1;
	SMARCA4; NFKB2; MAPK8; ALDH1A1; ATR; E2F1;
	MAPK3; NRIP1; CHEK2; RELA; TP73; GSTP1; RB1;
	SRC; CDK2; AHR; NFE2L2; NCOA3; TP53; TNF;
	CDKN1A; NCOA2; APAF1; NFKB1; CCND1; ATM; ESR1;
	CDKN2A; MYC; JUN; ESR2; BAX; IL6; CYP1B1;
	HSP90AA1
生体異物代謝	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; MAPK1; NQO1;
シグナリング	NCOR2; PIK3CA; ARNT; PRKCI; NFKB2; CAMK2A;
	PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; PRKD1;
	ALDH1A1; MAPK3; NRIP1; KRAS; MAPK13; PRKCD;
	GSTP1; MAPK9; NOS2A; ABCB1; AHR; PPP2CA; FTL;
	NFE2L2; PIK3C2A; PPARGC1A; MAPK14; TNF; RAF1;
	CREBBP; MAP2K2; PIK3R1; PPP2R5C; MAP2K1;
	NFKB1; KEAP1; PRKCA; EIF2AK3; IL6; CYP1B1;
	HSP90AA1
SAPK/JNKシグナリング	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; ELK1;
	GRK6; MAPK1; GADD45A; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA;
	FADD; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1;
	GNB2L1; IRS1; MAPK3; MAPK10; DAXX; KRAS;
	PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A;
	TRAF2; TP53; LCK; MAP3K7; DYRK1A; MAP2K2;
	PIK3R1; MAP2K1; PAK3; CDC42; JUN; TTK; CSNK1A1;

【０６３６】

【表２２】

	CRKL; BRAF; SGK
PPAr/RXRシグナリング	PRKAA2; EP300; INS; SMAD2; TRAF6; PPARA; FASN;
	RXRA; MAPK1; SMAD3; GNAS; IKBKB; NCOR2;
	ABCA1; GNAQ; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK8;
	IRS1; MAPK3; KRAS; RELA; PRKAA1; PPARGC1A;
	NCOA3; MAPK14; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7;
	CREBBP; MAP2K2; JAK2; CHUK; MAP2K1; NFKB1;
	TGFBR1; SMAD4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6; HSP90AA1;
	ADIPOQ
NF-KBシグナリング	IRAK1; EIF2AK2; EP300; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6;
	TBK1; AKT2; EGFR; IKBKB; PIK3CA; BTRC; NFKB2;
	MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; HDAC2;
	KRAS; RELA; PIK3C2A; TRAF2; TLR4; PDGFRB; TNF;
	INSR; LCK; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; AKT1;
	PIK3R1; CHUK; PDGFRA; NFKB1; TLR2; BCL10;
	GSK3B; AKT3; TNFAIP3; IL1R1
ニューレグリンシグナリング	ERBB4; PRKCE; ITGAM; ITGA5; PTEN; PRKCZ; ELK1;
	MAPK1; PTPN11; AKT2; EGFR; ERBB2; PRKCI;
	CDKN1B; STAT5B; PRKD1; MAPK3; ITGA1; KRAS;
	PRKCD; STAT5A; SRC; ITGB7; RAF1; ITGB1; MAP2K2;
	ADAM17; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; ITGB3;
	EREG; FRAP1; PSEN1; ITGA2; MYC; NRG1; CRKL;
	AKT3; PRKCA; HSP90AA1; RPS6KB1
Wntおよびベータカテニン	CD44; EP300; LRP6; DVL3; CSNK1E; GJA1; SMO;
シグナリング	AKT2; PIN1; CDH1; BTRC; GNAQ; MARK2; PPP2R1A;
	WNT11; SRC; DKK1; PPP2CA; SOX6; SFRP2; ILK;
	LEF1; SOX9; TP53; MAP3K7; CREBBP; TCF7L2; AKT1;
	PPP2R5C; WNT5A; LRP5; CTNNB1; TGFBR1; CCND1;
	GSK3A; DVL1; APC; CDKN2A; MYC; CSNK1A1; GSK3B;
	AKT3; SOX2
インスリン受容体 シグナリング	PTEN; INS; EIF4E; PTPN1; PRKCZ; MAPK1; TSC1;
	PTPN11; AKT2; CBL; PIK3CA; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3;
	MAPK8; IRS1; MAPK3; TSC2; KRAS; EIF4EBP1;
	SLC2A4; PIK3C2A; PPP1CC; INSR; RAF1; FYN;
	MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1;
	GSK3A; FRAP1; CRKL; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK;
	RPS6KB1
IL-6シグナリング	HSPB1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; MAPK1; PTPN11;
	IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK3;
	MAPK10; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1;
	MAPK9; ABCB1; TRAF2; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG;
	RELB; MAP3K7; MAP2K2; IL8; JAK2; CHUK; STAT3;
	MAP2K1; NFKB1; CEBPB; JUN; IL1R1; SRF; IL6

【０６３７】

【表２３】

肝臓胆汁鬱滞	PRKCE; IRAK1; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; PPARA;
	RXRA; IKBKB; PRKCI; NFKB2; MAP3K14; MAPK8;
	PRKD1; MAPK10; RELA; PRKCD; MAPK9; ABCB1;
	TRAF2; TLR4; TNF; INSR; IKBKG; RELB; MAP3K7; IL8;
	CHUK; NR1H2; TJP2; NFKB1; ESR1; SREBF1; FGFR4;
	JUN; IL1R1; PRKCA; IL6
IGF-1シグナリング	IGF1; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; NEDD4; AKT2;
	PIK3CA; PRKCI; PTK2; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
	IGF1R; IRS1; MAPK3; IGFBP7; KRAS; PIK3C2A;
	YWHAZ; PXN; RAF1; CASP9; MAP2K2; AKT1; PIK3R1;
	PDPK1; MAP2K1; IGFBP2; SFN; JUN; CYR61; AKT3;
	FOXO1; SRF; CTGF; RPS6KB1
NRF2媒介酸化的	PRKCE; EP300; SOD2; PRKCZ; MAPK1; SQSTM1;
ストレス応答	NQO1; PIK3CA; PRKCI; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
	PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; GSTP1; MAPK9; FTL;
	NFE2L2; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; MAP3K7; CREBBP;
	MAP2K2; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PPIB; JUN; KEAP1;
	GSK3B; ATF4; PRKCA; EIF2AK3; HSP90AA1
肝線維症/肝星細胞	EDN1; IGF1; KDR; FLT1; SMAD2; FGFR1; MET; PGF;
活性化	SMAD3; EGFR; FAS; CSF1; NFKB2; BCL2; MYH9;
	IGF1R; IL6R; RELA; TLR4; PDGFRB; TNF; RELB; IL8;
	PDGFRA; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; VEGFA; BAX;
	IL1R1; CCL2; HGF; MMP1; STAT1; IL6; CTGF; MMP9
PPARシグナリング	EP300; INS; TRAF6; PPARA; RXRA; MAPK1; IKBKB;
	NCOR2; FOS; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK3;
	NRIP1; KRAS; PPARG; RELA; STAT5A; TRAF2;
	PPARGC1A; PDGFRB; TNF; INSR; RAF1; IKBKG;
	RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; CHUK; PDGFRA;
	MAP2K1; NFKB1; JUN; IL1R1; HSP90AA1
FcイプシロンRIシグナリング	PRKCE; RAC1; PRKCZ; LYN; MAPK1; RAC2; PTPN11;
	AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
	PRKD1; MAPK3; MAPK10; KRAS; MAPK13; PRKCD;
	MAPK9; PIK3C2A; BTK; MAPK14; TNF; RAF1; FYN;
	MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; AKT3;
	VAV3; PRKCA
Gタンパク質共役受容体	PRKCE; RAP1A; RGS16; MAPK1; GNAS; AKT2; IKBKB;
シグナリング	PIK3CA; CREB1; GNAQ; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB;
	PIK3C3; MAPK3; KRAS; RELA; SRC; PIK3C2A; RAF1;
	IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK;
	PDPK1; STAT3; MAP2K1; NFKB1; BRAF; ATF4; AKT3;
	PRKCA
イノシトールリン酸	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; GRK6;
代謝	MAPK1; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PIK3CB; PIK3C3;

【０６３８】

【表２４】

	MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2;
	PIM1; PIK3C2A; DYRK1A; MAP2K2; PIP5K1A; PIK3R1;
	MAP2K1; PAK3; ATM; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK
PDGFシグナリング	EIF2AK2; ELK1; ABL2; MAPK1; PIK3CA; FOS; PIK3CB;
	PIK3C3; MAPK8; CAV1; ABL1; MAPK3; KRAS; SRC;
	PIK3C2A; PDGFRB; RAF1; MAP2K2; JAK1; JAK2;
	PIK3R1; PDGFRA; STAT3; SPHK1; MAP2K1; MYC;
	JUN; CRKL; PRKCA; SRF; STAT1; SPHK2
VEGFシグナリング	ACTN4; ROCK1; KDR; FLT1; ROCK2; MAPK1; PGF;
	AKT2; PIK3CA; ARNT; PTK2; BCL2; PIK3CB; PIK3C3;
	BCL2L1; MAPK3; KRAS; HIF1A; NOS3; PIK3C2A; PXN;
	RAF1; MAP2K2; ELAVL1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; SFN;
	VEGFA; AKT3; FOXO1; PRKCA
ナチュラルキラー細胞シグナリング	PRKCE; RAC1; PRKCZ; MAPK1; RAC2; PTPN11;
	KIR2DL3; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB;
	PIK3C3; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PTPN6;
	PIK3C2A; LCK; RAF1; FYN; MAP2K2; PAK4; AKT1;
	PIK3R1; MAP2K1; PAK3; AKT3; VAV3; PRKCA
細胞周期: G1/S	HDAC4; SMAD3; SUV39H1; HDAC5; CDKN1B; BTRC;
チェックポイント調節	ATR; ABL1; E2F1; HDAC2; HDAC7A; RB1; HDAC11;
	HDAC9; CDK2; E2F2; HDAC3; TP53; CDKN1A; CCND1;
	E2F4; ATM; RBL2; SMAD4; CDKN2A; MYC; NRG1;
	GSK3B; RBL1; HDAC6
T細胞受容体シグナリング	RAC1; ELK1; MAPK1; IKBKB; CBL; PIK3CA; FOS;
	NFKB2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS;
	RELA; PIK3C2A; BTK; LCK; RAF1; IKBKG; RELB; FYN;
	MAP2K2; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; ITK; BCL10;
	JUN; VAV3
デス受容体シグナリング	CRADD; HSPB1; BID; BIRC4; TBK1; IKBKB; FADD;
	FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; RIPK1; CASP8;
	DAXX; TNFRSF10B; RELA; TRAF2; TNF; IKBKG; RELB;
	CASP9; CHUK; APAF1; NFKB1; CASP2; BIRC2; CASP3;
	BIRC3
FGFシグナリング	RAC1; FGFR1; MET; MAPKAPK2; MAPK1; PTPN11;
	AKT2; PIK3CA; CREB1; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
	MAPK3; MAPK13; PTPN6; PIK3C2A; MAPK14; RAF1;
	AKT1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FGFR4; CRKL; ATF4;
	AKT3; PRKCA; HGF
GM-CSFシグナリング	LYN; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CAMK2A;
	STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; GNB2L1; BCL2L1; MAPK3;
	ETS1; KRAS; RUNX1; PIM1; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2;
	AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; CCND1; AKT3;

【０６３９】

【表２５】

	STAT1
筋萎縮性側索硬化症	BID; IGF1; RAC1; BIRC4; PGF; CAPNS1; CAPN2;
シグナリング	PIK3CA; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; CAPN1;
	PIK3C2A; TP53; CASP9; PIK3R1; RAB5A; CASP1;
	APAF1; VEGFA; BIRC2; BAX; AKT3; CASP3; BIRC3
JAK/Statシグナリング	PTPN1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; STAT5B;
	PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A;
	PTPN6; PIK3C2A; RAF1; CDKN1A; MAP2K2; JAK1;
	AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FRAP1; AKT3;
	STAT1
ニコチン酸および ニコチンアミド	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; GRK6; MAPK1;
代謝	PLK1; AKT2; CDK8; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1;
	PBEF1; MAPK9; CDK2; PIM1; DYRK1A; MAP2K2;
	MAP2K1; PAK3; NT5E; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK
ケモカインシグナリング	CXCR4; ROCK2; MAPK1; PTK2; FOS; CFL1; GNAQ;
	CAMK2A; CXCL12; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK13;
	RHOA; CCR3; SRC; PPP1CC; MAPK14; NOX1; RAF1;
	MAP2K2; MAP2K1; JUN; CCL2; PRKCA
IL-2シグナリング	ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; FOS;
	STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS;
	SOCS1; STAT5A; PIK3C2A; LCK; RAF1; MAP2K2;
	JAK1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; JUN; AKT3
シナプス長期	PRKCE; IGF1; PRKCZ; PRDX6; LYN; MAPK1; GNAS;
抑圧	PRKCI; GNAQ; PPP2R1A; IGF1R; PRKD1; MAPK3;
	KRAS; GRN; PRKCD; NOS3; NOS2A; PPP2CA;
	YWHAZ; RAF1; MAP2K2; PPP2R5C; MAP2K1; PRKCA
エストロゲン受容体	TAF4B; EP300; CARM1; PCAF; MAPK1; NCOR2;
シグナリング	SMARCA4; MAPK3; NRIP1; KRAS; SRC; NR3C1;
	HDAC3; PPARGC1A; RBM9; NCOA3; RAF1; CREBBP;
	MAP2K2; NCOA2; MAP2K1; PRKDC; ESR1; ESR2
タンパク質ユビキチン化	TRAF6; SMURF1; BIRC4; BRCA1; UCHL1; NEDD4;
経路	CBL; UBE2I; BTRC; HSPA5; USP7; USP10; FBXW7;
	USP9X; STUB1; USP22; B2M; BIRC2; PARK2; USP8;
	USP1; VHL; HSP90AA1; BIRC3
IL-10シグナリング	TRAF6; CCR1; ELK1; IKBKB; SP1; FOS; NFKB2;
	MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; MAPK14; TNF;
	IKBKG; RELB; MAP3K7; JAK1; CHUK; STAT3; NFKB1;
	JUN; IL1R1; IL6
VDR/RXR活性化	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; GADD45A; HES1;
	NCOR2; SP1; PRKCI; CDKN1B; PRKD1; PRKCD;
	RUNX2; KLF4; YY1; NCOA3; CDKN1A; NCOA2; SPP1;
	LRP5; CEBPB; FOXO1; PRKCA
TGF-ベータシグナリング	EP300; SMAD2; SMURF1; MAPK1; SMAD3; SMAD1;

【０６４０】

【表２６】

	FOS; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK9; RUNX2;
	SERPINE1; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2;
	MAP2K1; TGFBR1; SMAD4; JUN; SMAD5
Toll様受容体シグナリング	IRAK1; EIF2AK2; MYD88; TRAF6; PPARA; ELK1;
	IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13;
	RELA; TLR4; MAPK14; IKBKG; RELB; MAP3K7; CHUK;
	NFKB1; TLR2; JUN
p38 MAPKシグナリング	HSPB1; IRAK1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; FADD; FAS;
	CREB1; DDIT3; RPS6KA4; DAXX; MAPK13; TRAF2;
	MAPK14; TNF; MAP3K7; TGFBR1; MYC; ATF4; IL1R1;
	SRF; STAT1
ニューロトロフィン/TRKシグナリング	NTRK2; MAPK1; PTPN11; PIK3CA; CREB1; FOS;
	PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; PIK3C2A;
	RAF1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1;
	CDC42; JUN; ATF4
FXR/RXR活性化	INS; PPARA; FASN; RXRA; AKT2; SDC1; MAPK8;
	APOB; MAPK10; PPARG; MTTP; MAPK9; PPARGC1A;
	TNF; CREBBP; AKT1; SREBF1; FGFR4; AKT3; FOXO1
シナプス長期	PRKCE; RAP1A; EP300; PRKCZ; MAPK1; CREB1;
増強	PRKCI; GNAQ; CAMK2A; PRKD1; MAPK3; KRAS;
	PRKCD; PPP1CC; RAF1; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1;
	ATF4; PRKCA
カルシウムシグナリング	RAP1A; EP300; HDAC4; MAPK1; HDAC5; CREB1;
	CAMK2A; MYH9; MAPK3; HDAC2; HDAC7A; HDAC11;
	HDAC9; HDAC3; CREBBP; CALR; CAMKK2; ATF4;
	HDAC6
EGF シグナリング	ELK1; MAPK1; EGFR; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3;
	MAPK8; MAPK3; PIK3C2A; RAF1; JAK1; PIK3R1;
	STAT3; MAP2K1; JUN; PRKCA; SRF; STAT1
心血管系中の低酸素症	EDN1; PTEN; EP300; NQO1; UBE2I; CREB1; ARNT;
シグナリング	HIF1A; SLC2A4; NOS3; TP53; LDHA; AKT1; ATM;
	VEGFA; JUN; ATF4; VHL; HSP90AA1
RXR機能のLPS/IL-1媒介阻害	IRAK1; MYD88; TRAF6; PPARA; RXRA; ABCA1;
	MAPK8; ALDH1A1; GSTP1; MAPK9; ABCB1; TRAF2;
	TLR4; TNF; MAP3K7; NR1H2; SREBF1; JUN; IL1R1
LXR/RXR活性化	FASN; RXRA; NCOR2; ABCA1; NFKB2; IRF3; RELA;
	NOS2A; TLR4; TNF; RELB; LDLR; NR1H2; NFKB1;
	SREBF1; IL1R1; CCL2; IL6; MMP9
アミロイドプロセシング	PRKCE; CSNK1E; MAPK1; CAPNS1; AKT2; CAPN2;
	CAPN1; MAPK3; MAPK13; MAPT; MAPK14; AKT1;
	PSEN1; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; APP
IL-4シグナリング	AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; IRS1; KRAS; SOCS1;

【０６４１】

【表２７】

	PTPN6; NR3C1; PIK3C2A; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1;
	FRAP1; AKT3; RPS6KB1
細胞周期: G2/M DNA	EP300; PCAF; BRCA1; GADD45A; PLK1; BTRC;
損傷チェックポイント	CHEK1; ATR; CHEK2; YWHAZ; TP53; CDKN1A;
調節	PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A
心血管系中の	KDR; FLT1; PGF; AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3;
一酸化窒素シグナリング	CAV1; PRKCD; NOS3; PIK3C2A; AKT1; PIK3R1;
	VEGFA; AKT3; HSP90AA1
プリン代謝	NME2; SMARCA4; MYH9; RRM2; ADAR; EIF2AK4;
	PKM2; ENTPD1; RAD51; RRM2B; TJP2; RAD51C;
	NT5E; POLD1; NME1
cAMP媒介シグナリング	RAP1A; MAPK1; GNAS; CREB1; CAMK2A; MAPK3;
	SRC; RAF1; MAP2K2; STAT3; MAP2K1; BRAF; ATF4
ミトコンドリア機能障害	SOD2; MAPK8; CASP8; MAPK10; MAPK9; CASP9;
	PARK7; PSEN1; PARK2; APP; CASP3
Notchシグナリング	HES1; JAG1; NUMB; NOTCH4; ADAM17; NOTCH2;
	PSEN1; NOTCH3; NOTCH1; DLL4
小胞体	HSPA5; MAPK8; XBP1; TRAF2; ATF6; CASP9; ATF4;
ストレス経路	EIF2AK3; CASP3
ピリミジン代謝	NME2; AICDA; RRM2; EIF2AK4; ENTPD1; RRM2B;
	NT5E; POLD1; NME1
パーキンソン病シグナリング	UCHL1; MAPK8; MAPK13; MAPK14; CASP9; PARK7;
	PARK2; CASP3
心臓およびベータアドレナリン作動性	GNAS; GNAQ; PPP2R1A; GNB2L1; PPP2CA; PPP1CC;
シグナリング	PPP2R5C
解糖/糖新生	HK2; GCK; GPI; ALDH1A1; PKM2; LDHA; HK1
インターフェロンシグナリング	IRF1; SOCS1; JAK1; JAK2; IFITM1; STAT1; IFIT3
ソニックヘッジホッグシグナリング	ARRB2; SMO; GLI2; DYRK1A; GLI1; GSK3B; DYRK1B
グリセロリン脂質	PLD1; GRN; GPAM; YWHAZ; SPHK1; SPHK2
代謝	
リン脂質分解	PRDX6; PLD1; GRN; YWHAZ; SPHK1; SPHK2
トリプトファン代謝	SIAH2; PRMT5; NEDD4; ALDH1A1; CYP1B1; SIAH1
リジン分解	SUV39H1; EHMT2; NSD1; SETD7; PPP2R5C
ヌクレオチド除去修復	ERCC5; ERCC4; XPA; XPC; ERCC1
経路	
デンプンおよびスクロース	UCHL1; HK2; GCK; GPI; HK1
代謝	

【０６４２】

【表２８】

アミノ糖代謝	NQO1; HK2; GCK; HK1
アラキドン酸	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1
代謝	
サーカディアンリズム シグナリング	CSNK1E; CREB1; ATF4; NR1D1
凝固系	BDKRB1; F2R; SERPINE1; F3
ドーパミン受容体	PPP2R1A; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C
シグナリング	
グルタチオン代謝	IDH2; GSTP1; ANPEP; IDH1
グリセロ脂質代謝	ALDH1A1; GPAM; SPHK1; SPHK2
リノール酸代謝	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1
メチオニン代謝	DNMT1; DNMT3B; AHCY; DNMT3A
ピルビン酸代謝	GLO1; ALDH1A1; PKM2; LDHA
アルギニンおよびプロリン	ALDH1A1; NOS3; NOS2A
代謝	
エイコサノイドシグナリング	PRDX6; GRN; YWHAZ
フルクトースおよび	HK2; GCK; HK1
マンノース代謝	
ガラクトース代謝	HK2; GCK; HK1
スチルベン、クマリン	PRDX6; PRDX1; TYR
およびリグニン生合成	
抗原提示	CALR; B2M
経路	
ステロイドの生合成	NQO1; DHCR7
ブタン酸代謝	ALDH1A1; NLGN1
クエン酸回路	IDH2; IDH1
脂肪酸代謝	ALDH1A1; CYP1B1
グリセロリン脂質	PRDX6; CHKA
代謝	
ヒスチジン代謝	PRMT5; ALDH1A1
イノシトール代謝	ERO1L; APEX1
シトクロムp450による	GSTP1; CYP1B1
生体異物の代謝	
メタン代謝	PRDX6; PRDX1
フェニルアラニン代謝	PRDX6; PRDX1
プロパン酸代謝	ALDH1A1; LDHA
セレノアミノ酸	PRMT5; AHCY
代謝	
スフィンゴ脂質代謝	SPHK1; SPHK2
アミノホスホン酸	PRMT5
代謝	
アンドロゲンおよびエストロゲン	PRMT5

【０６４３】

【表２９】

代謝	
アスコルビン酸および	ALDH1A1
アルダル酸代謝	
胆汁酸生合成	ALDH1A1
システイン代謝	LDHA
脂肪酸生合成	FASN
グルタミン酸受容体	GNB2L1
シグナリング	
NRF2媒介酸化的	PRDX1
ストレス応答	
ペントースリン酸	GPI
経路	
ペントースおよび	UCHL1
グルクロン酸相互変換	
レチノール代謝	ALDH1A1
リボフラビン代謝	TYR
チロシン代謝	PRMT5, TYR
ユビキチン生合成	PRMT5
バリン、ロイシンおよび	ALDH1A1
イソロイシン分解	
グリシン、セリンおよび	CHKA
トレオニン代謝	
リジン分解	ALDH1A1
疼痛/味覚	TRPM5; TRPA1
疼痛	TRPM7; TRPC5; TRPC6; TRPC1; Cnr1; cnr2; Grk2;
	Trpa1; Pomc; Cgrp; Crf; Pka; Era; Nr2b; TRPM5; Prkaca;
	Prkacb; Prkar1a; Prkar2a
ミトコンドリア機能	AIF; CytC; SMAC (Diablo); Aifm-1; Aifm-2
発生神経学	BMP-4; コーディン (Chrd); ノギン (Nog); WNT (Wnt2;
	Wnt2b; Wnt3a; Wnt4; Wnt5a; Wnt6; Wnt7b; Wnt8b;
	Wnt9a; Wnt9b; Wnt10a; Wnt10b; Wnt16); ベータ-カテニン;
	Dkk-1; Frizzled 関連タンパク質;Otx-2; Gbx2; FGF-8;
	リーリン; Dab1; unc-86 (Pou4f1またはBrn3a); Numb; Reln

【０６４４】

本発明の実施形態は、遺伝子のノックアウト、遺伝子の増幅ならびにＤＮＡリピート不安定性および神経学的疾患に関連する特定の突然変異の修復に関連する方法および組成物にも関する（Ｒｏｂｅｒｔ Ｄ．Ｗｅｌｌｓ，Ｔｅｔｓｕｏ Ａｓｈｉｚａｗａ，Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｉｎｓｔａｂｉｌｉｔｉｅｓ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｉｃａｌ Ｄｉｓｅａｓｅｓ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｃｔ １３，２０１１－Ｍｅｄｉｃａｌ）。規定の態様のタンデムリピート配列が２０を超えるヒト疾患を担うことが見出されている（Ｎｅｗ ｉｎｓｉｇｈｔｓ ｉｎｔｏ ｒｅｐｅａｔ ｉｎｓｔａｂｉｌｉｔｙ：ｒｏｌｅ ｏｆ ＲＮＡ・ＤＮＡ ｈｙｂｒｉｄｓ．Ｍｃ Ｉｖｏｒ ＥＩ，Ｐｏｌａｋ Ｕ，Ｎａｐｉｅｒａｌａ Ｍ．ＲＮＡ Ｂｉｏｌ．２０１０ Ｓｅｐ－Ｏｃｔ；７（５）：５５１－８）。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を利用してゲノム不安定性のこれらの異常を補正することができる。

【０６４５】

本発明のさらなる態様は、ラフォラ病に関連することが同定されているＥＭＰ２ＡおよびＥＭＰ２Ｂ遺伝子の異常の補正のためのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の利用に関する。ラフ

ォラ病は、青年期において癲癇性発作として始まり得る進行性ミオクローヌス癲癇を特徴とする常染色体劣性病態である。この疾患の数例は、未だ同定されていない遺伝子の突然変異により引き起こされ得る。この疾患は、発作、筋痙攣、歩行困難、認知症、および最終的に死亡を引き起こす。現在、疾患進行に対して有効であることが証明されている治療は存在しない。癲癇に関連する他の遺伝子異常を、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系によりターゲティングすることもでき、基礎となる遺伝学は、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｅｐｉｌｅｐｓｙ ａｎｄ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｐｉｌｅｐｓｉｅｓ，Ｇｉｕｌｉａｎｏ Ａｖａｎｚｉｎｉ，Ｊｅｆｆｒｅｙ Ｌ．Ｎｏｅｂｅｌｓにより編集，Ｍａｒｉａｎｉ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ Ｐａｅｄｉａｔｒｉｃ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ：２０；２００９）にさらに記載されている。

【０６４６】

Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）遺伝子を不活性化させることに関するＳａｎｇａｍｏ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願公開第２０１１０１５８９５７号明細書の方法もまた、本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に合わせて改良し得る。別の例では、両方ともにグルタミンシンテターゼ遺伝子発現遺伝子を不活性化させることに関するＳａｎｇａｍｏ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願公開第２０１００３１１１２４号明細書およびＣｅｌｌｅｃｔｉｓに譲渡された米国特許出願公開第２０１１０２２５６６４号明細書の方法もまた、本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に合わせて改良し得る。

【０６４７】

本発明のいくつかのさらなる態様は、米国国立衛生研究所のウェブサイト（ｈｅａｌｔｈ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｔｏｐｉｃ／ＧｅｎｅｔｉｃＤｉｓｏｒｄｅｒｓにおけるウェブサイト）上にトピックサブセクションＧｅｎｅｔｉｃ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓのもとでさらに記載されている広範な遺伝子疾患に関連する異常の補正に関する。遺伝子脳疾患としては、限定されるものではないが、副腎白質ジストロフィー、脳梁欠損症、アイカルディ症候群、アルパース病、アルツハイマー病、バース症候群、バッテン病、ＣＡＤＡＳＩＬ、小脳変性症、ファブリー病、ゲルストマン－ストロイスラー－シャインカー病、ハンチントン病および他のトリプレットリピート病、リー病、レッシュ－ナイハン症候群、メンケス病、ミトコンドリアミオパチーならびにＮＩＮＤＳコルポセファリーが挙げられる。これらの疾患は、米国国立衛生研究所のウェブサイト上にサブセクションＧｅｎｅｔｉｃ Ｂｒａｉｎ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓのもとでさらに記載されている。

【０６４８】

一部の実施形態において、病態は、新形成である。病態が新形成であり得る一部の実施形態において、ターゲティングすべき遺伝子は、表Ａに列記のもののいずれかであり得る（この場合、ＰＴＥＮなど）。一部の実施形態において、病態は、加齢黄斑変性症であり得る。一部の実施形態において、病態は、統合失調症であり得る。一部の実施形態において、病態は、トリヌクレオチドリピート障害であり得る。一部の実施形態において、病態は、脆弱性Ｘ症候群であり得る。一部の実施形態において、病態は、セクレターゼ関連障害であり得る。一部の実施形態において、病態は、プリオン関連障害であり得る。一部の実施形態において、病態は、ＡＬＳであり得る。一部の実施形態において、病態は、薬物嗜好であり得る。一部の実施形態において、病態は、自閉症であり得る。一部の実施形態において、病態は、アルツハイマー病であり得る。一部の実施形態において、病態は、炎症であり得る。一部の実施形態において、病態は、パーキンソン病であり得る。

【０６４９】

例えば、米国特許出願公開第２０１１００２３１４５号明細書は、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用した自閉症スペクトラム障害（ＡＳＤ）に関連する細胞、動物およびタンパク質の遺伝的改変を記載している。自閉症スペクトラム障害（ＡＳＤ）は、社会的相互作用およびコミュニケーションの質的障害、ならびに限定された反復的かつ常同的様式の行動、興味、および活動によって特徴付けられる一群の障害である。３つの障害、自閉症、アスペルガー症候群（ＡＳ）および特定不能の広汎性発達障害（ＰＤＤ－ＮＯＳ）は

、種々の程度の重症度、関連する知的機能および医学的状態を伴う一連の同じ障害である。ＡＳＤは主に遺伝的に決定される障害であり、遺伝率は約９０％である。

【０６５０】

米国特許出願公開第２０１１００２３１４５号明細書は、ＡＳＤに関連するタンパク質をコードする任意の染色体配列を編集することを含み、これは本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系に適用し得る。ＡＳＤに関連するタンパク質は、典型的にはＡＳＤに関連するタンパク質とＡＳＤの発生率または徴候との実験的関連性に基づき選択される。例えば、ＡＳＤを有する集団では、ＡＳＤを有しない集団と比べてＡＳＤに関連するタンパク質の産生速度または循環中濃度が上昇または低下し得る。タンパク質レベルの差は、限定はされないが、ウエスタンブロット、免疫組織化学染色、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、および質量分析を含むプロテオミクス技術を用いて評価し得る。あるいは、ＡＳＤに関連するタンパク質は、限定はされないが、ＤＮＡマイクロアレイ解析、遺伝子発現連鎖解析（ＳＡＧＥ）、および定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Ｑ－ＰＣＲ）を含むゲノム技術を用いて、それらのタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子発現プロファイルを得ることにより同定され得る。

【０６５１】

ＡＳＤに関連するタンパク質に関連し得る病状または障害の非限定的な例には、自閉症、アスペルガー症候群（ＡＳ）、特定不能の広汎性発達障害（ＰＤＤ－ＮＯＳ）、レット症候群、結節性硬化症、フェニルケトン尿症、スミス・レムリ・オピッツ症候群および脆弱Ｘ症候群が含まれる。非限定的な例として、ＡＳＤに関連するタンパク質には、限定はされないが以下のタンパク質が含まれる：ＡＴＰ１０Ｃ　アミノリン脂質－　ＭＥＴ　ＭＥＴ受容体　輸送ＡＴＰアーゼ　チロシンキナーゼ（ＡＴＰ１０Ｃ）　ＢＺＲＡＰ１　ＭＧＬＵＲ５（ＧＲＭ５）代謝型グルタミン酸受容体５（ＭＧＬＵＲ５）　ＣＤＨ１０　カドヘリン１０　ＭＧＬＵＲ６（ＧＲＭ６）代謝型グルタミン酸受容体６（ＭＧＬＵＲ６）　ＣＤＨ９　カドヘリン９　ＮＬＧＮ１　ニューロリジン１　ＣＮＴＮ４　コンタクチン４　ＮＬＧＮ２　ニューロリジン２　ＣＮＴＮＡＰ２　コンタクチン関連　ＳＥＭＡ５Ａ　ニューロリジン３　タンパク質様２（ＣＮＴＮＡＰ２）　ＤＨＣＲ７　７－デヒドロコレステロール　ＮＬＧＮ４Ｘ　ニューロリジン４　Ｘ－　レダクターゼ（ＤＨＣＲ７）　連鎖性　ＤＯＣ２Ａ二重Ｃ２様ドメイン－　ＮＬＧＮ４Ｙ　ニューロリジン４　Ｙ－　含有タンパク質α　連鎖性　ＤＰＰ６　ジペプチジル　ＮＬＧＮ５　ニューロリジン５　アミノペプチダーゼ様タンパク質６　ＥＮ２　エングレイルド２（ＥＮ２）　ＮＲＣＡＭ　神経細胞接着分子（ＮＲＣＡＭ）　ＭＤＧＡ２　脆弱Ｘ精神遅滞　ＮＲＸＮ１　ニューレキシン１　１（ＭＤＧＡ２）　ＦＭＲ２（ＡＦＦ２）ＡＦ４／ＦＭＲ２ファミリーメンバー２　ＯＲ４Ｍ２　嗅覚受容体　（ＡＦＦ２）　４Ｍ２　ＦＯＸＰ２　フォークヘッドボックスタンパク質Ｐ２　ＯＲ４Ｎ４　嗅覚受容体　（ＦＯＸＰ２）　４Ｎ４　ＦＸＲ１　脆弱Ｘ精神　ＯＸＴＲ　オキシトシン受容体　遅滞、常染色体性　（ＯＸＴＲ）　ホモログ１（ＦＸＲ１）　ＦＸＲ２　脆弱Ｘ精神　ＰＡＨ　フェニルアラニン　遅滞、常染色体性　水酸化酵素（ＰＡＨ）　ホモログ２（ＦＸＲ２）　ＧＡＢＲＡ１　γ－アミノ酪酸　ＰＴＥＮ　ホスファターゼおよび　受容体サブユニットα－１　テンシンホモログ　（ＧＡＢＲＡ１）　（ＰＴＥＮ）　ＧＡＢＲＡ５　ＧＡＢＡＡ（γ－アミノ酪　ＰＴＰＲＺ１　受容体型　酸）受容体α５　チロシンタンパク質　サブユニット（ＧＡＢＲＡ５）　ホスファターゼζ（ＰＴＰＲＺ１）　ＧＡＢＲＢ１　γ－アミノ酪酸　ＲＥＬＮ　リーリン　受容体サブユニットβ－１（ＧＡＢＲＢ１）　ＧＡＢＲＢ３　ＧＡＢＡＡ（γ－アミノ酪　ＲＰＬ１０　６０Ｓリボソーム　酸）受容体β３サブユニット　タンパク質Ｌ１０（ＧＡＢＲＢ３）　ＧＡＢＲＧ１　γ－アミノ酪酸　ＳＥＭＡ５Ａ　セマフォリン－５Ａ　受容体サブユニットγ－１　（ＳＥＭＡ５Ａ）　（ＧＡＢＲＧ１）　ＨＩＲＩＰ３　ＨＩＲＡ相互作用タンパク質３　ＳＥＺ６Ｌ２　発作関連６ホモログ（マウス）様２　ＨＯＸＡ１　ホメオボックスタンパク質Ｈｏｘ－Ａ１　ＳＨＡＮＫ３　ＳＨ３および複数の（ＨＯＸＡ１）アンキリンリピートドメイン３（ＳＨＡＮＫ３）　ＩＬ６　インターロイキン６　ＳＨＢＺＲＡＰ１　ＳＨ３および複数のアンキリンリピートドメイン３（ＳＨＢＺＲ

ＡＰ１）　ＬＡＭＢ１　ラミニンサブユニットβ－１　ＳＬＣ６Ａ４　セロトニン　（ＬＡＭＢ１）トランスポーター（ＳＥＲＴ）　ＭＡＰＫ３　マイトジェン活性化タンパク質　ＴＡＳ２Ｒ１　味覚受容体キナーゼ３　タイプ２　メンバー１　ＴＡＳ２Ｒ１　ＭＡＺ　Ｍｙｃ関連ジンクフィンガー　ＴＳＣ１　結節性硬化症　タンパク質　タンパク質１　ＭＤＧＡ２　ＭＡＭドメイン含有　ＴＳＣ２　結節性硬化症　グリコシルホスファチジルイノシトール　タンパク質２　アンカー２（ＭＤＧＡ２）　ＭＥＣＰ２　メチルＣｐＧ結合　ＵＢＥ３Ａ　ユビキチンタンパク質　タンパク質２（ＭＥＣＰ２）　リガーゼＥ３Ａ（ＵＢＥ３Ａ）　ＭＥＣＰ２　メチルＣｐＧ結合　ＷＮＴ２　ウィングレス型　タンパク質２（ＭＥＣＰ２）　ＭＭＴＶインテグレーション部位ファミリー、メンバー２（ＷＮＴ２）。

【０６５２】

その染色体配列が編集されるＡＳＤに関連するタンパク質のアイデンティティは異なってもよく、かつ異なることになる。好ましい実施形態において、その染色体配列が編集されるＡＳＤに関連するタンパク質は、ＢＺＲＡＰ１遺伝子によりコードされるベンゾジアゼピン（ｂｅｎｚｏｄｉａｚａｐｉｎｅ）受容体（末梢）関連タンパク質１（ＢＺＲＡＰ１）、ＡＦＦ２遺伝子（ＭＦＲ２とも称される）によりコードされるＡＦ４／ＦＭＲ２ファミリーメンバー２タンパク質（ＡＦＦ２）、ＦＸＲ１遺伝子によりコードされる脆弱Ｘ精神遅滞常染色体性ホモログ１タンパク質（ＦＸＲ１）、ＦＸＲ２遺伝子によりコードされる脆弱Ｘ精神遅滞常染色体性ホモログ２タンパク質（ＦＸＲ２）、ＭＤＧＡ２遺伝子によりコードされるＭＡＭドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー２タンパク質（ＭＤＧＡ２）、ＭＥＣＰ２遺伝子によりコードされるメチルＣｐＧ結合タンパク質２（ＭＥＣＰ２）、ＭＧＬＵＲ５－１遺伝子（ＧＲＭ５とも称される）によりコードされる代謝型グルタミン酸受容体５（ＭＧＬＵＲ５）、ＮＲＸＮ１遺伝子によりコードされるニューレキシン１タンパク質、またはＳＥＭＡ５Ａ遺伝子によりコードされるセマフォリン５Ａタンパク質（ＳＥＭＡ５Ａ）であり得る。例示的実施形態において、遺伝子改変を受ける動物はラットであり、およびＡＳＤに関連するタンパク質をコードする編集される染色体配列を以下に列挙する：ＢＺＲＡＰ１　ベンゾジアゼピン（ｂｅｎｚｏｄｉａｚａｐｉｎｅ）受容体　ＸＭ＿００２７２７７８９、（末梢）関連　ＸＭ＿２１３４２７、タンパク質１（ＢＺＲＡＰ１）　ＸＭ＿００２７２４５３３、ＸＭ＿００１０８１１２５　ＡＦＦ２（ＦＭＲ２）ＡＦ４／ＦＭＲ２ファミリーメンバー２　ＸＭ＿２１９８３２、（ＡＦＦ２）　ＸＭ＿００１０５４６７３　ＦＸＲ１　脆弱Ｘ精神　ＮＭ＿００１０１２１７９　遅滞、常染色体性ホモログ１（ＦＸＲ１）ＦＸＲ２　脆弱Ｘ精神　ＮＭ＿００１１００６４７　遅滞、常染色体性ホモログ２（ＦＸＲ２）　ＭＤＧＡ２ＭＡＭ　ドメイン含有　ＮＭ＿１９９２６９　グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー２（ＭＤＧＡ２）　ＭＥＣＰ２　メチルＣｐＧ結合　ＮＭ＿０２２６７３　タンパク質２（ＭＥＣＰ２）　ＭＧＬＵＲ５　代謝型グルタミン酸　ＮＭ＿０１７０１２　（ＧＲＭ５）　受容体５（ＭＧＬＵＲ５）　ＮＲＸＮ１　ニューレキシン１　ＮＭ＿０２１７６７　ＳＥＭＡ５Ａ　セマフォリン－５Ａ（ＳＥＭＡ５Ａ）　ＮＭ＿００１１０７６５９。

【０６５３】

例示的動物または細胞は、ＡＳＤに関連するタンパク質をコードする１、２、３、４、５、６、７、８、または９個またはそれ以上の不活性化染色体配列、およびＡＳＤに関連するタンパク質をコードする０、１、２、３、４、５、６、７、８、９個またはそれ以上の染色体にインテグレートされた配列を含み得る。編集されまたはインテグレートされる染色体配列は、変化したＡＳＤ関連タンパク質をコードするように改変され得る。ＡＳＤに関連するタンパク質における突然変異の非限定的な例としては、１８位のロイシンがグルタミンに置換されているニューレキシン１におけるＬ１８Ｑ突然変異、４５１位のアルギニンがシステインに置換されているニューロリジン３におけるＲ４５１Ｃ突然変異、８７位のアルギニンがトリプトファンに置換されているニューロリジン４におけるＲ８７Ｗ突然変異、および４２５位のイソロイシンがバリンに置換されているセロトニントランスポーターにおけるＩ４２５Ｖ突然変異が挙げられる。ＡＳＤ関連染色体配列における他の

多くの突然変異および染色体再配列がＡＳＤと関連付けられており、当該技術分野において公知である。例えば、Ｆｒｅｉｔａｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１０）Ｅｕｒ．Ｃｈｉｌｄ．Ａｄｏｌｅｓｃ．Ｐｓｙｃｈｉａｔｒｙ　１９：１６９－１７８、およびＢｕｃａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００９）ＰＬｏＳ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　５：ｅ１０００５３６（これらの開示は参照により全体として本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【０６５４】

パーキンソン病に関連するタンパク質の例としては、限定されるものではないが、α－シヌクレイン、ＤＪ－１、ＬＲＲＫ２、ＰＩＮＫ１、パーキン、ＵＣＨＬ１、シンフィリン－１、およびＮＵＲＲ１が挙げられる。

【０６５５】

嗜好関連タンパク質の例としては、例えば、ＡＢＡＴを挙げることができる。

【０６５６】

炎症関連タンパク質の例としては、例えば、Ｃｃｒ２遺伝子によりコードされる単球走化性タンパク質－１（ＭＣＰ１）、Ｃｃｒ５遺伝子によりコードされるＣ－Ｃケモカイン受容体５型（ＣＣＲ５）、Ｆｃｇｒ２ｂ遺伝子によりコードされるＩｇＧ受容体ＩＩＢ（ＦＣＧＲ２ｂ、ＣＤ３２とも称される）、またはＦｃｅｒ１ｇ遺伝子によりコードされるＦｃイプシロンＲ１ｇ（ＦＣＥＲ１ｇ）タンパク質を挙げることができる。

【０６５７】

心血管疾患関連タンパク質の例としては、例えば、ＩＬ１Ｂ（インターロイキン１、ベータ）、ＸＤＨ（キサンチンデヒドロゲナーゼ）、ＴＰ５３（腫瘍タンパク質ｐ５３）、ＰＴＧＩＳ（プロスタグランジンＩ２（プロスタサイクリン）シンターゼ）、ＭＢ（ミオグロビン）、ＩＬ４（インターロイキン４）、ＡＮＧＰＴ１（アンジオポエチン１）、ＡＢＣＧ８（ＡＴＰ結合カセット、サブファミリーＧ（ＷＨＩＴＥ）、メンバー８）、またはＣＴＳＫ（カテプシンＫ）を挙げることができる。

【０６５８】

例えば、米国特許出願公開第２０１１００２３１５３号明細書は、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用したアルツハイマー病に関連する細胞、動物およびタンパク質の遺伝子改変を記載している。一たび改変された細胞および動物は、ＡＤの試験で一般的に用いられる尺度－例えば、限定なしに、学習および記憶、不安、抑鬱、嗜癖、および感覚運動機能を使用して、標的突然変異がＡＤの発症および／または進行に及ぼす効果を研究するための公知の方法、ならびに行動的、機能的、病理学的、代謝的（ｍｅｔａｂｏｌｏｉｃ）および生化学的機能を計測するアッセイを用いてさらに試験され得る。

【０６５９】

本開示は、ＡＤに関連するタンパク質をコードする任意の染色体配列を編集することを含む。ＡＤ関連タンパク質は、典型的にはＡＤ関連タンパク質とＡＤ障害との実験的関連性に基づき選択される。例えば、ＡＤ障害を有する集団では、ＡＤ障害を有しない集団と比べてＡＤ関連タンパク質の産生速度または循環中濃度が上昇または低下し得る。タンパク質レベルの差は、限定はされないが、ウエスタンブロット、免疫組織化学染色、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、および質量分析を含むプロテオミクス技術を用いて評価し得る。あるいは、ＡＤ関連タンパク質は、限定はされないが、ＤＮＡマイクロアレイ解析、遺伝子発現連鎖解析（ＳＡＧＥ）、および定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Ｑ－ＰＣＲ）を含むゲノム技術を用いて、それらのタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子発現プロファイルを得ることにより同定され得る。

【０６６０】

アルツハイマー病関連タンパク質の例としては、例えば、ＶＬＤＬＲ遺伝子によりコードされる超低密度リポタンパク質受容体タンパク質（ＶＬＤＬＲ）、ＵＢＡ１遺伝子によりコードされるユビキチン様修飾因子活性化酵素１（ＵＢＡ１）、またはＵＢＡ３遺伝子によりコードされるＮＥＤＤ８活性化酵素Ｅ１触媒サブユニットタンパク質（ＵＢＥ１Ｃ）を挙げることができる。

【０６６１】

非限定的な例として、ＡＤに関連するタンパク質には、限定はされないが、以下のとおり列挙されるタンパク質が含まれる：染色体配列によりコードされるタンパク質ＡＬＡＳ２　Δ－アミノレブリン酸シンターゼ２（ＡＬＡＳ２）　ＡＢＣＡ１　ＡＴＰ結合カセットトランスポーター（ＡＢＣＡ１）　ＡＣＥ　アンジオテンシンＩ変換酵素（ＡＣＥ）　ＡＰＯＥ　アポリポタンパク質Ｅ前駆体（ＡＰＯＥ）　ＡＰＰ　アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）　ＡＱＰ１　アクアポリン１タンパク質（ＡＱＰ１）　ＢＩＮ１　Ｍｙｃボックス依存性相互作用タンパク質１または架橋インテグレータ（ｂｒｉｄｇｉｎｇ　ｉｎｔｅｇｒａｔｏｒ）１タンパク質（ＢＩＮ１）　ＢＤＮＦ　脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）　ＢＴＮＬ８　ブチロフィリン様タンパク質８（ＢＴＮＬ８）　Ｃ１ＯＲＦ４９　染色体１オープンリーディングフレーム４９　ＣＤＨ４　カドヘリン４　ＣＨＲＮＢ２　ニューロンアセチルコリン受容体サブユニットβ－２　ＣＫＬＦＳＦ２　ＣＫＬＦ様ＭＡＲＶＥＬ膜貫通ドメイン含有タンパク質２（ＣＫＬＦＳＦ２）　ＣＬＥＣ４Ｅ　Ｃ型レクチンドメインファミリー４、メンバーｅ（ＣＬＥＣ４Ｅ）　ＣＬＵ　クラスタリンタンパク質（アポリポタンパク質（ａｐｏｐｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ）Ｊとしても知られる）　ＣＲ１　赤血球補体受容体１（ＣＲ１、またＣＤ３５、Ｃ３ｂ／Ｃ４ｂ受容体および免疫粘着受容体としても知られる）　ＣＲ１Ｌ　赤血球補体受容体１（ＣＲ１Ｌ）　ＣＳＦ３Ｒ　顆粒球コロニー刺激因子３受容体（ＣＳＦ３Ｒ）　ＣＳＴ３　シスタチンＣまたはシスタチン３　ＣＹＰ２Ｃ　シトクロムＰ４５０　２Ｃ　ＤＡＰＫ１　細胞死関連プロテインキナーゼ１（ＤＡＰＫ１）　ＥＳＲ１　エストロゲン受容体１　ＦＣＡＲ　ＩｇＡ受容体のＦｃ断片（ＦＣＡＲ、またＣＤ８９としても知られる）　ＦＣＧＲ３Ｂ　ＩｇＧのＦｃ断片、低親和性ＩＩＩｂ、受容体（ＦＣＧＲ３ＢまたはＣＤ１６ｂ）　ＦＦＡ２　遊離脂肪酸受容体２（ＦＦＡ２）　ＦＧＡ　フィブリノゲン（因子Ｉ）　ＧＡＢ２　ＧＲＢ２関連結合タンパク質２（ＧＡＢ２）　ＧＡＢ２　ＧＲＢ２関連結合タンパク質２（ＧＡＢ２）　ＧＡＬＰ　ガラニン様ペプチド　ＧＡＰＤＨＳ　グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、精子形成（ＧＡＰＤＨＳ）　ＧＭＰＢ　ＧＭＢＰ　ＨＰハプトグロビン（ＨＰ）　ＨＴＲ７　５－ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体７（アデニル酸シクラーゼ共役型）　ＩＤＥ　インスリン分解酵素　ＩＦ１２７　ＩＦ１２７　ＩＦＩ６インターフェロン、α－誘導性タンパク質６（ＩＦＩ６）　ＩＦＩＴ２　テトラトリコペプチドリピートを有するインターフェロン誘導タンパク質２（ＩＦＩＴ２）　ＩＬ１ＲＮ　インターロイキン－１受容体拮抗薬（ＩＬ－１ＲＡ）　ＩＬ８ＲＡ　インターロイキン８受容体、α（ＩＬ８ＲＡまたはＣＤ１８１）　ＩＬ８ＲＢ　インターロイキン８受容体、β（ＩＬ８ＲＢ）　ＪＡＧ１ジャグド１（ＪＡＧ１）　ＫＣＮＪ１５　カリウム内向き整流性チャネル、サブファミリーＪ、メンバー１５（ＫＣＮＪ１５）　ＬＲＰ６　低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質６（ＬＲＰ６）　ＭＡＰＴ　微小管結合タンパク質τ（ＭＡＰＴ）　ＭＡＲＫ４　ＭＡＰ／微小管親和性調節キナーゼ４（ＭＡＲＫ４）　ＭＰＨＯＳＰＨ１　Ｍ期リンタンパク質１　ＭＴＨＦＲ　５，１０－メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素　ＭＸ２　インターフェロン誘導ＧＴＰ結合タンパク質　Ｍｘ２　ＮＢＮ　ニブリン、ＮＢＮとしても知られる　ＮＣＳＴＮ　ニカストリン　ＮＩＡＣＲ２　ナイアシン受容体２（ＮＩＡＣＲ２、またＧＰＲ１０９Ｂとしても知られる）　ＮＭＮＡＴ３　ニコチンアミドヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ３　ＮＴＭ　ニューロトリミン（またはＨＮＴ）　ＯＲＭ１　オロソムコイド（Ｏｒｏｓｍｕｃｏｉｄ）１（ＯＲＭ１）またはα－１－酸糖タンパク質１　Ｐ２ＲＹ１３　Ｐ２Ｙ　プリン受容体１３（Ｐ２ＲＹ１３）　ＰＢＥＦ１　プレＢ細胞コロニー増強因子１（ＰＢＥＦ１）またはビスファチンとしても知られるニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＮＡｍＰＲＴアーゼまたはＮａｍｐｔ）　ＰＣＫ１　ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ　ＰＩＣＡＬＭ　ホスファチジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質（ＰＩＣＡＬＭ）　ＰＬＡＵ　ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベータ（ＰＬＡＵ）　ＰＬＸＮＣ１　プレキシンＣ１（ＰＬＸＮＣ１）　ＰＲＮＰ　プリオンタンパク質　ＰＳＥＮ１　プレセニリン１タンパク質（ＰＳＥＮ１）　ＰＳＥＮ２　プレセニリン２タンパク質（ＰＳＥＮ２）　ＰＴＰＲＡ　タンパク質チロシンホスファターゼ受容体Ａ型タンパク質（Ｐ

ＴＰＲＡ） ＲＡＬＧＰＳ２ ＰＨドメインおよびＳＨ３結合モチーフを有するＲａｌＧＥＦ２（ＲＡＬＧＰＳ２） ＲＧＳＬ２ Ｇタンパク質シグナル伝達様の調節因子２（ＲＧＳＬ２） ＳＥＬＥＮＢＰ１ セレン結合タンパク質１（ＳＥＬＮＢＰ１） ＳＬＣ２５Ａ３７ ミトフェリン１ ＳＯＲＬ１ ソルチリン関連受容体Ｌ（ＤＬＲクラス）Ａリピート含有タンパク質（ＳＯＲＬ１） ＴＦ トランスフェリン ＴＦＡＭ ミトコンドリア転写因子Ａ ＴＮＦ 腫瘍壊死因子 ＴＮＦＲＳＦ１０Ｃ 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー１０Ｃ（ＴＮＦＲＳＦ１０Ｃ） ＴＮＦＳＦ１０ 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、（ＴＲＡＩＬ）メンバー１０ａ（ＴＮＦＳＦ１０） ＵＢＡ１ ユビキチン様モディファイヤー活性化酵素１（ＵＢＡ１） ＵＢＡ３ ＮＥＤＤ８活性化酵素Ｅ１触媒サブユニットタンパク質（ＵＢＥ１Ｃ） ＵＢＢ ユビキチンＢタンパク質（ＵＢＢ） ＵＢＱＬＮ１ ユビキリン１ ＵＣＨＬ１ ユビキチンカルボキシル末端エステラーゼＬ１タンパク質（ＵＣＨＬ１） ＵＣＨＬ３ ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼアイソザイムＬ３タンパク質（ＵＣＨＬ３） ＶＬＤＬＲ 超低密度リポタンパク質受容体タンパク質（ＶＬＤＬＲ）。

【０６６２】

例示的実施形態において、その染色体配列が編集されるＡＤに関連するタンパク質は、ＶＬＤＬＲ遺伝子によりコードされる超低密度リポタンパク質受容体タンパク質（ＶＬＤＬＲ）、ＵＢＡ１遺伝子によりコードされるユビキチン様モディファイヤー活性化酵素１（ＵＢＡ１）、ＵＢＡ３遺伝子によりコードされるＮＥＤＤ８活性化酵素Ｅ１触媒サブユニットタンパク質（ＵＢＥ１Ｃ）、ＡＱＰ１遺伝子によりコードされるアクアポリン１タンパク質（ＡＱＰ１）、ＵＣＨＬ１遺伝子によりコードされるユビキチンカルボキシル末端エステラーゼＬ１タンパク質（ＵＣＨＬ１）、ＵＣＨＬ３遺伝子によりコードされるユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼアイソザイムＬ３タンパク質（ＵＣＨＬ３）、ＵＢＢ遺伝子によりコードされるユビキチンＢタンパク質（ＵＢＢ）、ＭＡＰＴ遺伝子によりコードされる微小管結合タンパク質τ（ＭＡＰＴ）、ＰＴＰＲＡ遺伝子によりコードされるタンパク質チロシンホスファターゼ受容体Ａ型タンパク質（ＰＴＰＲＡ）、ＰＩＣＡＬＭ遺伝子によりコードされるホスファチジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質（ＰＩＣＡＬＭ）、ＣＬＵ遺伝子によりコードされるクラスタリンタンパク質（アポリポタンパク質（ａｐｏｐｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ）Ｊとしても知られる）、ＰＳＥＮ１遺伝子によりコードされるプレセニリン１タンパク質、ＰＳＥＮ２遺伝子によりコードされるプレセニリン２タンパク質、ＳＯＲＬ１遺伝子によりコードされるソルチリン関連受容体Ｌ（ＤＬＲクラス）Ａリピート含有タンパク質（ＳＯＲＬ１）タンパク質、ＡＰＰ遺伝子によりコードされるアミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）、ＡＰＯＥ遺伝子によりコードされるアポリポタンパク質Ｅ前駆体（ＡＰＯＥ）、またはＢＤＮＦ遺伝子によりコードされる脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）であり得る。例示的実施形態において、遺伝子改変を受ける動物はラットであり、およびＡＤに関連するタンパク質をコードする編集される染色体配列は以下のとおりである：ＡＰＰ アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ） ＮＭ＿０１９２８８ ＡＱＰ１ アクアポリン１タンパク質（ＡＱＰ１） ＮＭ＿０１２７７８ ＢＤＮＦ 脳由来神経栄養因子 ＮＭ＿０１２５１３ ＣＬＵ クラスタリンタンパク質（ＮＭ＿０５３０２１ アポリポタンパク質（ａｐｏｐｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ）Ｊとしても知られる） ＭＡＰＴ 微小管結合タンパク質 ＮＭ＿０１７２１２ τ（ＭＡＰＴ） ＰＩＣＡＬＭ ホスファチジルイノシトール結合 ＮＭ＿０５３５５４ クラスリン集合タンパク質（ＰＩＣＡＬＭ） ＰＳＥＮ１ プレセニリン１タンパク質（ＰＳＥＮ１） ＮＭ＿０１９１６３ ＰＳＥＮ２ プレセニリン２タンパク質（ＰＳＥＮ２） ＮＭ＿０３１０８７ ＰＴＰＲＡ タンパク質チロシンホスファターゼ ＮＭ＿０１２７６３ 受容体Ａ型タンパク質（ＰＴＰＲＡ） ＳＯＲＬ１ ソルチリン関連受容体Ｌ（ＤＬＲ ＮＭ＿０５３５１９、クラス）Ａリピート含有 ＸＭ＿００１０６５５０６、タンパク質 （ＳＯＲＬ１） ＸＭ＿２１７１１５ ＵＢＡ１ ユビキチン様モディファイヤー活性化 ＮＭ＿００１０１４０８０ 酵素１（ＵＢＡ１） ＵＢＡ３ ＮＥＤＤ８活性化酵素Ｅ１ ＮＭ＿０５７２０５ 触媒サブユニットタンパク質（ＵＢＥ１Ｃ）

ＵＢＢ　ユビキチンＢタンパク質（ＵＢＢ）　ＮＭ＿１３８８９５　ＵＣＨＬ１　ユビキチンカルボキシル末端　ＮＭ＿０１７２３７　エステラーゼＬ１タンパク質（ＵＣＨＬ１）　ＵＣＨＬ３　ユビキチンカルボキシル末端　ＮＭ＿００１１１０１６５　ヒドロラーゼアイソザイムＬ３タンパク質（ＵＣＨＬ３）　ＶＬＤＬＲ　超低密度リポタンパク質　ＮＭ＿０１３１５５　受容体タンパク質（ＶＬＤＬＲ）。

【０６６３】

動物または細胞は、ＡＤに関連するタンパク質をコードする１、２、３、４、５、６、７、８、９，１０、１１、１２、１３、１４、１５個またはそれ以上の破壊された染色体配列、およびＡＤに関連するタンパク質をコードする０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５個またはそれ以上の染色体にインテグレートされた配列を含み得る。

【０６６４】

編集されるまたはインテグレートされる染色体配列は、変化したＡＤに関連するタンパク質をコードするように改変され得る。ＡＤ関連染色体配列における数多くの突然変異がＡＤと関連付けられている。例えば、ＡＰＰにおけるＶ７１７１（すなわち７１７位のバリンがイソロイシンに変わる）ミスセンス突然変異は家族性ＡＤを引き起こす。プレセニリン１タンパク質における複数の突然変異、例えばＨ１６３Ｒ（すなわち１６３位のヒスチジンがアルギニンに変わる）、Ａ２４６Ｅ（すなわち２４６位のアラニンがグルタミン酸に変わる）、Ｌ２８６Ｖ（すなわち２８６位のロイシンがバリンに変わる）およびＣ４１０Ｙ（すなわち４１０位のシステインがチロシンに変わる）は家族性アルツハイマー３型を引き起こす。プレセニリン２タンパク質における突然変異、例えばＮ１４１Ｉ（すなわち１４１位のアスパラギンがイソロイシンに変わる）、Ｍ２３９Ｖ（すなわち２３９位のメチオニンがバリンに変わる）、およびＤ４３９Ａ（すなわち４３９位のアスパラギン酸がアラニンに変わる）は家族性アルツハイマー４型を引き起こす。ＡＤ関連遺伝子の遺伝的変異と疾患との他の関連性は当該技術分野において公知である。例えば、Ｗａｒｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ａｒｃｈ．Ｎｅｕｒｏｌ．６５：３２９－３３４（この開示は参照により全体として本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【０６６５】

自閉症スペクトラム障害に関連するタンパク質の例としては、例えば、ＢＺＲＡＰ１遺伝子によりコードされるベンゾジアゼピン受容体（末梢性）関連タンパク質１（ＢＺＲＡＰ１）、ＡＦＦ２遺伝子（ＭＦＲ２とも称される）によりコードされるＡＦ４／ＦＭＲ２ファミリーメンバー２タンパク質（ＡＦＦ２）、ＦＸＲ１遺伝子によりコードされる脆弱性Ｘ精神遅滞常染色体ホモログ１タンパク質（ＦＸＲ１）、またはＦＸＲ２遺伝子によりコードされる脆弱性Ｘ精神遅滞常染色体ホモログ２タンパク質（ＦＸＲ２）を挙げることができる。

【０６６６】

黄斑変性症に関連するタンパク質の例としては、例えば、ＡＢＣＲ遺伝子によりコードされるＡＴＰ結合カセットサブファミリーＡ（ＡＢＣ１）メンバー４タンパク質（ＡＢＣＡ４）、ＡＰＯＥ遺伝子によりコードされるアポリポタンパク質Ｅタンパク質（ＡＰＯＥ）、またはＣＣＬ２遺伝子によりコードされるケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド２タンパク質（ＣＣＬ２）を挙げることができる。

【０６６７】

統合失調症に関連するタンパク質の例としては、ＮＲＧ１、ＥｒｂＢ４、ＣＰＬＸ１、ＴＰＨ１、ＴＰＨ２、ＮＲＸＮ１、ＧＳＫ３Ａ、ＢＤＮＦ、ＤＩＳＣ１、ＧＳＫ３Ｂ、およびそれらの組合せを挙げることができる。

【０６６８】

腫瘍抑制に関与するタンパク質の例としては、例えば、ＡＴＭ（毛細血管拡張性運動失調症変異）、ＡＴＲ（毛細血管拡張性運動失調症およびＲａｄ３関連）、ＥＧＦＲ（上皮成長因子受容体）、ＥＲＢＢ２（ｖ－ｅｒｂ－ｂ２赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ２）、ＥＲＢＢ３（ｖ－ｅｒｂ－ｂ２赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ３）

、ＥＲＢＢ４（ｖ－ｅｒｂ－ｂ２赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ４）、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、またはＮｏｔｃｈ４を挙げることができる。

【０６６９】

セクレターゼ障害に関連するタンパク質の例としては、例えば、ＰＳＥＮＥＮ（プレセニリンエンハンサー２ホモログ（線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ））、ＣＴＳＢ（カテプシンＢ）、ＰＳＥＮ１（プレセニリン１）、ＡＰＰ（アミロイドベータ（Ａ４）前駆体タンパク質）、ＡＰＨ１Ｂ（咽頭前部欠損１ホモログＢ（線虫（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ））、ＰＳＥＮ２（プレセニリン２（アルツハイマー病４））、またはＢＡＣＥ１（ベータ部位ＡＰＰ開裂酵素１）を挙げることができる。

【０６７０】

例えば、米国特許出願公開第２０１１００２３１４６号明細書は、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用したセクレターゼ関連障害に関連する細胞、動物およびタンパク質の遺伝子改変を記載している。セクレターゼは、プレタンパク質をその生物学的に活性な形態にプロセシングするために必須である。セクレターゼ経路の種々の構成成分の欠損は、多くの障害、特に、アルツハイマー病（ＡＤ）など、顕著な特徴であるアミロイド形成またはアミロイド斑を伴う障害に寄与する。

【０６７１】

セクレターゼ障害およびそれらの障害に関連するタンパク質は、数多くの障害に対する感受性、障害の存在、障害の重症度、またはそれらの任意の組み合わせをもたらすタンパク質の多様な集合である。本開示は、セクレターゼ障害に関連するタンパク質をコードする任意の染色体配列を編集することを含む。セクレターゼ障害に関連するタンパク質は、典型的にはセクレターゼ関連タンパク質とセクレターゼ障害の発症との実験的関連性に基づき選択される。例えば、セクレターゼ障害を有する集団では、セクレターゼ障害を有しない集団と比べてセクレターゼ障害に関連するタンパク質の産生速度または循環中濃度が上昇または低下し得る。タンパク質レベルの差は、限定はされないが、ウエスタンブロット、免疫組織化学染色、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、および質量分析を含むプロテオミクス技術を用いて評価し得る。あるいは、セクレターゼ障害に関連するタンパク質は、限定はされないが、ＤＮＡマイクロアレイ解析、遺伝子発現連鎖解析（ＳＡＧＥ）、および定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Ｑ－ＰＣＲ）を含むゲノム技術を用いて、それらのタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子発現プロファイルを得ることにより同定され得る。

【０６７２】

非限定的な例として、セクレターゼ障害に関連するタンパク質には、ＰＳＥＮＥＮ（プレセニリンエンハンサー２ホモログ（Ｃ．エレガンス（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ））、ＣＴＳＢ（カテプシンＢ）、ＰＳＥＮ１（プレセニリン１）、ＡＰＰ（アミロイドβ（Ａ４）前駆体タンパク質）、ＡＰＨ１Ｂ（前咽頭不全１ホモログＢ（Ｃ．エレガンス（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ））、ＰＳＥＮ２（プレセニリン２（アルツハイマー病４））、ＢＡＣＥ１（β部位ＡＰＰ開裂酵素１）、ＩＴＭ２Ｂ（内在性膜タンパク質２Ｂ）、ＣＴＳＤ（カテプシンＤ）、ＮＯＴＣＨ１（ノッチホモログ１、転座関連（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））、ＴＮＦ（腫瘍壊死因子（ＴＮＦスーパーファミリー、メンバー２））、ＩＮＳ（インスリン）、ＤＹＴ１０（ジストニー１０）、ＡＤＡＭ１７（ＡＤＡＭメタロペプチダーゼドメイン１７）、ＡＰＯＥ（アポリポタンパク質Ｅ）、ＡＣＥ（アンジオテンシンＩ変換酵素（ペプチジルジペプチダーゼＡ）１）、ＳＴＮ（スタチン）、ＴＰ５３（腫瘍タンパク質ｐ５３）、ＩＬ６（インターロイキン６（インターフェロン、β２））、ＮＧＦＲ（神経成長因子受容体（ＴＮＦＲスーパーファミリー、メンバー１６））、ＩＬ１Ｂ（インターロイキン１、β）、ＡＣＨＥ（アセチルコリンエステラーゼ（Ｙｔ血液型））、ＣＴＮＮＢ１（カテニン（カドヘリン関連タンパク質）、β１、８８ｋＤａ）、ＩＧＦ１（インスリン様成長因子１（ソマトメジンＣ））、ＩＦＮＧ（インターフェロン、γ）、ＮＲＧ１（ニューレグリン１）、ＣＡＳＰ３（カスパーゼ３、アポトーシス関連システインペプチダーゼ）、ＭＡＰＫ１（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ

１）、ＣＤＨ１（カドヘリン１、１型、Ｅ－カドヘリン（上皮））、ＡＰＢＢ１（アミロイドβ（Ａ４）前駆体タンパク質結合、ファミリーＢ、メンバー１（Ｆｅ６５））、ＨＭＧＣＲ（３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル補酵素Ａ還元酵素）、ＣＲＥＢ１（ｃＡＭＰ応答エレメント結合タンパク質１）、ＰＴＧＳ２（プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ２（プロスタグランジンＧ／Ｈシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ））、ＨＥＳ１（ヘアリーおよびエンハンサー・オブ・スプリット１、（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））））、ＣＡＴ（カタラーゼ）、ＴＧＦＢ１（形質転換成長因子、β１）、ＥＮＯ２（エノラーゼ２（γ、ニューロン））、ＥＲＢＢ４（ｖ－ｅｒｂ－ａ赤芽球性白血病ウイルス性癌遺伝子ホモログ４（トリ））、ＴＲＡＰＰＣ１０（輸送タンパク質粒子複合体１０）、ＭＡＯＢ（モノアミンオキシダーゼＢ）、ＮＧＦ（神経成長因子（βポリペプチド））、ＭＭＰ１２（マトリックスメタロペプチダーゼ１２（マクロファージエラスターゼ））、ＪＡＧ１（ジャグド１（アラジール症候群））、ＣＤ４０ＬＧ（ＣＤ４０リガンド）、ＰＰＡＲＧ（ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ）、ＦＧＦ２（線維芽細胞成長因子２（塩基性））、ＩＬ３（インターロイキン３（コロニー刺激因子、多重））、ＬＲＰ１（低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１）、ＮＯＴＣＨ４（ノッチホモログ４（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））、ＭＡＰＫ８（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ８）、ＰＲＥＰ（プロリルエンドペプチダーゼ）、ＮＯＴＣＨ３（ノッチホモログ３（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））、ＰＲＮＰ（プリオンタンパク質）、ＣＴＳＧ（カテプシンＧ）、ＥＧＦ（上皮成長因子（β－ウロガストロン））、ＲＥＮ（レニン）、ＣＤ４４（ＣＤ４４分子（インド人血液型））、ＳＥＬＰ（セレクチンＰ（顆粒膜タンパク質１４０ｋＤａ、抗原ＣＤ６２））、ＧＨＲ（成長ホルモン受容体）、ＡＤＣＹＡＰ１（アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド１（下垂体））、ＩＮＳＲ（インスリン受容体）、ＧＦＡＰ（グリア線維性酸性タンパク質）、ＭＭＰ３（マトリックスメタロペプチダーゼ３（ストロメライシン１、プロゼラチナーゼ））、ＭＡＰＫ１０（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ１０）、ＳＰ１（Ｓｐ１転写因子）、ＭＹＣ（ｖ－ｍｙｃ骨髄球腫症ウイルス癌遺伝子ホモログ（トリ））、ＣＴＳＥ（カテプシンＥ）、ＰＰＡＲＡ（ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体α）、ＪＵＮ（ｊｕｎ癌遺伝子）、ＴＩＭＰ１（ＴＩＭＰメタロペプチダーゼ阻害因子１）、ＩＬ５（インターロイキン５（コロニー刺激因子、好酸球））、ＩＬ１Ａ（インターロイキン１、α）、ＭＭＰ９（マトリックスメタロペプチダーゼ９（ゼラチナーゼＢ、９２ｋＤａゼラチナーゼ、９２ｋＤａ　ＩＶ型コラゲナーゼ））、ＨＴＲ４（５－ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体４）、ＨＳＰＧ２（ヘパラン硫酸プロテオグリカン２）、ＫＲＡＳ（ｖ－Ｋｉ－ｒａｓ２カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ）、ＣＹＣＳ（シトクロムｃ、体細胞性）、ＳＭＧ１（ＳＭＧ１ホモログ、ホスファチジルイノシトール３－キナーゼ関連キナーゼ（Ｃ．エレガンス（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ））、ＩＬ１Ｒ１（インターロイキン１受容体、Ｉ型）、ＰＲＯＫ１（プロキネチシン１）、ＭＡＰＫ３（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ３）、ＮＴＲＫ１（神経栄養チロシンキナーゼ、受容体、１型）、ＩＬ１３（インターロイキン１３）、ＭＭＥ（膜メタロエンドペプチダーゼ）、ＴＫＴ（トランスケトラーゼ）、ＣＸＣＲ２（ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）受容体２）、ＩＧＦ１Ｒ（インスリン様成長因子１受容体）、ＲＡＲＡ（レチノイン酸受容体、α）、ＣＲＥＢＢＰ（ＣＲＥＢ結合タンパク質）、ＰＴＧＳ１（プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ１（プロスタグランジンＧ／Ｈシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ））、ＧＡＬＴ（ガラクトース－１－リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ）、ＣＨＲＭ１（コリン作動性受容体、ムスカリン作動性１）、ＡＴＸＮ１（アタキシン１）、ＰＡＷＲ（ＰＲＫＣ、アポトーシス、ＷＴ１、調節因子）、ＮＯＴＣＨ２（ノッチホモログ２（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））、Ｍ６ＰＲ（マンノース－６－リン酸受容体（カチオン依存性））、ＣＹＰ４６Ａ１（シトクロムＰ４５０、ファミリー４６、サブファミリーＡ、ポリペプチド１）、ＣＳＮＫ１Ｄ（カゼインキナーゼ１、δ）、ＭＡＰＫ１４（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ１４）、ＰＲＧ２（プロテオグリカン２、骨髄（ナチュラルキラー細胞アクチベータ、好

酸球顆粒主要塩基性タンパク質））、ＰＲＫＣＡ（プロテインキナーゼＣ、α）、Ｌ１ＣＡＭ（Ｌ１細胞接着分子）、ＣＤ４０（ＣＤ４０分子、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー５）、ＮＲ１Ｉ２（核内受容体サブファミリー１、グループＩ、メンバー２）、ＪＡＧ２（ジャグド２）、ＣＴＮＮＤ１（カテニン（カドヘリン関連タンパク質）、δ１）、ＣＤＨ２（カドヘリン２、１型、Ｎ－カドヘリン（神経型））、ＣＭＡ１（キマーゼ１、マスト細胞）、ＳＯＲＴ１（ソルチリン１）、ＤＬＫ１（δ様１ホモログ（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））、ＴＨＥＭ４（チオエステラーゼスーパーファミリーメンバー４）、ＪＵＰ（結合プラコグロビン）、ＣＤ４６（ＣＤ４６分子、補体調節タンパク質）、ＣＣＬ１１（ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド１１）、ＣＡＶ３（カベオリン３）、ＲＮＡＳＥ３（リボヌクレアーゼ、ＲＮアーゼＡファミリー、３（好酸球陽イオンタンパク質））、ＨＳＰＡ８（熱ショック７０ｋＤａタンパク質８）、ＣＡＳＰ９（カスパーゼ９、アポトーシス関連システインペプチダーゼ）、ＣＹＰ３Ａ４（シトクロムＰ４５０、ファミリー３、サブファミリーＡ、ポリペプチド４）、ＣＣＲ３（ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体３）、ＴＦＡＰ２Ａ（転写因子ＡＰ－２α（活性化エンハンサー結合タンパク質２α））、ＳＣＰ２（ステロールキャリアタンパク質２）、ＣＤＫ４（サイクリン依存性キナーゼ４）、ＨＩＦ１Ａ（低酸素誘導因子１、αサブユニット（塩基性ヘリックス－ループ－ヘリックス転写因子））、ＴＣＦ７Ｌ２（転写因子７様２（Ｔ細胞特異的、ＨＭＧボックス））、ＩＬ１Ｒ２（インターロイキン１受容体、ＩＩ型）、Ｂ３ＧＡＬＴＬ（β　１，３－ガラクトシルトランスフェラーゼ様）、ＭＤＭ２（Ｍｄｍ２　ｐ５３結合タンパク質ホモログ（マウス））、ＲＥＬＡ（ｖ－ｒｅｌ細網内皮症ウイルス癌遺伝子ホモログＡ（トリ））、ＣＡＳＰ７（カスパーゼ７、アポトーシス関連システインペプチダーゼ）、ＩＤＥ（インスリン分解酵素）、ＦＡＢＰ４（脂肪酸結合タンパク質４、脂肪細胞）、ＣＡＳＫ（カルシウム／カルモジュリン依存性セリンプロテインキナーゼ（ＭＡＧＵＫファミリー））、ＡＤＣＹＡＰ１Ｒ１（アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド１（下垂体）受容体Ｉ型）、ＡＴＦ４（活性化転写因子４（ｔａｘ応答性エンハンサーエレメントＢ６７））、ＰＤＧＦＡ（血小板由来成長因子αポリペプチド）、Ｃ２１またはｆ３３（染色体２１オープンリーディングフレーム３３）、ＳＣＧ５（セクレトグラニンＶ（７Ｂ２タンパク質））、ＲＮＦ１２３（リングフィンガータンパク質１２３）、ＮＦＫＢ１（Ｂ細胞内κ軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核内因子１）、ＥＲＢＢ２（ｖ－ｅｒｂ－ｂ２赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ２、神経／膠芽腫由来癌遺伝子ホモログ（トリ））、ＣＡＶ１（カベオリン１、カベオラタンパク質、２２ｋＤａ）、ＭＭＰ７（マトリックスメタロペプチダーゼ７（マトリライシン、子宮））、ＴＧＦＡ（形質転換成長因子、α）、ＲＸＲＡ（レチノイドＸ受容体、α）、ＳＴＸ１Ａ（シンタキシン１Ａ（脳））、ＰＳＭＣ４（プロテアソーム（プロソーム、マクロパイン）２６Ｓサブユニット、ＡＴＰアーゼ、４）、Ｐ２ＲＹ２（プリン受容体Ｐ２Ｙ、Ｇタンパク質共役、２）、ＴＮＦＲＳＦ２１（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー２１）、ＤＬＧ１（ディスク、大ホモログ１（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））、ＮＵＭＢＬ（ｎｕｍｂホモログ（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））様）、ＳＰＮ（シアロホリン）、ＰＬＳＣＲ１（リン脂質スクランブラーゼ１）、ＵＢＱＬＮ２（ユビキリン２）、ＵＢＱＬＮ１（ユビキリン１）、ＰＣＳＫ７（プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン７型）、ＳＰＯＮ１（スポンジン１、細胞外マトリックスタンパク質）、ＳＩＬＶ（シルバーホモログ（マウス））、ＱＰＣＴ（グルタミニルペプチドシクロトランスフェラーゼ）、ＨＥＳＳ（ヘアリーおよびエンハンサー・オブ・スプリット５（ショウジョウバエ属（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ））、ＧＣＣ１（ＧＲＩＰおよびコイルドコイルドメイン含有１）、およびそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【０６７３】

遺伝子改変を受けた動物または細胞は、セクレターゼ障害に関連するタンパク質をコードする１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個またはそれ以上の破壊された染色体配列、および破壊されたセクレターゼ障害関連タンパク質をコードする０、１、２、３、

４、５、６、７、８、９、１０個またはそれ以上の染色体にインテグレートされた配列を含み得る。

【０６７４】

筋萎縮性側索硬化症に関連するタンパク質の例には、ＳＯＤ１（スーパーオキシドジスムターゼ１）、ＡＬＳ２（筋萎縮性側索硬化症２）、ＦＵＳ（肉腫融合）、ＴＡＲＤＢＰ（ＴＡＲ　ＤＮＡ結合タンパク質）、ＶＡＧＦＡ（血管内皮増殖因子Ａ）、ＶＡＧＦＢ（血管内皮増殖因子Ｂ）、およびＶＡＧＦＣ（血管内皮増殖因子Ｃ）、およびそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【０６７５】

例えば、米国特許出願公開第２０１１００２３１４４号明細書は、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用した筋萎縮性側索硬化症（ａｍｙｏｔｒｏｐｈｙｉｃ　ｌａｔｅｒａｌ　ｓｃｌｅｒｏｓｉｓ）（ＡＬＳ）疾患に関連する細胞、動物およびタンパク質の遺伝子改変を記載している。ＡＬＳは、随意運動に関わる皮質、脳幹、および脊髄における特定の神経細胞の漸進的で確実な変性によって特徴付けられる。

【０６７６】

運動ニューロン障害およびそれらの障害に関連するタンパク質は、運動ニューロン障害の発症に対する感受性、運動ニューロン障害の存在、運動ニューロン障害の重症度またはそれらの任意の組み合わせをもたらすタンパク質の多様な集合である。本開示は、特定の運動ニューロン障害であるＡＬＳ疾患に関連するタンパク質をコードする任意の染色体配列を編集することを含む。ＡＬＳに関連するタンパク質は、典型的にはＡＬＳ関連タンパク質とＡＬＳとの実験的関連性に基づき選択される。例えば、ＡＬＳを有する集団では、ＡＬＳを有しない集団と比べてＡＬＳに関連するタンパク質の産生速度または循環中濃度が上昇または低下し得る。タンパク質レベルの差は、限定はされないが、ウエスタンブロット、免疫組織化学染色、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、および質量分析を含むプロテオミクス技術を用いて評価し得る。あるいは、ＡＬＳに関連するタンパク質は、限定はされないが、ＤＮＡマイクロアレイ解析、遺伝子発現連鎖解析（ＳＡＧＥ）、および定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（Ｑ－ＰＣＲ）を含むゲノム技術を用いて、それらのタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子発現プロファイルを得ることにより同定され得る。

【０６７７】

非限定的な例として、ＡＬＳに関連するタンパク質としては、限定はされないが以下のタンパク質が挙げられる：ＳＯＤ１　スーパーオキシドジスムターゼ１、ＡＬＳ３　筋萎縮性側索　可溶性　硬化症３　ＳＥＴＸ　セナタキシン　ＡＬＳ５　筋萎縮性側索硬化症５　ＦＵＳ　肉腫融合　ＡＬＳ７　筋萎縮性側索硬化症７　ＡＬＳ２　筋萎縮性側索　ＤＰＰ６　ジペプチジルペプチダーゼ６　硬化症２　ＮＥＦＨ　ニューロフィラメント、ヘビー　ＰＴＧＳ１　プロスタグランジン－　ポリペプチド　エンドペルオキシドシンターゼ１　ＳＬＣ１Ａ２　溶質輸送担体ファミリー１　ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ　腫瘍壊死因子（グリア高親和性　受容体スーパーファミリー、グルタミン酸トランスポーター）、　メンバー１０ｂ　メンバー２　ＰＲＰＨ　ペリフェリン　ＨＳＰ９０ＡＡ１　熱ショックタンパク質９０ｋＤａ　α（細胞質型）、クラスＡ　メンバー１　ＧＲＩＡ２　グルタミン酸受容体、ＩＦＮＧ　インターフェロン、γ　イオンチャネル型、ＡＭＰＡ　２　Ｓ１００Ｂ　Ｓ１００カルシウム結合　ＦＧＦ２　線維芽細胞成長因子２　タンパク質Ｂ　ＡＯＸ１　アルデヒドオキシダーゼ１　ＣＳ　クエン酸シンターゼ　ＴＡＲＤＢＰ　ＴＡＲ　ＤＮＡ結合タンパク質　ＴＸＮ　チオレドキシン　ＲＡＰＨ１　Ｒａｓ関連　ＭＡＰ３Ｋ５　マイトジェン活性化プロテイン　（ＲａＩＧＤＳ／ＡＦ－６）および　キナーゼ５　プレクストリン相同ドメイン１　ＮＢＥＡＬ１　ニューロビアクチン様１　ＧＰＸ１　グルタチオンペルオキシダーゼ１　ＩＣＡ１Ｌ　膵島細胞自己抗原　ＲＡＣ１　ｒａｓ関連Ｃ３ボツリヌス　１．６９ｋＤａ様　毒素基質１　ＭＡＰＴ　微小管関連　ＩＴＰＲ２　イノシトール１，４，５－　タンパク質τ　三リン酸受容体、２型　ＡＬＳ２ＣＲ４　筋萎縮性側索　ＧＬＳ　グルタミナーゼ　硬化症２（若年性）染色体領域、候補４　ＡＬＳ

２ＣＲ８　筋萎縮性側索　ＣＮＴＦＲ　毛様体神経栄養因子　硬化症２（若年性）　受容体　染色体領域、候補８　ＡＬＳ２ＣＲ１１　筋萎縮性側索　ＦＯＬＨ１　葉酸ヒドロラーゼ１　硬化症２（若年性）染色体領域、候補１１　ＦＡＭ１１７Ｂ　配列を有するファミリー　Ｐ４ＨＢ　プロリル４－ヒドロキシラーゼ、　類似性１１７、メンバーＢ　βポリペプチド　ＣＮＴＦ　毛様体神経栄養因子　ＳＱＳＴＭ１　セクエストソーム１　ＳＴＲＡＤＢ　ＳＴＥ２０関連キナーゼ　ＮＡＩＰ　ＮＬＲファミリー、アポトーシス　アダプターβ　阻害タンパク質　ＹＷＨＡＱ　チロシン３－　ＳＬＣ３３Ａ１　溶質輸送担体ファミリー３３　モノオキシゲナーゼ／トリプトフ　（アセチル－ＣｏＡトランスポーター）、５－モノオキシゲナーゼ　メンバー１　活性化タンパク質、θポリペプチド　ＴＲＡＫ２　輸送タンパク質、ＦＩＧ．４　ＦＩＧ．４ホモログ、ＳＡＣ１　キネシン結合２　脂質ホスファターゼドメイン含有　ＮＩＦ３Ｌ１　ＮＩＦ３　ＮＧＧ１相互作用　ＩＮＡ　インターネキシンニューロン　因子３様１　中間径フィラメントタンパク質、α　ＰＡＲＤ３Ｂ　ｐａｒ－３分配　ＣＯＸ８Ａ　シトクロムｃオキシダーゼ　欠損３ホモログＢ　サブユニットＶＩＩＩＡ　ＣＤＫ１５　サイクリン依存性キナーゼ　ＨＥＣＷ１　ＨＥＣＴ、Ｃ２およびＷＷ　１５　ドメイン含有Ｅ３ユビキチンタンパク質リガーゼ１　ＮＯＳ１　一酸化窒素合成酵素１　ＭＥＴ　ｍｅｔ癌原遺伝子　ＳＯＤ２　スーパーオキシドジスムターゼ２、ＨＳＰＢ１　熱ショック２７ｋＤａ　ミトコンドリア　タンパク質１　ＮＥＦＬ　ニューロフィラメント、ライト　ＣＴＳＢ　カテプシンＢ　ポリペプチド　ＡＮＧ　アンジオゲニン、ＨＳＰＡ８　熱ショック７０ｋＤａ　リボヌクレアーゼ、ＲＮアーゼＡ　タンパク質８　ファミリー、５　ＶＡＰＢ　ＶＡＭＰ（小胞－　ＥＳＲ１　エストロゲン受容体１　関連膜タンパク質）関連タンパク質ＢおよびＣ　ＳＮＣＡ　シヌクレイン、α　ＨＧＦ　肝細胞成長因子　ＣＡＴ　カタラーゼ　ＡＣＴＢ　アクチン、β　ＮＥＦＭ　ニューロフィラメント、ミディアム　ＴＨ　チロシンヒドロキシラーゼ　ポリペプチド　ＢＣＬ２　Ｂ細胞ＣＬＬ／リンパ腫２　ＦＡＳ　Ｆａｓ（ＴＮＦ受容体スーパーファミリー、メンバー６）　ＣＡＳＰ３　カスパーゼ３、アポトーシス－　ＣＬＵ　クラスタリン　関連システインペプチダーゼ　ＳＭＮ１　運動ニューロン生存　Ｇ６ＰＤ　グルコース－６－リン酸　１、テロメア　デヒドロゲナーゼ　ＢＡＸ　ＢＣＬ２関連Ｘ　ＨＳＦ１　熱ショック転写　タンパク質　因子１　ＲＮＦ１９Ａ　リングフィンガータンパク質１９Ａ　ＪＵＮ　ｊｕｎ癌遺伝子　ＡＬＳ２ＣＲ１２　筋萎縮性側索　ＨＳＰＡ５　熱ショック７０ｋＤａ　硬化症２（若年性）　タンパク質５　染色体領域、候補１２　ＭＡＰＫ１４　マイトジェン活性化タンパク質　ＩＬ１０　インターロイキン１０　キナーゼ１４　ＡＰＥＸ１　ＡＰＥＸヌクレアーゼ　ＴＸＮＲＤ１　チオレドキシンレダクターゼ１　（多機能性ＤＮＡ修復酵素）１　ＮＯＳ２　一酸化窒素合成酵素２、ＴＩＭＰ１　ＴＩＭＰ　メタロペプチダーゼ　誘導性　阻害因子１　ＣＡＳＰ９　カスパーゼ９、アポトーシス－　ＸＩＡＰ　のＸ連鎖阻害因子　関連システイン　アポトーシス　ペプチダーゼ　ＧＬＧ１　ゴルジ糖タンパク質１　ＥＰＯ　エリスロポエチン　ＶＥＧＦＡ　血管内皮　ＥＬＮ　エラスチン　成長因子Ａ　ＧＤＮＦ　グリア細胞由来　ＮＦＥ２Ｌ２　核内因子（赤血球－　神経栄養因子　由来２）様２　ＳＬＣ６Ａ３　溶質輸送担体ファミリー６　ＨＳＰＡ４　熱ショック７０ｋＤａ　（神経伝達物質　タンパク質４　トランスポーター、ドーパミン）、メンバー３　ＡＰＯＥ　アポリポタンパク質Ｅ　ＰＳＭＢ８　プロテアソーム（プロソーム、マクロパイン）サブユニット、β型、８　ＤＣＴＮ１　ダイナクチン１　ＴＩＭＰ３　ＴＩＭＰメタロペプチダーゼ阻害因子３　ＫＩＦＡＰ３　キネシン関連　ＳＬＣ１Ａ１　溶質輸送担体ファミリー１　タンパク質３　（ニューロン／上皮高親和性グルタミン酸トランスポーター、システムＸａｇ）、メンバー１　ＳＭＮ２　運動ニューロン生存　ＣＣＮＣ　サイクリンＣ　２、セントロメア　ＭＰＰ４　膜タンパク質、ＳＴＵＢ１　ＳＴＩＰ１　相同性およびＵ－　パルミトイル化４　ボックス含有タンパク質１　ＡＬＳ２　アミロイドβ（Ａ４）　ＰＲＤＸ６　ペルオキシレドキシン６　前駆体タンパク質　ＳＹＰ　シナプトフィジン　ＣＡＢＩＮ１　カルシニューリン結合タンパク質１　ＣＡＳＰ１　カスパーゼ１、アポトーシス－　ＧＡＲＴ　ホスホリボシルグリシンアミ　関連システイン　ド　ホルミルトランスフェラーゼ、　ペプチダーゼ　ホス

ホリボシルグリシンアミ ド シンテターゼ、ホスホリボシルアミノイミ ダゾール シンテターゼ ＣＤＫ５ サイクリン依存性キナーゼ５ ＡＴＸＮ３ アタキシン３ ＲＴＮ４ レティキュロン４ Ｃ１ＱＢ 補体成分１、ｑサブ成分、Ｂ鎖 ＶＥＧＦＣ 神経成長因子 ＨＴＴ ハンチンチン受容体 ＰＡＲＫ７ パーキンソン病７ ＸＤＨ キサンチンデヒドロゲナーゼ ＧＦＡＰ グリア線維性酸性 ＭＡＰ２ 微小管結合 タンパク質 タンパク質２ ＣＹＣＳ シトクロムｃ、体細胞型、ＦＣＧＲ３Ｂ ＩｇＧのＦｃ断片、低親和性ＩＩＩｂ、ＣＣＳ の銅シャペロン ＵＢＬ５ ユビキチン様５ スーパーオキシドジスムターゼ ＭＭＰ９ マトリックスメタロペプチダーゼ ＳＬＣ１８Ａ３ 溶質輸送担体ファミリー１８ ９（（小胞アセチルコリン）、メンバー３ ＴＲＰＭ７ 一過性受容体 ＨＳＰＢ２ 熱ショック２７ｋＤａ 電位カチオンチャネル、 タンパク質２ サブファミリーＭ、メンバー７ ＡＫＴ１ ｖ－ａｋｔマウス胸腺腫 ＤＥＲＬ１ Ｄｅｒ１様ドメインファミリー、ウイルス癌遺伝子ホモログ１ メンバー１ ＣＣＬ２ ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ） ＮＧＲＮ ノイグリン、神経突起 リガンド２ 伸長関連 ＧＳＲ グルタチオンレダクターゼ ＴＰＰＰ３ チューブリン重合促進タンパク質ファミリーメンバー３ ＡＰＡＦ１ アポトーシスペプチダーゼ ＢＴＢＤ１０ ＢＴＢ（ＰＯＺ）ドメイン 活性化因子１ 含有１０ ＧＬＵＤ１ グルタミン酸 ＣＸＣＲ４ ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ） デヒドロゲナーゼ１ 受容体４ ＳＬＣ１Ａ３ 溶質輸送担体ファミリー１ ＦＬＴ１ ｆｍｓ関連チロシン （グリア高親和性グルタミン酸トランスポーター）、メンバー３ キナーゼ１ ＰＯＮ１ パラオキソナーゼ１ ＡＲ アンドロゲン受容体 ＬＩＦ 白血病抑制因子 ＥＲＢＢ３ ｖ－ｅｒｂ－ｂ２赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ３ ＬＧＡＬＳ１ レクチン、ガラクトシド－ ＣＤ４４ ＣＤ４４分子 結合、可溶性、１ ＴＰ５３ 腫瘍タンパク質ｐ５３ ＴＬＲ３ Ｔｏｌｌ様受容体３ ＧＲＩＡ１ グルタミン酸受容体、ＧＡＰＤＨ グリセルアルデヒド－３－ イオンチャネル型、ＡＭＰＡ １ リン酸デヒドロゲナーゼ ＧＲＩＫ１ グルタミン酸受容体、ＤＥＳ デスミン イオンチャネル型、カイニン酸１ ＣＨＡＴ コリンアセチルトランスフェラーゼ ＦＬＴ４ ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ４ ＣＨＭＰ２Ｂ クロマチン改変 ＢＡＧ１ ＢＣＬ２関連 タンパク質２Ｂ アタノ遺伝子 ＭＴ３ メタロチオネイン３ ＣＨＲＮＡ４ コリン作動性受容体、ニコチン性、α４ ＧＳＳ グルタチオンシンテターゼ ＢＡＫ１ ＢＣＬ２－アンタゴニスト／キラー１ ＫＤＲ キナーゼ挿入ドメイン ＧＳＴＰ１ グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ 受容体（ＩＩＩ型 π１ 受容体チロシンキナーゼ） ＯＧＧ１ ８－オキソグアニンＤＮＡ ＩＬ６ インターロイキン６（インターフェロン、グリコシラーゼ β２）。

【０６７８】

動物または細胞は、ＡＬＳに関連するタンパク質をコードする１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個またはそれ以上の破壊された染色体配列、および破壊されたＡＬＳ関連タンパク質をコードする０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個またはそれ以上の染色体にインテグレートされた配列を含み得る。好ましいＡＬＳ関連タンパク質には、ＳＯＤ１（スーパーオキシドジスムターゼ１）、ＡＬＳ２（筋萎縮性側索硬化症２）、ＦＵＳ（肉腫融合）、ＴＡＲＤＢＰ（ＴＡＲ ＤＮＡ結合タンパク質）、ＶＡＧＦＡ（血管内皮増殖因子Ａ）、ＶＡＧＦＢ（血管内皮増殖因子Ｂ）、およびＶＡＧＦＣ（血管内皮増殖因子Ｃ）、およびそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【０６７９】

プリオン疾患に関連するタンパク質の例としては、ＳＯＤ１（スーパーオキシドジスムターゼ１）、ＡＬＳ２（筋萎縮性側索硬化症２）、ＦＵＳ（ｆｕｓｅｄ ｉｎ ｓａｒｃｏｍａ）、ＴＡＲＤＢＰ（ＴＡＲ ＤＮＡ結合タンパク質）、ＶＡＧＦＡ（血管内皮成長因子Ａ）、ＶＡＧＦＢ（血管内皮成長因子Ｂ）、およびＶＡＧＦＣ（血管内皮成長因子Ｃ）、およびそれらの任意の組合せを挙げることができる。

【０６８０】

プリオン障害における神経変性病態に関連するタンパク質の例としては、例えば、Ａ２Ｍ（アルファ－２－マクログロブリン）、ＡＡＴＦ（アポトーシス拮抗転写因子）、ＡＣ

ＰＰ（前立腺酸性ホスファターゼ）、ＡＣＴＡ２（大動脈平滑筋アクチンアルファ２）、ＡＤＡＭ２２（ＡＤＡＭメタロペプチダーゼドメイン）、ＡＤＯＲＡ３（アデノシンＡ３受容体）、またはＡＤＲＡ１Ｄ（アルファ－１Ｄアドレナリン受容体についてのアルファ－１Ｄアドレナリン作動性受容体）を挙げることができる。

【０６８１】

免疫不全症に関連するタンパク質の例としては、例えば、Ａ２Ｍ［アルファ－２－マクログロブリン］；ＡＡＮＡＴ［アリールアルキルアミンＮ－アセチルトランスフェラーゼ］；ＡＢＣＡ１［ＡＴＰ結合カセットサブファミリーＡ（ＡＢＣ１）、メンバー１］；ＡＢＣＡ２［ＡＴＰ結合カセットサブファミリーＡ（ＡＢＣ１）、メンバー２］；またはＡＢＣＡ３［ＡＴＰ結合カセットサブファミリーＡ（ＡＢＣ１）、メンバー３］を挙げることができる。

【０６８２】

トリヌクレオチドリピート障害に関連するタンパク質の例としては、例えば、ＡＲ（アンドロゲン受容体）、ＦＭＲ１（脆弱性Ｘ精神遅滞１）、ＨＴＴ（ハンチントン）、またはＤＭＰＫ（筋緊張性異栄養症タンパク質キナーゼ）、ＦＸＮ（フラタキシン）、ＡＴＸＮ２（アタキシン２）が挙げられる。

【０６８３】

神経伝達障害に関連するタンパク質の例としては、例えば、ＳＳＴ（ソマトスタチン）、ＮＯＳ１（一酸化窒素シンターゼ１（神経型））、ＡＤＲＡ２Ａ（アドレナリン作動性アルファ－２Ａ受容体）、ＡＤＲＡ２Ｃ（アドレナリン作動性アルファ－２Ｃ受容体）、ＴＡＣＲ１（タキキニン受容体１）、またはＨＴＲ２ｃ（５－ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）受容体２Ｃ）が挙げられる。

【０６８４】

神経発達関連配列の例としては、例えば、Ａ２ＢＰ１［アタキシン２結合タンパク質１］、ＡＡＤＡＴ［アミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼ］、ＡＡＮＡＴ［アリールアルキルアミンＮ－アセチルトランスフェラーゼ］、ＡＢＡＴ［４－アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼ］、ＡＢＣＡ１［ＡＴＰ結合カセットサブファミリーＡ（ＡＢＣ１）メンバー１］、またはＡＢＣＡ１３［ＡＴＰ結合カセットサブファミリーＡ（ＡＢＣ１）メンバー１３］が挙げられる。

【０６８５】

本発明の系により治療可能な好ましい病態のさらなる例は、以下のものから選択することができる：アルカルディ－グティエール症候群；アレキサンダー病；アラン－ハーンドン－ダッドリー症候群；ＰＯＬＧ関連障害；アルファ－マンノシドーシス（ＩＩおよびＩＩＩ型）；アルストレム症候群；アンジェルマン症候群；毛細血管拡張性運動失調症；神経セロイドリポフスチン症；ベーターセラサミア；両側性視神経委縮症および（幼児型）視神経委縮症１型；網膜芽腫（両側性）；カナバン病；脳・眼・顔・骨格症候群１［ＣＯＦＳ１］；脳腱黄色腫症；コルネリア・デ・ラング症候群；ＭＡＰＴ関連障害；遺伝性プリオン病；ドラベ症候群；早期発症型家族性アルツハイマー病；フリードライヒ運動失調症［ＦＲＤＡ］；フリンス症候群；フコシドーシス；福山型先天性筋ジストロフィー；ガラクトシアリドーシス；ゴーシェ病；有機酸血症；血球貪食性リンパ組織球症；ハッチンソン－ギルフォード早老症候群；ムコリピドーシスＩＩ型；幼児遊離シアル酸蓄積症；ＰＬＡ２Ｇ６関連神経変性症；ジャーベル・ランゲ－ニールセン症候群；接合型表皮水疱症；ハンチントン病；クラッベ病（幼児型）；ミトコンドリアＤＮＡ関連リー症候群およびＮＡＲＰ；レッシュ－ナイハン症候群；ＬＩＳ１関連滑脳症；ロウ症候群；メープルシロップ尿症；ＭＥＣＰ２重複症候群；ＡＴＰ７Ａ関連銅輸送障害；ＬＡＭＡ２関連筋ジストロフィー；アリールスルファターゼＡ欠損症；ムコ多糖症Ｉ、ＩＩまたはＩＩＩ型；ペルオキシソーム形成異常症、ツェルウェーガー症候群スペクトラム；脳の鉄蓄積症を伴う神経変性症；酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症；ニーマン－ピック病Ｃ型；グリシン脳症；ＡＲＸ関連障害；尿素サイクル異常症；ＣＯＬ１Ａ１／２関連骨形成不全症；ミトコンドリアＤＮＡ欠失症候群；ＰＬＰ１関連障害；ペリー症候群；フェラン－マクダーモット

症候群；グリコーゲン蓄積症ＩＩ型（ポンペ病）（幼児型）；ＭＡＰＴ関連障害；ＭＥＣＰ２関連障害；肢根型点状軟骨異形成症１型；ロバーツ症候群；サンドホフ病；シンドラー病１型；アデノシンデアミナーゼ欠損症；スミス－レムリ－オピッツ症候群；脊髄性筋萎縮症；幼児期発症型脊髄小脳失調症；ヘキソサミニダーゼＡ欠損症；致死性異形成１型；コラーゲンＶＩ型関連障害；アッシャー症候群Ｉ型；先天性筋ジストロフィー；ウォルフ－ヒルシュホーン症候群；リソソーム酸リパーゼ欠損症；ならびに色素性乾皮症。

【０６８６】

明らかなとおり、本発明の系を使用して任意の目的ポリヌクレオチド配列をターゲティングすることができることが想定される。本発明の系を使用して有用に治療することができる病態または疾患の一部の例を上記表に含め、それらの病態に現在関連する遺伝子の例もその表に提供する。しかしながら、例示される遺伝子は排他的なものではない。

【０６８７】

例えば、「野生型ＳｔＣａｓ９」は、タンパク質配列がＳｗｉｓｓＰｒｏｔデータベースにおいて受託番号Ｇ３ＥＣＲ１として提供されるＳ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ（Ｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）由来の野生型Ｃａｓ９を指す。同様に、化膿連鎖球菌（Ｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９が、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔに受託番号Ｑ９９ＺＷ２として含まれる。

【０６８８】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を使用して効率的かつ費用対効果の高い遺伝子編集および操作を実施可能であることにより、生産を向上させかつ形質を強化するための単一の迅速な選択および比較ならびにかかるゲノムを形質転換する多重化した遺伝子操作が実現し得る。この点に関しては、米国特許および公開公報：米国特許第６，６０３，０６１号明細書－Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ　Ｐｌａｎｔ　Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ　Ｍｅｔｈｏｄ；米国特許第７，８６８，１４９号明細書－Ｐｌａｎｔ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ａｎｄ　Ｕｓｅｓ　Ｔｈｅｒｅｏｆおよび米国特許出願公開第２００９／０１００５３６号明細書－Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ　Ｐｌａｎｔｓ　ｗｉｔｈ　Ｅｎｈａｎｃｅｄ　Ａｇｒｏｎｏｍｉｃ　Ｔｒａｉｔｓ（これらの各々の内容および開示は全て、本明細書に全体として参照により組み込まれる）が参照される。本発明の実施においては、Ｍｏｒｒｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ　“Ｃｒｏｐ　ｇｅｎｏｍｉｃｓ：ａｄｖａｎｃｅｓ　ａｎｄ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ”　Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｇｅｎｅｔ．２０１１　Ｄｅｃ　２９；１３（２）：８５－９６の内容および開示もまた、本明細書に全体として参照により組み込まれる。

【実施例】

【０６８９】

以下の実施例を、本発明の種々の実施形態を説明する目的のために挙げ、それらは本発明をいかなる様式にも限定することを意味しない。本実施例は、本明細書に記載の方法とともに、目下好ましい実施形態の代表例であり、例示であり、本発明の範囲に対する限定を意図するものではない。特許請求の範囲の範囲により定義される本発明の趣旨に包含されるその変更および他の使用は、当業者が行う。

【０６９０】

実施例１：真核細胞の核中のＣＲＩＳＰＲ複合体活性

例示的なＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系は、４つの遺伝子Ｃａｓ９、Ｃａｓ１、Ｃａｓ２、およびＣｓｎ１のクラスター、ならびに２つの非コードＲＮＡエレメント、ｔｒａｃｒＲＮＡおよび非反復配列の短いストレッチ（スペーサー、それぞれ約３０ｂｐ）により間隔が空いている反復配列の特徴的アレイ（ダイレクトリピート）を含有する化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ＳＦ３７０からのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座である。この系において、ターゲティングされるＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）を４つの連続ステップにおいて生成する（図２Ａ）。第１に、２つの非コードＲＮＡ、プレｃｒＲＮＡアレイおよびｔｒａｃｒＲＮＡがＣＲＩＳＰＲ遺伝子座から転写される。第２に、ｔｒａｃｒＲＮＡがプレｃｒＲＮＡのダイレクトリピートにハイブリダイズし、次いでそれが個々のスペーサー配列を含有する成熟ｃｒＲＮＡにプロセシングされる。第３に、

成熟ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体がＣａｓ９を、ｃｒＲＮＡのスペーサー領域とプロトスペーサーＤＮＡとの間のヘテロ二本鎖形成を介してプロトスペーサーおよび対応するＰＡＭからなるＤＮＡ標的に指向する。最後に、Ｃａｓ９は、ＰＡＭの上流の標的ＤＮＡの開裂を媒介してプロトスペーサー内でＤＳＢを創成する（図２Ａ）。この例は、このＲＮＡプログラマブルヌクレアーゼ系を適応させて真核細胞の核中のＣＲＩＳＰＲ複合体活性を指向する例示プロセスを記載する。

【０６９１】

細胞培養および形質移入

ヒト胚腎臓（ＨＥＫ）細胞系ＨＥＫ２９３ＦＴ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を、１０％のウシ胎仔血清（ＨｙＣｌｏｎｅ）、２ｍＭのＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１００Ｕ／ｍＬのペニシリン、および１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシンが補給されたダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中で３７℃において５％のCO_2インキュベーションで維持した。マウスｎｅｕｒｏ２Ａ（Ｎ２Ａ）細胞系（ＡＴＣＣ）を、５％のウシ胎仔血清（ＨｙＣｌｏｎｅ）、２ｍＭのＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１００Ｕ／ｍＬのペニシリン、および１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシンが補給されたＤＭＥＭにより、３７℃、５％のCO_2で維持した。

【０６９２】

ＨＥＫ２９３ＦＴまたはＮ２Ａ細胞を２４ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）中に、形質移入１日前に１ウェル当たり２００，０００個の細胞の密度において播種した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を製造業者の推奨プロトコルに従って使用して細胞を形質移入した。２４ウェルプレートのそれぞれのウェルについて、合計８００ｎｇのプラスミドを使用した。

【０６９３】

ゲノム改変についてのＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイおよびシーケンシング分析

ＨＥＫ２９３ＦＴまたはＮ２Ａ細胞を、上記プラスミドＤＮＡにより形質移入した。形質移入後、細胞を３７℃において７２時間インキュベートしてからゲノムＤＮＡを抽出した。ゲノムＤＮＡは、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔＤＮＡ抽出キット（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）を製造業者のプロトコルに従って使用して抽出した。手短に述べると、細胞をＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ溶液中で再懸濁させ、６５℃において１５分間および９８℃において１０分間インキュベートした。抽出されたゲノムＤＮＡを直ちに処理または－２０℃において貯蔵した。

【０６９４】

それぞれの遺伝子についてのＣＲＩＳＰＲ標的部位周囲のゲノム領域をＰＣＲ増幅し、ＱｉａＱｕｉｃｋ　Ｓｐｉｎ　Ｃｏｌｕｍｎ（Ｑｉａｇｅｎ）を製造業者のプロトコルに従って使用して産物を精製した。合計４００ｎｇの精製ＰＣＲ産物を２μｌの１０×Ｔａｑポリメラーゼ緩衝液（Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ）と混合し、超純水で２０μｌの最終容量とし、リアニーリングプロセスに供してヘテロ二本鎖形成を可能とした：９５℃において１０分間、－２℃／秒における傾斜で９５℃から８５℃、－０．２５℃／秒における８５℃から２５℃、および２５℃において１分間維持。リアニーリング後、産物をＳｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼおよびＳｕｒｖｅｙｏｒエンハンサーＳ（Ｔｒａｎｓｇｅｎｏｍｉｃｓ）により製造業者の推奨プロトコルに従って処理し、４～２０％のＮｏｖｅｘ　ＴＢＥポリアクリルアミドゲル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）上で分析した。ゲルをＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ　ＤＮＡ染色（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）により３０分間染色し、Ｇｅｌ　Ｄｏｃゲルイメージングシステム（Ｂｉｏ－ｒａｄ）によりイメージングした。定量は、開裂したＤＮＡの率の尺度としての相対バンド強度に基づくものであった。図７は、このＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイの模式的説明を提供する。

【０６９５】

相同組換えの検出のための制限断片長多型アッセイ

ＨＥＫ２９３ＦＴおよびＮ２Ａ細胞を、プラスミドＤＮＡにより形質移入し、３７℃に

おいて７２時間インキュベートしてから上記のとおりゲノムＤＮＡを抽出した。相同組換え（ＨＲ）テンプレートのホモロジーアーム外側のプライマーを使用して標的ゲノム領域をＰＣＲ増幅した。ＰＣＲ産物を１％のアガロースゲル上で分離し、ＭｉｎＥｌｕｔｅ　ＧｅｌＥｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）により抽出した。精製産物をＨｉｎｄＩＩＩ（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ）により消化し、６％のＮｏｖｅｘ　ＴＢＥポリアクリルアミドゲル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）上で分析した。

【０６９６】

ＲＮＡ二次構造予測および分析

ＲＮＡ二次構造予測は、Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｆｏｒ　Ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｔ　ｔｈｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｖｉｅｎｎａにおいて開発されたオンラインウェブサーバーＲＮＡｆｏｌｄを使用し、セントロイド構造予測アルゴリズムを使用して実施した（例えば、Ａ．Ｒ．Ｇｒｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ｃｅｌｌ　１０６（１）：２３－２４；およびＰＡ　Ｃａｒｒ　ａｎｄ　ＧＭ　Ｃｈｕｒｃｈ，２００９，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２７（１２）：１１５１－６２参照）。

【０６９７】

ＲＮＡ精製

ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を上記のとおり維持および形質移入した。細胞をトリプシン処理により回収し、次いでリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中で洗浄した。トータル細胞ＲＮＡをＴＲＩ試薬（Ｓｉｇｍａ）により製造業者のプロトコルに従って抽出した。抽出されたトータルＲＮＡをＮａｏｎｏｄｒｏｐ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して定量し、同一濃度に正規化した。

【０６９８】

哺乳動物細胞中のｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ発現のノザンブロット分析

ＲＮＡを等容量の２×ローディング緩衝液（Ａｍｂｉｏｎ）と混合し、９５℃に５分間加熱し、氷上で１分間冷蔵し、次いで８％の変性ポリアクリルアミドゲル（ＳｅｑｕａＧｅｌ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）上に、少なくとも３０分間のゲルのプレラン後にロードした。試料を４０Ｗ限界において１．５時間電気泳動した。その後、ＲＮＡをＨｙｂｏｎｄ　Ｎ＋メンブレン（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に３００ｍＡにおいてセミドライ転写装置（Ｂｉｏ－ｒａｄ）中で室温において１．５時間転写した。Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　ＵＶ　ＣｒｏｓｓｌｉｎｋｅｒのＳｔｒａｔａｌｉｎｋｅｒ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）上のオートクロスリンクボタンを使用してＲＮＡをメンブレンに架橋させた。メンブレンをＵＬＴＲＡｈｙｂ－オリゴハイブリダイゼーション緩衝液（Ａｍｂｉｏｎ）中で回転させながら４２℃において３０分間プレハイブリダイズさせ、次いでプローブを添加し、一晩ハイブリダイズさせた。プローブはＩＤＴに発注し、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いて［ガンマー^{32}Ｐ］ＡＴＰ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）により標識した。メンブレンを予備加温（４２℃）された２×ＳＳＣ、０．５％のＳＤＳにより１分間１回洗浄し、次いで４２℃において３０分間２回洗浄した。メンブレンを蛍光スクリーンに室温において１時間または一晩曝露させ、次いでｐｈｏｓｐｈｏｒｉｍａｇｅｒ（Ｔｙｐｈｏｏｎ）によりスキャンした。

【０６９９】

細菌ＣＲＩＳＰＲ系構築および評価

ｔｒａｃｒＲＮＡ、Ｃａｓ９、およびリーダーを含むＣＲＩＳＰＲ遺伝子座エレメントを、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ＳＦ３７０ゲノムＤＮＡから、ギブソン・アセンブリ（Ｇｉｂｓｏｎ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ）のためのフランキングホモロジーアームを用いてＰＣＲ増幅した。２つのＢｓａＩ　ＩＩＳ型部位を２つのダイレクトリピート間に導入してスペーサーの容易な挿入を促進した（図８）。Ｇｉｂｓｏｎ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（ＮＥＢ）を使用してＰＣＲ産物をＥｃｏＲＶ消化ｐＡＣＹＣ１８４中にｔｅｔプロモーターの下流でクローニングした。Ｃ

ｓｎ２の最後の５０ｂｐは除き、他の内因性ＣＲＩＳＰＲ系エレメントは除外した。相補的オーバーハングを有するスペーサーをコードするオリゴ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）をＢｓａＩ消化ベクターｐＤＣ０００（ＮＥＢ）中にクローニングし、次いでＴ７リガーゼ（Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ）によりライゲートしてｐＣＲＩＳＰＲプラスミドを生成した。哺乳類細胞におけるＰＡＭ発現を有するスペーサーを含有するチャレンジプラスミド（発現構築物は、図６Ｂに示すＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイの結果により決定されるとおりの機能と共に図６Ａに示す）。転写開始部位を＋１として標識し、転写ターミネーターおよびノザンブロットによりプロービングされる配列も示す。プロセシングされたｔｒａｃｒＲＮＡの発現もノザンブロットにより確認した。図６Ｃは、長鎖または短鎖ｔｒａｃｒＲＮＡ、ならびにＳｐＣａｓ９およびＤＲ－ＥＭＸ１（１）－ＤＲを担持するＵ６発現構築物により形質移入された２９３ＦＴ細胞から抽出されたトータルＲＮＡのノザンブロット分析の結果を示す。左および右側のパネルは、それぞれＳｐＲＮアーゼＩＩＩを用いず、または用いて形質移入された２９３ＦＴ細胞からのものである。Ｕ６は、ヒトＵ６ｓｎＲＮＡをターゲティングするプローブによりブロットされたローディング対照を示す。短鎖ｔｒａｃｒＲＮＡ発現構築物の形質移入は、十分なレベルのプロセシング形態のｔｒａｃｒＲＮＡ（約７５ｂｐ）をもたらした。極めて少量の長鎖ｔｒａｃｒＲＮＡがノザンブロット上で検出される。

【０７００】

正確な転写開始を促進するため、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩベースＵ６プロモーターを選択してｔｒａｃｒＲＮＡの発現をドライブした（図２Ｃ）。同様に、Ｕ６プロモーターベース構築物を開発して２つのダイレクトリピート（ＤＲ、用語「ｔｒａｃｒメイト配列」にも包含される；図２Ｃ）によりフランキングされている単一スペーサーからなるプレｃｒＲＮＡアレイを発現させた。最初のスペーサーは、大脳皮質の発達におけるキー遺伝子であるヒトＥＭＸ１遺伝子座中の３３塩基対（ｂｐ）標的部位（３０ｂｐのプロトスペーサーと、Ｃａｓ９のＮＧＧ認識モチーフを満たす３ｂｐのＣＲＩＳＰＲモチーフ（ＰＡＭ）配列）をターゲティングするように設計した（図２Ｃ）。

【０７０１】

哺乳動物細胞中のＣＲＩＳＰＲ系（ＳｐＣａｓ９、ＳｐＲＮアーゼＩＩＩ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、およびプレｃｒＲＮＡ）の異種発現がターゲティングされる哺乳動物染色体の開裂を達成し得るか否かを試験するため、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞をＣＲＩＳＰＲ成分の組合せにより形質移入した。哺乳動物核中のＤＳＢは部分的には、インデルの形成をもたらす非相同末端結合（ＮＨＥＪ）経路により修復されるため、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを使用して標的ＥＭＸ１遺伝子座における潜在的な開裂活性を検出した（図７）（例えば、Ｇｕｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，２０１０，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ６４９：２４７参照）。４つ全てのＣＲＩＳＰＲ成分の同時形質移入は、プロトスペーサーの最大５．０％の開裂を誘導し得た（図２Ｄ参照）。ＳｐＲＮアーゼＩＩＩを除く全てのＣＲＩＳＰＲ成分の同時形質移入も、プロトスペーサーの最大４．７％のインデルを誘導し、このことはｃｒＲＮＡ成熟を支援し得る内因性哺乳動物ＲＮアーゼ、例えば、関連ＤｉｃｅｒおよびＤｒｏｓｈａ酵素などが存在し得ることを示唆した。残り３つの成分のいずれかを除去すると、ＣＲＩＳＰＲ系のゲノム開裂活性は停止する（図２Ｄ）。標的遺伝子座を含有するアンプリコンのサンガーシーケンシングにより開裂活性を確認し；４３個のシーケンシングされたクローンのうち５つの突然変異アレル（１１．６％）が見出された。種々のガイド配列を使用する同様の実験は、２９％と高いインデル割合を生じさせた（図３～６、１０、および１１参照）。これらの結果は、哺乳動物細胞中の効率的なＣＲＩＳＰＲ媒介ゲノム改変のための３成分系を定義する。開裂効率を最適化するため、本出願人らは、ｔｒａｃｒＲＮＡの異なるアイソフォームが開裂効率に影響するか否かも試験し、この例示的系において、短鎖（８９ｂｐ）転写物形態のみがヒトＥＭＸ１ゲノム遺伝子座の開裂を媒介し得ることを見出した（図６Ｂ）。

【０７０２】

図１２は、哺乳動物細胞中のｃｒＲＮＡプロセシングの追加のノザンブロット分析を提

供する。図１２Ａは、２つのダイレクトリピートによりフランキングされている単一スペーサー（ＤＲ－ＥＭＸ１（１）－ＤＲ）についての発現ベクターを示す模式図を説明する。ヒトＥＭＸ１遺伝子座プロトスペーサー１をターゲティングする３０ｂｐのスペーサー（図６参照）およびダイレクトリピート配列を、図１２Ａの下方の配列中に示す。線は、逆相補配列を使用してＥＭＸ１（１）ｃｒＲＮＡ検出のためのノザンブロットプローブを生成する領域を示す。図１２Ｂは、ＤＲ－ＥＭＸ１（１）－ＤＲを担持するＵ６発現構築物により形質移入された２９３ＦＴ細胞から抽出されたトータルＲＮＡのノザンブロット分析を示す。左および右側のパネルは、それぞれＳｐＲＮアーゼＩＩＩを用いず、または用いて形質移入された２９３ＦＴ細胞からのものである。ＤＲ－ＥＭＸ１（１）－ＤＲは、ＳｐＣａｓ９が存在する場合のみ成熟ｃｒＲＮＡにプロセシングされ、短鎖ｔｒａｃｒＲＮＡはＳｐＲＮアーゼＩＩＩの存在に依存的でなかった。形質移入２９３ＦＴトータルＲＮＡから検出された成熟ｃｒＲＮＡは、約３３ｂｐであり、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）からの３９～４２ｂｐの成熟ｃｒＲＮＡよりも短かった。これらの結果は、ＣＲＩＳＰＲ系を真核細胞中に移植し、リプログラミングして内因性哺乳動物標的ポリヌクレオチドの開裂を促進することができることを実証する。

【０７０３】

図２は、本実施例に記載の細菌ＣＲＩＳＰＲ系を説明する。図２Ａは、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ＳＦ３７０からのＣＲＩＳＰＲ遺伝子座１およびこの系によるＣＲＩＳＰＲ媒介ＤＮＡ開裂の提案される機序を示す模式図を説明する。ダイレクトリピート－スペーサーアレイからプロセシングされた成熟ｃｒＲＮＡは、Ｃａｓ９を、相補的プロトスペーサーおよびプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）からなるゲノム標的に指向する。標的－スペーサー塩基対形成時、Ｃａｓ９は標的ＤＮＡ中の二本鎖切断を媒介する。図２Ｂは、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９（ＳｐＣａｓ９）およびＲＮアーゼＩＩＩ（ＳｐＲＮアーゼＩＩＩ）の、哺乳動物核中への輸送を可能とするための核局在化シグナル（ＮＬＳ）によるエンジニアリングを説明する。図２Ｃは、構成的ＥＦ１ａプロモーターによりドライブされるＳｐＣａｓ９およびＳｐＲＮアーゼＩＩＩならびに正確な転写開始および終結を促進するためのＲＮＡＰｏｌ３プロモーターＵ６によりドライブされるｔｒａｃｒＲＮＡおよびプレｃｒＲＮＡアレイ（ＤＲ－スペーサー－ＤＲ）の哺乳動物発現を説明する。十分なＰＡＭ配列を有するヒトＥＭＸ１遺伝子座からのプロトスペーサーを、プレｃｒＲＮＡアレイ中のスペーサーとして使用する。図２Ｄは、ＳｐＣａｓ９媒介少数挿入および欠失についてのｓｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイを説明する。ＳｐＣａｓ９を、ＳｐＲＮアーゼＩＩＩ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、およびＥＭＸ１標的スペーサーを担持するプレｃｒＲＮＡアレイを用いてまたは用いずに発現させた。図２Ｅは、標的遺伝子座とＥＭＸ１ターゲティングｃｒＲＮＡとの間の塩基対形成の模式的表示、ならびにＳｐＣａｓ９開裂部位に隣接する微小欠失を示す例示的クロマトグラムを説明する。図２Ｆは、種々の微小挿入および欠失を示す４３個のクローンアンプリコンのシーケンシング分析から同定された突然変異アレルを説明する。点線は、欠失塩基を示し、アラインされず、またはミスマッチの塩基は挿入または突然変異を示す。スケールバー＝１０μｍ。

【０７０４】

３成分系をさらに簡略化するため、ステム－ループを介して成熟ｃｒＲＮＡ（ガイド配列を含む）を部分ｔｒａｃｒＲＮＡに融合させて天然ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二本鎖を模倣するキメラｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡハイブリッド設計を適応させた。同時送達効率を増加させるため、形質移入細胞中のキメラＲＮＡおよびＳｐＣａｓ９の同時発現をドライブするバイシストロニック発現ベクターを創成した。並行して、バイシストロニックベクターを使用してプレｃｒＲＮＡ（ＤＲ－ガイド配列－ＤＲ）をＳｐＣａｓ９とともに発現させてｃｒＲＮＡへのプロセシングを誘導し、ｔｒａｃｒＲＮＡを別個に発現させた（図１１Ｂの上図および下図を比較）。図８は、ｈＳｐＣａｓ９を有するプレｃｒＲＮＡアレイ（図８Ａ）またはキメラｃｒＲＮＡ（図８Ｂ中のガイド配列挿入部位の下流およびＥＦ１αプロモーターの上流の短い線により表わされる）のためのバイシストロニ

ック発現ベクターの模式的説明を提供し、種々のエレメントの局在およびガイド配列挿入の場所を示す。図８Ｂ中のガイド配列挿入部位の局在周囲の拡大された配列は、部分ＤＲ配列（ＧＴＴＴＡＧＡＧＣＴＡ）および部分ｔｒａｃｒＲＮＡ配列（ＴＡＧＣＡＡＧＴＴＡＡＡＡＴＡＡＧＧＣＴＡＧＴＣＣＧＴＴＴＴＴ）も示す。ガイド配列は、アニールされたオリゴヌクレオチドを使用してＢｂｓＩ部位間に挿入することができる。オリゴヌクレオチドについての配列設計を図８の模式的説明の下方に示し、適切なライゲーションアダプターを示す。ＷＰＲＥは、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメントを表す。キメラＲＮＡ媒介開裂の効率を、上記の同一のＥＭＸ１遺伝子座をターゲティングすることにより試験した。Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイおよびアンプリコンのサンガーシーケンシングの両方を使用して、本出願人らは、キメラＲＮＡ設計がヒトＥＭＸ１遺伝子座の開裂を約４．７％の改変比率で促進することを確認した（図３）。

【０７０５】

真核細胞中のＣＲＩＳＰＲ媒介開裂の一般化可能性を、ヒトＥＭＸ１およびＰＶＡＬＢ、ならびにマウスＴｈ遺伝子座中の複数部位をターゲティングするキメラＲＮＡを設計することによりヒトおよびマウス細胞の両方において追加のゲノム遺伝子座をターゲティングすることにより試験した。図１３は、いくつかの追加のターゲティングされるヒトＰＶＡＬＢ（図１３Ａ）およびマウスＴｈ（図１３Ｂ）遺伝子座中のプロトスペーサーの選択を説明する。遺伝子座およびそれぞれの最後のエキソン内の３つのプロトスペーサーの局在の模式図を提供する。下線付き配列は、３０ｂｐのプロトスペーサー配列およびＰＡＭ配列に対応する３’末端における３ｂｐを含む。センスおよびアンチセンス鎖上のプロトスペーサーを、それぞれＤＮＡ配列の上方および下方に示す。ヒトＰＶＡＬＢおよびマウスＴｈ遺伝子座についてそれぞれ６．３％および０．７５％の改変比率が達成され、このことは複数の生物にわたる異なる遺伝子座の改変におけるＣＲＩＳＰＲ系の幅広い適用可能性を実証した（図５）。開裂はキメラ構築物を使用してそれぞれの遺伝子座について３つのスペーサーのうち１つについてのみ検出された一方、同時発現されるプレｃｒＲＮＡ配置を使用した場合、全ての標的配列が２７％に達するインデル生成の効率で開裂された（図６および１３）。

【０７０６】

図１１は、ＳｐＣａｓ９をリプログラミングして哺乳動物細胞中の複数のゲノム遺伝子座をターゲティングすることができることのさらなる説明を提供する。図１１Ａは、下線付き配列により示される５つのプロトスペーサーの局在を示すヒトＥＭＸ１遺伝子座の模式図を提供する。図１１Ｂは、プレｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡのダイレクトリピート領域間のハイブリダイゼーションを示すプレｃｒＲＮＡ／ｔｒｃｒＲＮＡ複合体の模式図（上図）および２０ｂｐのガイド配列、ならびにヘアピン構造にハイブリダイズしている部分ダイレクトリピートおよびｔｒａｃｒＲＮＡ配列からなるｔｒａｃｒメイトおよびｔｒａｃｒ配列を含むキメラＲＮＡ設計の模式図（下図）を提供する。ヒトＥＭＸ１遺伝子座中の５つのプロトスペーサーにおけるＣａｓ９媒介開裂の効力を比較するＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイの結果を、図１１Ｃに説明する。プロセシングされたプレｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体（ｃｒＲＮＡ）またはキメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）のいずれかを使用してそれぞれのプロトスペーサーをターゲティングする。

【０７０７】

ＲＮＡの二次構造は分子間相互作用に重要であり得るため、最小自由エネルギーおよびボルツマン加重構造アンサンブルに基づく構造予測アルゴリズムを使用してゲノムターゲティング実験に使用される全てのガイド配列の推定二次構造を比較した（例えば、Ｇｒｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，３６：Ｗ７０参照）。分析により、ほとんどの場合、キメラｃｒＲＮＡコンテクスト中の有効なガイド配列は二次構造モチーフを実質的に含まない一方、無効なガイド配列は標的プロトスペーサーＤＮＡとの塩基対形成を妨害し得る内部二次構造を形成する可能性がより高いことが明らかになった。したがって、スペーサー二次構造の変動性は、キメラｃｒＲＮＡを使用する場合にＣＲＩＳＰＲ媒介干渉の効率に影響し得ることが考えられる。

【０７０８】
ＳｐＣａｓ９のためのさらなるベクター設計を図２２に示し、それはガイドオリゴのための挿入部位に結合しているＵ６プロモーター、およびＳｐＣａｓ９コード配列に結合しているＣｂｈプロモーターを取り込む単一発現ベクターを説明する。図２２ｂに示されるベクターは、Ｈ１プロモーターに結合しているｔｒａｃｒＲＮＡコード配列を含む。
【０７０９】
細菌アッセイでは、全てのスペーサーが効率的なＣＲＩＳＰＲ干渉を促進した（図３Ｃ）。これらの結果は、哺乳類細胞におけるＣＲＩＳＰＲ活性の効率に影響を与えるさらなる因子が存在し得ることを示唆している。
【０７１０】
ＣＲＩＳＰＲ媒介開裂の特異性を調査するため、哺乳動物ゲノム中のプロトスペーサー開裂に対するガイド配列中の単一ヌクレオチド突然変異の効果を、単一点突然変異を有する一連のＥＭＸ１ターゲティングキメラｃｒＲＮＡを使用して分析した（図３Ａ）。図３Ｂは、異なる突然変異体キメラＲＮＡと対形成した場合のＣａｓ９の開裂効率を比較するＳｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイの結果を説明する。ＰＡＭの５’側の最大１２ｂｐの単一塩基ミスマッチは、ＳｐＣａｓ９によるゲノム開裂を実質的に停止させた一方、さらなる上流位置に突然変異を有するスペーサーは元のプロトスペーサー標的に対する活性を保持した（図３Ｂ）。ＰＡＭの他、ＳｐＣａｓ９は、スペーサーの最後の１２ｂｐ内の単一塩基特異性を有する。さらに、ＣＲＩＳＰＲは、同一ＥＭＸ１プロトスペーサーをターゲティングするＴＡＬＥヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）のペアと同程度に効率的にゲノム開裂を媒介し得る。図３Ｃは、ＥＭＸ１をターゲティングするＴＡＬＥＮの設計を示す模式図を提供し、図３Ｄは、ＴＡＬＥＮおよびＣａｓ９の効率を比較するＳｕｒｖｅｙｏｒゲルを示す（ｎ＝３）。
【０７１１】
エラープローンＮＨＥＪ機序を通した哺乳動物細胞中のＣＲＩＳＰＲ媒介遺伝子編集を達成するための成分のセットを樹立したため、相同組換え（ＨＲ）、ゲノム中の正確な編集を作製するための高フィデリティ遺伝子修復経路を刺激するＣＲＩＳＰＲの能力を試験した。野生型ＳｐＣａｓ９は、ＮＨＥＪおよびＨＲの両方を通して修復され得る部位特異的ＤＳＢを媒介し得る。さらに、ＳｐＣａｓ９のＲｕｖＣ　Ｉ触媒ドメイン中のアスパラギン酸からアラニンへの置換（Ｄ１０Ａ）をエンジニアリングしてヌクレアーゼをニッカーゼに変換し（ＳｐＣａｓ９ｎ；図４Ａに説明）（例えば、Ｓａｐｒａｎａｕｓａｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，３９：９２７５；Ｇａｓｉｕｎａｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１０９：Ｅ２５７９参照）、その結果、ニック形成されたゲノムＤＮＡが高フィデリティ相同性組換え修復（ＨＤＲ）を受ける。Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイにより、ＳｐＣａｓ９ｎはＥＭＸ１プロトスペーサー標的におけるインデルを生成しないことを確認した。図４Ｂに説明されるとおり、ＥＭＸ１ターゲティングキメラｃｒＲＮＡとＳｐＣａｓ９との同時発現は標的部位中のインデルを生じさせた一方、ＳｐＣａｓ９ｎとの同時発現は生じさせなかった（ｎ＝３）。さらに、３２７個のアンプリコンのシーケンシングは、ＳｐＣａｓ９ｎにより誘導されるいかなるインデルも検出しなかった。同一の遺伝子座を選択し、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞をＥＭＸ１をターゲティングするキメラＲＮＡ、ｈＳｐＣａｓ９またはｈＳｐＣａｓ９ｎ、およびプロトスペーサー付近に制限部位のペア（ＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｈｅＩ）を導入するためのＨＲテンプレートにより同時形質移入することによりＣＲＩＳＰＲ媒介ＨＲを試験した。図４Ｃは、ＨＲ方針の模式的説明を、組換え場所の相対局在およびプライマーアニーリング配列（矢印）とともに提供する。ＳｐＣａｓ９およびＳｐＣａｓ９ｎは、実際、ＥＭＸ１遺伝子中へのＨＲテンプレートのインテグレーションを触媒した。標的領域のＰＣＲ増幅とそれに続くＨｉｎｄＩＩＩによる制限消化により、予測断片サイズ（図４Ｄに示される制限断片長多型ゲル分析中の矢印）に対応する開裂産物が明らかになり、ＳｐＣａｓ９およびＳｐＣａｓ９ｎは類似レベルのＨＲ効率を媒介した。本出願人らは、ゲノムアンプリコンのサンガーシーケンシングを使

用してＨＲをさらに確認した（図４Ｅ）。これらの結果は、哺乳動物ゲノム中のターゲティングされる遺伝子挿入を促進するためのＣＲＩＳＰＲの有用性を実証する。野生型ＳｐＣａｓ９の１４ｂｐ（スペーサーからの１２ｂｐおよびＰＡＭからの２ｂｐ）の標的特異性を考慮すると、ニッカーゼの利用可能性は、一本鎖分解物がエラープローンＮＨＥＪ経路のための基質でないため、オフターゲット改変の可能性を顕著に低減させ得る。

【０７１２】

アレイスペーサーを有するＣＲＩＳＰＲ遺伝子座の天然アーキテクチャーを模倣する発現構築物（図２Ａ）を構築して多重化配列ターゲティングの可能性を試験した。ＥＭＸ１およびＰＶＡＬＢターゲティングスペーサーのペアをコードする単一のＣＲＩＳＰＲアレイを使用して、両方の遺伝子座における効率的な開裂が検出された（図４Ｆ、ｃｒＲＮＡアレイの模式的設計および開裂の効率的な媒介を示すＳｕｒｖｅｙｏｒブロットの両方を示す）。１１９ｂｐにより間隔が空いているＥＭＸ１内の２つの標的に対するスペーサーを使用する同時ＤＳＢを通したより大きいゲノム領域のターゲティングされる欠失も試験し、１．６％の欠失効力（１８２個のアンプリコンのうち３つ；図４Ｇ）が検出された。このことは、ＣＲＩＳＰＲ系が単一ゲノム内の多重化編集を媒介し得ることを実証する。

【０７１３】

実施例２

ＣＲＩＳＰＲ系改変および代替例

配列特異的ＤＮＡ開裂をプログラミングするためにＲＮＡを使用する技能は、種々の研究および産業用途のための新たなクラスのゲノムエンジニアリングツールを定義する。ＣＲＩＳＰＲ系のいくつかの態様は、ＣＲＩＳＰＲターゲティングの効率および多用途性を増加させるようにさらに改善することができる。最適なＣａｓ９活性は、哺乳動物核中に存在するものよりも高いレベルにおけるフリーMg^{2+}の利用可能性に依存し得（例えば、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，２０１２，Ｓｃｉｅｎｃｅ，３３７：８１６参照）、プロトスペーサーのすぐ下流のＮＧＧモチーフについての優先性は、ヒトゲノム中で平均１２ｂｐごとでターゲティング能を制限する（図９、ヒト染色体配列のプラスおよびマイナス鎖の両方を評価）。これらの拘束の一部は、微生物メタゲノムにわたるＣＲＩＳＰＲ遺伝子座の多様性を利用することにより克服することができる（例えば、Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，９：４６７参照）。他のＣＲＩＳＰＲ遺伝子座を、実施例１に記載のものと同様の方法により哺乳動物細胞環境中に移植することができる。例えば、図１０は、ＣＲＩＳＰＲ媒介ゲノム編集を達成するための哺乳動物細胞中の異種発現のためのストレプトコッカス・サーモフィラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＬＭＤ－９のＣＲＩＳＰＲ１からのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系の適応を説明する。図１０Ａは、Ｓ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＬＭＤ－９のＣＲＩＳＰＲ１の模式的説明を提供する。図１０Ｂは、Ｓ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ系のための発現系の設計を説明する。ヒトコドン最適化ｈＳｔＣａｓ９を、構成的ＥＦ１αプロモーターを使用して発現させる。ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡの成熟バージョンを、Ｕ６プロモーターを使用して発現させて正確な転写開始を促進する。成熟ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡからの配列を説明する。ｃｒＲＮＡ配列中の小文字「ａ」により示される単一塩基を使用してＲＮＡｐｏｌＩＩＩ転写ターミネーターとして機能するポリＵ配列を除去する。図１０Ｃは、ヒトＥＭＸ１遺伝子座ターゲティングするガイド配列を示す模式図を提供する。図１０Ｄは、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを使用する標的遺伝子座中のｈＳｔＣａｓ９媒介開裂の結果を示す。ＲＮＡガイドスペーサー１および２は、それぞれ１４％および６．４％を誘導した。これらの２つのプロトスペーサー部位における生物学的複製物にわたる開裂活性の統計分析も図５に提供する。図１４は、ヒトＥＭＸ１遺伝子座中のＳ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ系の追加のプロトスペーサーおよび対応するＰＡＭ配列標的の模式図を提供する。２つのプロトスペーサー配列を強調し、ＮＮＡＧＡＡＷモチーフを満たすそれらの対応するＰＡＭ配列を対応する強調配列に対して３’側で下線を付けることにより示す。両方のプロトスペーサーは、アンチ

センス鎖をターゲティングする。
【０７１４】
実施例３
試料標的配列選択アルゴリズム
規定のＣＲＩＳＰＲ酵素についての所望のガイド配列長およびＣＲＩＳＰＲモチーフ配列（ＰＡＭ）に基づきインプットＤＮＡ配列の両方の鎖上の候補ＣＲＩＳＰＲ標的配列を同定するためのソフトウェアプログラムを設計する。例えば、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）からのＣａｓ９についての標的部位は、ＰＡＭ配列ＮＧＧを用いて、インプット配列およびインプットの逆相補鎖の両方の上の５’－Ｎ$_{x}$－ＮＧＧ－３’を探索することにより同定することができる。同様に、Ｓ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ１のＣａｓ９についての標的部位は、ＰＡＭ配列ＮＮＡＧＡＡＷを用いて、インプット配列およびインプットの逆相補鎖の両方の上の５’－Ｎ$_{x}$－ＮＮＡＧＡＡＷ－３’を探索することにより同定することができる。同様に、Ｓ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ３のＣａｓ９についての標的部位は、ＰＡＭ配列ＮＧＧＮＧを用いて、インプット配列およびインプットの逆相補鎖の両方の上の５’－Ｎ$_{x}$－ＮＧＧＮＧ－３’を探索することにより同定することができる。Ｎ$_{x}$中の値「ｘ」は、プログラムにより固定し、または使用者により規定することができ、例えば、２０である。
【０７１５】
ＤＮＡ標的部位のゲノム中の複数の発生は、非特異的ゲノム編集をもたらし得るため、全ての潜在的な部位を同定した後、プログラムは配列が関連参照ゲノム中で出現する回数に基づき配列をフィルタリング除去する。配列特異性が「シード」配列、例えば、ＰＡＭ配列自体を含め、ＰＡＭ配列から５’側の１１～１２ｂｐにより決定されるそれらのＣＲＩＳＰＲ酵素について、フィルタリングステップはシード配列に基づき得る。したがって、追加のゲノム遺伝子座における編集を回避するため、結果を関連ゲノム中のシード：ＰＡＭ配列の発生数に基づきフィルタリングする。使用者に、シード配列の長さを選択させることができる。使用者に、フィルタ通過の目的のためにゲノム中のシード：ＰＡＭ配列の発生数を規定させることもできる。デフォルトは、ユニーク配列をスクリーニングすることである。フィルトレーションレベルは、シード配列の長さおよびゲノム中の配列の発生数の両方を変えることにより変更する。プログラムは、さらにまたは代替的に、同定された標的配列の逆相補鎖を提供することにより、報告された標的配列に相補的なガイド配列の配列を提供し得る。
【０７１６】
配列選択を最適化する方法およびアルゴリズムのさらなる詳細は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第６１／０６４，７９８号明細書（代理人整理番号４４７９０．１１．２０２２；Ｂｒｏａｄ参照番号ＢＩ－２０１２／０８４）に見出すことができる。
【０７１７】
実施例４
複数のキメラｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡハイブリッドの評価
本実施例は、異なる長さの野生型ｔｒａｃｒＲＮＡ配列を取り込むｔｒａｃｒ配列を有するキメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ；ガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列、およびｔｒａｃｒ配列を単一転写物中で含む）について得られた結果を記載する。図１６ａは、キメラＲＮＡおよびＣａｓ９のためのバイシストロニック発現ベクターの模式図を説明する。Ｃａｓ９はＣＢｈプロモーターによりドライブされ、キメラＲＮＡはＵ６プロモーターによりドライブされる。キメラガイドＲＮＡは、からなる。示される種々の位置においてトランケートされたｔｒａｃｒ配列（下方の鎖の最初の「Ｕ」から転写物の末端に及ぶ）に結合している２０ｂｐのガイド配列（Ｎ）からなる。ガイドおよびｔｒａｃｒ配列は、ｔｒａｃｒメイト配列ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡと、それに続くループ配列ＧＡＡＡにより離隔している。ヒト遺伝子座ＥＭＸ１およびＰＶＡＬＢ遺伝子座におけるＣａｓ９媒介インデ

ルについてのＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイの結果を、それぞれ図１６ｂおよび１６ｃに説明する。矢印は、予測ＳＵＲＶＥＹＯＲ断片を示す。ｃｈｉＲＮＡをそれらの「＋ｎ」表記により示し、ｃｒＲＮＡは、ガイドおよびｔｒａｃｒ配列が別個の転写物として発現されるハイブリッドＲＮＡを指す。トリプリケートで実施されたこれらの結果の定量を、図１７ａおよび１７ｂにヒストグラムにより示し、それぞれ図１６ｂおよび１６ｃに対応する（「Ｎ．Ｄ．」は、インデルが検出されなかったことを示す）。プロトスペーサーＩＤおよびそれらの対応するゲノム標的、プロトスペーサー配列、ＰＡＭ配列、および鎖局在を表Ｄに提供する。ガイド配列は、ハイブリッド系における別個の転写物の場合、プロトスペーサー配列全体に相補的であるように、またはキメラＲＮＡの場合、下線部にのみ相補的であるように設計した。

【０７１８】

【表３０】

表D:

プロトスペーサーID	ゲノム標的	プロトスペーサー配列(5'から3')	PAM	鎖
1	*EMX1*	GGACATCGATGTCACCTCCAATGACTAGGG	TGG	+
2	*EMX1*	CATTGGAGGTGACATCGATGTCCTCCCCAT	TGG	-
3	*EMX1*	GGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GGG	+
4	*PVALB*	GGTGGCGAGAGGGGCCGAGATTGGGTGTTC	AGG	+
5	*PVALB*	ATGCAGGAGGGTGGCGAGAGGGGCCGAGAT	TGG	+

(それぞれ配列番号_____~_____)

【０７１９】

ガイド配列を最適化するためのさらなる詳細は、米国仮特許出願第６１／８３６，１２７号明細書（代理人整理番号４４７９０．０８．２０２２；Ｂｒｏａｄ参照番号ＢＩ－２０１３／００４Ｇ）（参照により本明細書に組み込まれる）を参照することができる。

【０７２０】

最初に、ヒトＨＥＫ２９３ＦＴ細胞中のＥＭＸ１遺伝子座内の３つの部位をターゲティングした。それぞれのｃｈｉＲＮＡのゲノム改変効率は、ＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）および非相同末端結合（ＮＨＥＪ）ＤＮＡ損傷修復経路によるその後続の修復から生じる突然変異を検出するＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイを使用して評価した。ｃｈｉＲＮＡ（＋ｎ）と表記される構築物は、野生型ｔｒａｃｒＲＮＡの最大＋ｎ個のヌクレオチドがキメラＲＮＡ構築物中に含まれることを示し、ｎについては４８、５４、６７、および８５の値が使用される。野生型ｔｒａｃｒＲＮＡのより長い断片を含有するキメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ（＋６７）およびｃｈｉＲＮＡ（＋８５））は、３つ全てのＥＭＸ１標的部位におけるＤＮＡ開裂を媒介し、特にｃｈｉＲＮＡ（＋８５）は、ガイドおよびｔｒａｃｒ配列を別個の転写物中で発現する対応するｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡハイブリッドよりも顕著に高いレベルのＤＮＡ開裂を実証した（図１６ｂおよび１７ａ）。ハイブリッド系（別個の転写物として発現されるガイド配列およびｔｒａｃｒ配列）を検出可能な開裂を生じなかったＰＶＡＬＢ遺伝子座中の２つの部位も、ｃｈｉＲＮＡを使用してターゲティングした。ｃｈｉＲＮＡ（＋６７）およびｃｈｉＲＮＡ（＋８５）は、２つのＰＶＡＬＢプロトスペーサーにおける顕著な開裂を媒介し得た（図１６ｃおよび１７ｂ）。ＥＭＸ１およびＰＶＡＬＢ遺伝子座中の５つ全ての標的について、ｔｒａｃｒ配列長さの増加に伴うゲノム改変効率の一貫した増加が観察された。いかなる理論によっても拘束されるものではないが、ｔｒａｃｒＲＮＡの３’末端により形成される二次構造は、ＣＲＩＳＰＲ複合体形成の比率の向上における役割を担い得る。

【０７２１】

実施例５：Ｃａｓ９多様性

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、細菌から古細菌にわたる多様な種により用いられる侵入外因性ＤＮＡに対する適応免疫機序である。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系は、ＣＲＩＳ

ＰＲ遺伝子座中への外来ＤＮＡの「獲得」を担うタンパク質をコードする遺伝子のセット、およびＤＮＡ開裂機序の「実行」をコードする遺伝子のセットからなり；これらは、ＤＮＡヌクレアーゼ（Ｃａｓ９）、非コードトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）、およびダイレクトリピートによりフランキングされている外来ＤＮＡ由来スペーサーのアレイ（ｃｒＲＮＡ）を含む。Ｃａｓ９による成熟時、ｔｒａｃＲＮＡおよびｃｒＲＮＡ二本鎖は、Ｃａｓ９ヌクレアーゼをスペーサーガイド配列により規定される標的ＤＮＡ配列にガイドし、開裂に要求され、それぞれのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に特異的な標的ＤＮＡ中の短鎖配列モチーフ付近のＤＮＡの二本鎖切断を媒介する。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、細菌界全体にわたり見出されており、Ｃａｓ９タンパク質配列およびサイズ、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡダイレクトリピート配列、それらのエレメントのゲノム構成、および標的開裂のためのモチーフ要件は高度に多様である。ある種は、複数の区別されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を有し得る。

【０７２２】

本出願人らは、公知のＣａｓ９との配列相同性および公知のサブドメイン、例として、ＨＮＨエンドヌクレアーゼドメインおよびＲｕｖＣエンドヌクレアーゼドメイン［Ｅｕｇｅｎｅ　ＫｏｏｎｉｎおよびＫｉｒａ　Ｍａｋａｒｏｖａからの情報］とオルソロガスな構造に基づき同定された細菌種から２０７個の推定Ｃａｓ９を評価した。このセットのタンパク質配列保存に基づく系統発生分析により、大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つの群および小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つの群を含むＣａｓ９の５つのファミリーが明らかになった（図１９および２０Ａ～Ｆ）。

【０７２３】

Ｃａｓ９およびニッカーゼまたはＤＮＡ結合タンパク質に転換するＣａｓ９酵素の突然変異および変化した機能を有するそれの使用のさらなる詳細は、米国仮特許出願第６１／８３６，１０１号明細書および同第６１／８３５，９３６号明細書（それぞれ代理人整理番号４４７９０．０９．２０２２および４７９０．０７．２０２２およびＢｒｏａｄ参照番号ＢＩ－２０１３／００４ＥおよびＢＩ－２０１３／００４Ｆ）（参照により本明細書に組み込まれる）を参照することができる。

【０７２４】

実施例６：Ｃａｓ９オルソログ

本出願人らは、関連性のあるＰＡＭ配列および対応するキメラガイドＲＮＡを同定するためＣａｓ９オルソログを分析した。拡張したＰＡＭセットを有することにより、全ゲノムにわたるより幅広いターゲティングが提供され、またユニークな標的部位の数が大幅に増加し、かつゲノムにおいて高い特異性レベルで新規Ｃａｓ９を同定できる可能性がもたらされる。

【０７２５】

Ｃａｓ９オルソログの特異性は、各Ｃａｓ９がガイドＲＮＡとそのＤＮＡ標的との間のミスマッチを許容する能力を試験することにより評価し得る。例えば、ガイドＲＮＡにおける突然変異が開裂効率に及ぼす効果を試験することにより、ＳｐＣａｓ９の特異性が特徴付けられている。ガイド配列と標的ＤＮＡとの間の単一または複数のミスマッチを含むガイドＲＮＡのライブラリが作製された。これらの知見に基づき、以下の指針に基づきＳｐＣａｓ９の標的部位を選択することができる：

【０７２６】

特定の遺伝子の編集に対するＳｐＣａｓ９の特異性を最大化するため、目的の遺伝子座内の標的部位は、潜在的な「オフターゲット」ゲノム配列が以下の４つの制約条件に従うように選択しなければならない：まず第一に、それらの配列の後に５’－ＮＧＧまたはＮＡＧ配列のいずれかを有するＰＡＭが続いてはならない。第二に、標的配列とのそれらの配列の大域的な配列類似性が最小化されなければならない。第三に、最大数のミスマッチがＰＡＭ－オフターゲット部位の近位領域内になければならない。最後に、最大数のミスマッチが連続しているかまたは離れていても４塩基未満でなければならない。

【０７２７】

同様の方法を用いて他のＣａｓ９オルソログの特異性を評価し、標的種のゲノム内にある特定の標的部位を選択するための基準を確立することができる。既述のとおり、このセットのタンパク質配列保存に基づく系統発生解析から、３群の大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）および２群の小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）を含む５つのＣａｓ９ファミリーが明らかとなった（図１９および図２０Ａ～図２０Ｆを参照）。Ｃａｓオルソログに関するさらなる詳細は、参照により本明細書に組み込まれる米国仮特許出願第６１／８３６，１０１号明細書および同第６１／８３５，９３６号明細書（それぞれ代理人整理番号４４７９０．０９．２０２２および４７９０．０７．２０２２およびＢｒｏａｄ参照番号ＢＩ－２０１３／００４ＥおよびＢＩ－２０１３／００４Ｆ）を参照することができる。

【０７２８】

実施例７：クローニングおよび送達を単純化する方法論的改良。

プラスミド上のＵ６プロモーターおよびガイドＲＮＡをコードするよりむしろ、本出願人らはＵ６プロモーターをＤＮＡオリゴと共に増幅してガイドＲＮＡを付加した。得られたＰＣＲ産物を細胞に形質移入してガイドＲＮＡの発現をドライブすることができる。

【０７２９】

Ｕ６プロモーター：：ヒトＥｍｘ１遺伝子座を標的にするガイドＲＮＡからなるＰＣＲ産物の生成を可能にする例示的プライマー対：

フォワードプライマー：

【化２】

AAACTCTAGAgagggcctatttcccatgattc (配列番号__)

リバースプライマー（ガイドＲＮＡ（下線）を有する）：

【化３】

acctctagAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGC
CTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTTGTTTCCAAAACAGCATAGCTCTAAAACCCC
TAGTCATTGGAGGTGACGGTGTTTCGTCCTTTCCACaag (配列番号__)

【０７３０】

実施例８：活性を向上させる方法論的改良：

真核細胞でガイドＲＮＡを発現させるためにｐｏｌ３プロモーター、詳細にはＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ（例えばＵ６またはＨ１プロモーター）を使用するよりむしろ、本出願人らは真核細胞でＴ７ポリメラーゼを発現させることにより、Ｔ７プロモーターを使用してガイドＲＮＡの発現をドライブする。

【０７３１】

この系の一例は、３つのＤＮＡ断片の導入を伴い得る：

１．Ｃａｓ９の発現ベクター

２．Ｔ７ポリメラーゼの発現ベクター

３．Ｔ７プロモーターと融合したガイドＲＮＡを含む発現ベクター

【０７３２】

実施例９：Ｃａｓ９の毒性を低下させる方法論的改良：ｍＲＮＡ形態のＣａｓ９の送達。

Ｃａｓ９をｍＲＮＡの形態で送達することにより、細胞でのＣａｓ９の一過性発現が可能となり、毒性が低下する。例えば、ヒト化ＳｐＣａｓ９は、以下のプライマー対を使用して増幅し得る：

フォワードプライマー（インビトロ転写用にＴ７プロモーターを付加するため）：

【化４】

TAATACGACTCACTATAGGAAGTGCGCCACCATGGCCCCAAAGAAGAAGCGG (配列番号__)

リバースプライマー（ポリＡテールを付加するため）：

【化５】

GGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTttcttaCTTTTTCTTTTTTGCCTGGCCG (配列番号__)

【０７３３】

本出願人らは、真核細胞におけるガイドＲＮＡ発現をドライブするようにＲＮＡまたはＤＮＡカセットの形態のいずれかのガイドＲＮＡと共にＣａｓ９　ｍＲＮＡを細胞に形質移入する。

【０７３４】

実施例１０：Ｃａｓ９の毒性を低下させる方法論的改良：誘導性プロモーターの使用

本出願人らは、ゲノム改変を実行するのに必要となった場合に限りＣａｓ９発現を一過性にオンにする。誘導性システムの例には、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Ｔｅｔ－ＯｎまたはＴｅｔ－Ｏｆｆ）、小分子２ハイブリッド転写活性化システム（ＦＫＢＰ、ＡＢＡ等）、または光誘導性システム（フィトクロム、ＬＯＶドメイン、またはクリプトクロム）が含まれる。

【０７３５】

実施例１１：インビボ適用のためのＣａｓ９系の改良

本出願人らは、低分子量のＣａｓ９に対してメタゲノム検索を行った。多くのＣａｓ９ホモログはかなり大きい。例えばＳｐＣａｓ９は約１３６８アミノ酸長であり、これは大き過ぎるため送達用のウイルスベクターへのパッケージングが容易でない。ＧｅｎＢａｎｋに寄託されている配列からＣａｓ９ホモログの長さ分布を表すグラフが作成される（図２３）。配列の中には誤って注釈されているものもあり、従って各長さについての正確な度数は必ずしも正しいとは限らない。それでもなお、これによりＣａｓ９タンパク質の分布の概観が得られ、より短いＣａｓ９ホモログの存在が示唆される。

【０７３６】

本出願人らは、コンピュータ解析により、細菌株カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）に１０００アミノ酸未満のＣａｓ９タンパク質が２つあることを見出した。カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）由来の１つのＣａｓ９の配列を以下に提供する。この長さでは、ＣｊＣａｓ９は、初代細胞へのおよび動物モデルにおけるインビボでのロバストな送達のためＡＡＶ、レンチウイルス、アデノウイルス、および他のウイルスベクターに容易にパッケージングすることができる。本発明の好ましい実施形態では、黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）由来のＣａｓ９タンパク質が使用される。

【０７３７】

＞カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）Ｃａｓ９（ＣｊＣａｓ９）

【化６】

MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLAR
SARKRLARRKARLNHLKHLIANEFKLNYEDYQSFDESLAKAYKGSLISPYELRFRALN
ELLSKQDFARVILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYQSVGEYLYK
EYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYERCIAQSFLKDELKLIFKKQREFGFSFSKKFEEEVL
SVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRIINLLNNLKNTEGIL
YTKDDLNALLNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGTYFIEFKKYKEFIKAL
GEHNLSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQIDSLSKLEFKDHLNISFKAL
KLVTPLMLEGKKYDEACNELNLKVAINEDKKDFLPAFNETYYKDEVTNPVVLRAIKE
YRKVLNALLKKYGKVHKINIELAREVGKNHSQRAKIEKEQNENYKAKKDAELECEK
LGLKINSKNILKLRLFKEQKEFCAYSGEKIKISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSFDDSYMN
KVLVFTKQNQEKLNQTPFEAFGNDSAKWQKIEVLAKNLPTKKQKRILDKNYKDKEQ
KNFKDRNLNDTRYIARLVLNYTKDYLDFLPLSDDENTKLNDTQKGSKVHVEAKSGM
LTSALRHTWGFSAKDRNNHLHHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAK
KISELDYKNKRKFFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFYQS
YGGKEGVLKALELGKIRKVNGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFALK
VLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYEFCFSLYKDSLILIQTKDMQEPEFVYYNAFTSS
TVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVFEKYIVSALGEVTKA
EFRQREDFKK (配列番号__)

【０７３８】

このＣｊＣａｓ９に対する推定ｔｒａｃｒＲＮＡエレメントは以下である：

【化７】

TATAATCTCATAAGAAATTTAAAAAGGGACTAAAATAAAGAGTTTGCG
GGACTCTGCGGGGTTACAATCCCCTAAAACCGCTTTTAAAATT (配列番号__)

ダイレクトリピート配列は以下である：

【化８】

ATTTTACCATAAAGAAATTTAAAAAGGGACTAAAAC (配列番号__)

ＣｊＣａｓ９に対するキメラガイドＲＮＡの例は以下である：

【化９】

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGUCCCGAAAGGGACUAAAAU
AAAGAGUUUGCGGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU (配列
番号_)

【０７３９】

実施例１２：Ｃａｓ９最適化

機能強化のためまたは新規機能を開発するため、本出願人らは異なるＣａｓ９ホモログの断片を組み合わせることにより、キメラＣａｓ９タンパク質を作成する。例えば、２つの例示的なキメラＣａｓ９タンパク質：

例えば、本出願人らは、Ｓｔ１Ｃａｓ９（このタンパク質からの断片は太字とする）の

Ｎ末端を、ＳｐＣａｓ９（このタンパク質からの断片には下線を引く）のＣ末端と融合した。

＞Ｓｔ１（Ｎ）Ｓｐ（Ｃ）Ｃａｓ９

【化１０】

MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTN
RQGRRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEE
LFIALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLERY
QTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEFINR
YLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEFRAAK
ASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAKLFKYIAK
LLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETLDKLAYVLT
LNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGWHNFSVKLMME
LIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIYNPVVAKSVRQAIK
IVNAAIKEYGDFDNIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE
NTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT
RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDK
AGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQ
FYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV
LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSV
LVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS
LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNL
GAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号__)

＞Ｓｐ（Ｎ）Ｓｔ１（Ｃ）Ｃａｓ９

【化１１】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGA
LLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVE
EDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRG
HFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENL
IAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIG
DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ
QLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLL
RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN
SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARE**TNEDDEKKAIQKIQKANKDEKDAAMLKAANQYNGKA**
ELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYTGKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSI
TFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNK
KKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLVDTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVR
GQFTSQLRRHWGIEKTRDTYHHHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEDQL
LDIETGELISDDEYKESVFKAPYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATI
YATRQAKVGKDKADETYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQT
FEKVIEPILENYPNKQINEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYY
DSKLGNHIDITPKDSNNKVVLQSVSPWRADVYFNKTTGKYEILGLKYADLQFEKG
TGTYKISQEKYNDIKKKEGVDSDSEFKFTLYKNDLLLVKDTETKEQQLFRFLSRT
MPKQKHYVELKPYDKQKFEGGEALIKVLGNVANSGQCKKGLGKSNISIYKVRTD
VLGNQHIIKNEGDKPKLDF (配列番号__)

【０７４０】

キメラＣａｓ９を作製することの利益には、以下が含まれる：

毒性が低下する

真核細胞における発現が向上する

特異性が強化される

タンパク質の分子量が低下し、異なるＣａｓ９ホモログからの最も小さいドメインを組み合わせることによりタンパク質が小さくなる。

ＰＡＭ配列要件の変更

【０７４１】

実施例１３：汎用ＤＮＡ結合タンパク質としてのＣａｓ９の利用

本出願人らは、ＤＮＡ標的の両鎖の開裂に関与する２つの触媒ドメイン（Ｄ１０およびＨ８４０）を突然変異させることにより、Ｃａｓ９を汎用ＤＮＡ結合タンパク質として使用した。標的遺伝子座における遺伝子転写を上方制御するため、本出願人らはＣａｓ９に転写活性化ドメイン（ＶＰ６４）を融合した。本出願人らは、転写因子活性化強度が標的で費やされる時間の関数であるため、Ｃａｓ９－ＶＰ６４融合タンパク質の強力な核局在

を認めることが重要であるという仮説を立てた。従って、本出願人らは一組のＣａｓ９－ＶＰ６４－ＧＦＰ構築物をクローニングし、それらを２９３細胞に形質移入し、形質移入後１２時間でその局在を蛍光顕微鏡下で評価した。

【０７４２】

嵩高いＧＦＰの存在が妨げとなることなく構築物を機能的に試験するため、同じ構築物を、直接的な融合ではなく、２Ａ－ＧＦＰとしてクローニングした。Ｓｏｘ２遺伝子座は細胞の再プログラム化に有用となり得るとともに、この遺伝子座はＴＡＬＥ－ＴＦ媒介性転写活性化の標的として既に検証されているため、本出願人らはＳｏｘ２遺伝子座をＣａｓ９トランス活性化因子による標的とすることにした。Ｓｏｘ２遺伝子座について、本出願人らは転写開始部位（ＴＳＳ）近傍の８つの標的を選んだ。各標的は２０ｂｐ長であり、隣接するＮＧＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を有した。各Ｃａｓ９－ＶＰ６４構築物を各ＰＣＲ生成キメラｃｒｉｓｐｒ　ＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）と２９３細胞に同時形質移入した。形質移入後７２時間でＲＴ－ｑＰＣＲを使用して転写活性化を評価した。

【０７４３】

転写活性化因子をさらに最適化するため、本出願人らは、ｃｈｉＲＮＡ（Ｓｏｘ２．１およびＳｏｘ２．５）とＣａｓ９（ＮＬＳ－ＶＰ６４－ＮＬＳ－ｈＳｐＣａｓ９－ＮＬＳ－ＶＰ６４－ＮＬＳ）との比率をタイトレートし、２９３細胞に形質移入し、およびＲＴ－ｑＰＣＲを使用して定量化した。これらの結果は、Ｃａｓ９を汎用ＤＮＡ結合ドメインとして使用して標的遺伝子座における遺伝子転写を上方制御し得ることを示している。

【０７４４】

本出願人らは、第２世代の構築物を設計した（下表）。

【０７４５】

【表３１】

pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-VP64-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A)-NLS
pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-VP64-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A)
pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-VP64-NLS-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A)
pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A)-NLS
pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A)
pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A)

【０７４６】

本出願人らはこれらの構築物を使用して転写活性化（ＶＰ６４融合構築物）および抑制（Ｃａｓ９のみ）をＲＴ－ｑＰＣＲにより評価する。本出願人らは抗Ｈｉｓ抗体を使用して各構築物の細胞局在を評価し、Ｓｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイを使用してヌクレアーゼ活性を評価し、およびゲルシフトアッセイを使用してＤＮＡ結合親和性を評価する。本発明の好ましい実施形態において、ゲルシフトアッセイはＥＭＳＡゲルシフトアッセイである。

【０７４７】

実施例１４：Ｃａｓ９トランスジェニックおよびノックインマウス

Ｃａｓ９ヌクレアーゼを発現するマウスを作成するため、本出願人らは２つの一般的戦略、トランスジェニックとノックインとを提示する。これらの戦略は、目的とする任意の他のモデル生物の作成、例えばラットに適用し得る。これらの一般的戦略の各々について、本出願人らは、構成的に活性なＣａｓ９と、条件的に発現する（Ｃｒｅリコンビナーゼ依存性の）Ｃａｓ９とを作製する。構成的に活性なＣａｓ９ヌクレアーゼは以下のコンテクストで発現する：ｐＣＡＧ－ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＮＬＳ－Ｐ２Ａ－ＥＧＦＰ－ＷＰＲＥ－ｂＧＨｐｏｌｙＡ。ｐＣＡＧはプロモーターであり、ＮＬＳは核局在化シグナルであり

、Ｐ２Ａはペプチド開裂配列であり、ＥＧＦＰは高感度緑色蛍光タンパク質であり、ＷＰＲＥはウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメントであり、およびｂＧＨｐｏｌｙＡはウシ成長ホルモンポリＡシグナル配列である（図２５Ａ～図２５Ｂ）。条件的バージョンは、プロモーターの後ろおよびＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＮＬＳの前に１つのさらなる終止カセットエレメント、ｌｏｘＰ－ＳＶ４０　ｐｏｌｙＡ　ｘ３－ｌｏｘＰを有する（すなわち　ｐＣＡＧ－ｌｏｘＰ－ＳＶ４０ｐｏｌｙＡｘ３－ｌｏｘＰ－ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＮＬＳ－Ｐ２Ａ－ＥＧＦＰ－ＷＰＲＥ－ｂＧＨｐｏｌｙＡ）。重要な発現エレメントは図２６のとおり可視化することができる。構成的構築物は開発全体を通して全ての細胞型で発現しなければならないが、条件的構築物は、同じ細胞がＣｒｅリコンビナーゼを発現するときに限りＣａｓ９発現を可能にし得る。この後者のバージョンは、Ｃｒｅが組織特異的プロモーターの発現下にあるときＣａｓ９の組織特異的発現を可能にし得る。さらに、ＣｒｅをＴＥＴ　ｏｎまたはｏｆｆシステムなどの誘導性プロモーターの発現下に置くことにより、Ｃａｓ９発現を成体マウスで誘導することができる。

【０７４８】

Ｃａｓ９構築物の検証：各プラスミドを３つの方法で機能検証した：１）２９３細胞における一過性形質移入と、続くＧＦＰ発現の確認；２）２９３細胞における一過性形質移入と、続くＰ２Ａ配列を認識する抗体を使用した免疫蛍光法；および３）一過性形質移入と、続くＳｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイ。２９３細胞は、目的の細胞に応じて２９３ＦＴ細胞または２９３　Ｔ細胞であってもよい。好ましい実施形態では、細胞は２９３ＦＴ細胞である。Ｓｕｒｖｅｙｏｒの結果は、条件的および構成的構築物についてゲルのそれぞれ最上列および最下列で実施した。各々を、ｈＥＭＸ１遺伝子座を標的にするキメラＲＮＡ（キメラＲＮＡ　ｈＥＭＸ１．１）の存在下および非存在下で試験した。結果は、この構築物がキメラＲＮＡ（および条件的の場合にはＣｒｅ）の存在下においてのみｈＥＭＸ１遺伝子座のターゲティングに成功し得ることを示している。ゲルを定量化した。結果は３試料の平均切断効率および標準偏差として提供する。

【０７４９】

トランスジェニックＣａｓ９マウス：構築物を有するトランスジェニックマウスを作成するため、本出願人らは純粋な線状ＤＮＡを偽妊娠ＣＢ５６雌由来の接合体の前核に注入する。ファウンダーを同定し、遺伝子型を決定し、ＣＢ５７マウスと戻し交配させる。構築物がクローニングが成功し、これはサンガーシーケンシングによって確認された。

【０７５０】

ノックインＣａｓ９マウス：Ｃａｓ９ノックインマウスを作成するため、本出願人らは同じ構成的および条件的構築物をＲｏｓａ２６遺伝子座にターゲティングする。本出願人らはこれを、以下のエレメントを有するＲｏｓａ２６ターゲティングベクターに各々をクローニングすることにより行った：Ｒｏｓａ２６ショート相同性アーム－構成的／条件的Ｃａｓ９発現カセット－ｐＰＧＫ－Ｎｅｏ－Ｒｏｓａ２６ロング相同性アーム－ｐＰＧＫ－ＤＴＡ。ｐＰＧＫは、ＰＧＫによりドライブされる、ネオマイシンに対する耐性を付与するポジティブ選択マーカーＮｅｏ、１ｋｂショートアーム、４．３ｋｂロングアーム、およびネガティブ選択ジフテリア毒素（ＤＴＡ）に対するプロモーターである。

【０７５１】

２つの構築物をＲ１　ｍＥＳＣにエレクトロポレートし、２日間成長させておいた後、ネオマイシン選択を適用した。５～７日目まで生存していた個々のコロニーを取り、個別のウェルで成長させた。５～７日後にコロニーを回収し、半分は凍結し、残りの半分は遺伝子タイピングに使用した。遺伝子タイピングはゲノムＰＣＲにより行い、ここでは一方のプライマーをドナープラスミド（ＡｔｔｐＦ）内にアニールし、他方のプライマーをショート相同性アーム（Ｒｏｓａ２６－Ｒ）の外側にアニールした。条件的ケース用に回収した２２個のコロニーのうち、７個が陽性であった（左）。構成的ケース用に回収した２７個のコロニーのうち、陽性は０個であった（右）。Ｃａｓ９がｍＥＳＣにおいてあるレベルの毒性を引き起こし、そのため陽性クローンがなかったものと思われる。これを試験するため、本出願人らは正しくターゲティングされる条件的Ｃａｓ９細胞にＣｒｅ発現プ

ラスミドを導入し、培養下で何日も経った後にも極めて低毒性であることを認めた。正しくターゲティングされる条件的Ｃａｓ９細胞におけるＣａｓ９のコピー数の低下（細胞当たり１～２コピー）は、安定発現および相対的な無細胞毒性を可能にするのに十分である。さらに、このデータはＣａｓ９コピー数が毒性を決定することを示している。エレクトロポレーション後、各細胞は数コピーのＣａｓ９を得るはずで、これが、構成的Ｃａｓ９構築物の場合に陽性コロニーが認められなかった理由であると思われる。これは、条件的Ｃｒｅ依存戦略を利用すると毒性の低下が示されるはずであるという強力なエビデンスを提供する。本出願人らは、正しくターゲティングされる細胞を胚盤胞に注入して雌マウスに移植する。キメラを同定し、戻し交配させる。ファウンダーを同定し、遺伝子型を決定する。

【０７５２】

条件的Ｃａｓ９マウスの有用性：本出願人らは、２９３細胞において、Ｃｒｅとの同時発現によりＣａｓ９条件的発現構築物を活性化し得ることを示している。本出願人らはまた、Ｃｒｅが発現するとき正しくターゲティングされるＲ１　ｍＥＳＣが活性Ｃａｓ９を有し得ることも示す。Ｃａｓ９の後にはＰ２Ａペプチド開裂配列と、次にＥＧＦＰが続くため、本出願人らはＥＧＦＰを観察することにより発現の成功を特定する。この同じ概念が、条件的Ｃａｓ９マウスを極めて有用にするものである。本出願人らはそれらの条件的Ｃａｓ９マウスを、Ｃｒｅを遍在的に発現するマウス（ＡＣＴＢ－Ｃｒｅ系統）と交配させることができ、あらゆる細胞でＣａｓ９を発現するマウスが得られ得る。胎仔または成体マウスにおいてゲノム編集を誘導するために必要なことはキメラＲＮＡの送達のみであるはずである。興味深いことに、条件的Ｃａｓ９マウスを組織特異的プロモーターの制御下でＣｒｅを発現するマウスと交配させる場合、同様にＣｒｅを発現する組織にのみＣａｓ９が存在するはずである。この手法を用いて正確な組織に限ったゲノムの編集を、同組織にキメラＲＮＡを送達することにより行い得る。

【０７５３】

実施例１５：Ｃａｓ９の多様性およびキメラＲＮＡ

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、細菌および古細菌にわたる多様な種により用いられる侵入外来性ＤＮＡに対する適応免疫機構である。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座への外来ＤＮＡの「獲得」に関与するタンパク質をコードする一組の遺伝子、ならびにＤＮＡ開裂機構の「遂行」をコードする一組の遺伝子からなる；これらには、ＤＮＡヌクレアーゼ（Ｃａｓ９）、非コードトランス活性化ｃｒ－ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）、および外来ＤＮＡ由来のスペーサーにダイレクトリピートが隣接したアレイ（ｃｒＲＮＡ）が含まれる。Ｃａｓ９による成熟時、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡ二重鎖が、スペーサーガイド配列により特定されるＣａｓ９ヌクレアーゼを標的ＤＮＡ配列にガイドし、開裂に必要でかつ各ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に特異的な、標的ＤＮＡの短鎖配列モチーフ近傍でのＤＮＡの二本鎖切断を媒介する。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は細菌界全体にわたり見られ、Ｃａｓ９タンパク質配列およびサイズ、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡダイレクトリピート配列、これらのエレメントのゲノム構成、および標的開裂のモチーフ要件の点で高度に多様である。１つの種が複数の異なるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を有し得る。

【０７５４】

本出願人らは、既知のＣａｓ９との配列相同性および既知のサブドメイン、例えばＨＮＨエンドヌクレアーゼドメインおよびＲｕｖＣエンドヌクレアーゼドメイン［Ｅｕｇｅｎｅ　ＫｏｏｎｉｎおよびＫｉｒａ　Ｍａｋａｒｏｖａからの情報］とオルソロガスな構造に基づき同定された細菌種から２０７個の推定Ｃａｓ９を評価した。このセットのタンパク質配列保存に基づく系統発生解析から、３群の大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）および２群の小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）を含む５つのＣａｓ９ファミリーが明らかとなった（図１９Ａ～図１９Ｄおよび図２０Ａ～図２０Ｆ）。

【０７５５】

本出願人らはまた、インビトロ方法を用いてＣａｓ９ガイドＲＮＡの最適化も行ってい

る。
【０７５６】
実施例１６：Ｃａｓ９突然変異
本実施例において、本出願人らは、以下の突然変異がＳｐＣａｓ９をニック形成酵素に変換し得ることを示す：Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａ、Ｄ９８６Ａ。
【０７５７】
本出願人らは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内のどこに局在するかを示す配列を提供する（図２４Ａ～Ｍ）。本出願人らは、ニッカーゼが相同組換えを依然として媒介し得ることも示す。さらに、本出願人らは、これらの突然変異を有するＳｐＣａｓ９が（個々に）二本鎖切断を誘導しないことを示す。
【０７５８】
Ｃａｓ９オルソログは全て、３～４個のＲｕｖＣドメインおよびＨＮＨドメインの一般的構成を共有する。最も５’側のＲｕｖＣドメインが非相補鎖を開裂し、ＨＮＨドメインが相補鎖を開裂する。表記は全てガイド配列を参照する。
【０７５９】
５’ＲｕｖＣドメインの触媒残基は、目的のＣａｓ９を他のＣａｓ９オルソログ（化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座、Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座１、Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座３、およびフランシセラ・ノビシダ（Ｆｒａｎｃｉｓｃｉｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ）ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座由来）と相同性比較することによって同定され、保存されたＡｓｐ残基をアラニンに突然変異させることにより、Ｃａｓ９が相補鎖ニッキング酵素に変換される。同様に、ＨＮＨドメインの保存されたＨｉｓおよびＡｓｎ残基をアラニンに突然変異させることにより、Ｃａｓ９が非相補鎖ニッキング酵素に変換される。
【０７６０】
実施例１７：Ｃａｓ９転写活性化およびＣａｓ９リプレッサー
Ｃａｓ９転写活性化
第２世代の構築物を設計して試験した（表１）。これらの構築物を使用して転写活性化（ＶＰ６４融合構築物）および抑制（Ｃａｓ９のみ）をＲＴ－ｑＰＣＲにより評価する。本出願人らは、抗Ｈｉｓ抗体を使用して各構築物の細胞局在を評価し、Ｓｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイを使用してヌクレアーゼ活性を評価し、およびゲルシフトアッセイを使用してＤＮＡ結合親和性を評価する。
【０７６１】
Ｃａｓリプレッサー
ｄＣａｓ９を汎用ＤＮＡ結合ドメインとして使用して遺伝子発現を抑制し得ることがこれまでに示されている。本出願人らは、改良されたｄＣａｓ９設計ならびにリプレッサードメインＫＲＡＢおよびＳＩＤ４ｘに対するｄＣａｓ９融合を報告する。表１におけるＣａｓ９を使用して転写を調節するため作成されたプラスミドライブラリから、以下のリプレッサープラスミドがｑＰＣＲにより機能的に特徴付けられた：ｐＸＲＰ２７、ｐＸＲＰ２８、ｐＸＲＰ２９、ｐＸＲＰ４８、ｐＸＲＰ４９、ｐＸＲＰ５０、ｐＸＲＰ５１、ｐＸＲＰ５２、ｐＸＲＰ５３、ｐＸＲＰ５６、ｐＸＲＰ５８、ｐＸＲＰ５９、ｐＸＲＰ６１、およびｐＸＲＰ６２。
【０７６２】
各ｄＣａｓ９リプレッサープラスミドを、β－カテニン遺伝子のコード鎖にターゲティングされた２つのガイドＲＮＡと共に同時形質移入した。形質移入後７２時間でＲＮＡを単離し、ＲＴ－ｑＰＣＲによって遺伝子発現を定量化した。内在性対照遺伝子はＧＡＰＤＨであった。２つのバリデートされたｓｈＲＮＡを陽性対照として使用した。陰性対照はｇＲＮＡなしに形質移入した特定のプラスミド（これらは「ｐＸＲＰ＃＃対照」と表される）であった。プラスミドｐＸＲＰ２８、ｐＸＲＰ２９、ｐＸＲＰ４８、およびｐＸＲＰ

４９は、指定される標的化戦略を用いるときβ－カテニン遺伝子を抑制することができた。このようなプラスミドは、機能ドメインを有しないｄＣａｓ９（ｐＸＲＰ２８およびｐＸＲＰ２８）、およびＳＩＤ４ｘに融合したｄＣａｓ９（ｐＸＲＰ４８およびｐＸＲＰ４９）に対応する。

【０７６３】

さらなる研究では以下を調べる：上記の実験の反復、種々の遺伝子のターゲティング、他のｇＲＮＡを利用した最適なターゲティング位置の決定、および多重抑制。

【０７６４】

【表３２】

表1

pXRP024-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP025-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-$GGGGS_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP026-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-$EAAAK_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP027-pLenti2-EF1a-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP028-pLenti2-EF1a-NLS-$GGGGS_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP029-pLenti2-EF1a-NLS-$EAAAK_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP030-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP031-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE

【０７６５】

【表３３】

pXRP032-pLenti2-LTR-VP64-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP033-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-GGGGS$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP034-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-GGGGS$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP035-pLenti2-LTR-VP64-NLS-GGGGS$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP036-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-EAAAK$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP037-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-EAAAK$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP038-pLenti2-LTR-VP64-NLS-EAAAK$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP048-pLenti2-EF1a-SID4x-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP049-pLenti2-EF1a-SID4X-NLS-GGGGS$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP050-pLenti2-EF1a-SID4X-NLS-EAAAK$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP051-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP052-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-GGGGS$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP053-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-EAAAK$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP054-pLenti2-EF1a-dCas9-リンカー-FLAG-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP055-pLenti2-EF1a-dCas9-リンカー-FLAG-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP056-pLenti2-EF1a-dCas9-リンカー-FLAG-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP057-pLenti2-EF1a-dCas9-GGGGGS$_3$-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP058-pLenti2-EF1a-dCas9-GGGGGS$_3$-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP059-pLenti2-EF1a-dCas9-GGGGGS$_3$-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP060-pLenti2-EF1a-dCas9-EAAAK$_3$-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP061-pLenti2-EF1a-dCas9-EAAAK$_3$-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP062-pLenti2-EF1a-dCas9-EAAAK$_3$-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP024-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP025-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP026-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP027-pLenti2-EF1a-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP028-pLenti2-EF1a-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP029-pLenti2-EF1a-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP030-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP031-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP032-pLenti2-LTR-VP64-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP033-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP034-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP035-pLenti2-LTR-VP64-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP036-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP037-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP038-pLenti2-LTR-VP64-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP048-pLenti2-EF1a-SID4x-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP049-pLenti2-EF1a-SID4X-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE

【０７６６】

【表３４】

pXRP050-pLenti2-EF1a-SID4X-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP051-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP052-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP053-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP054-pLenti2-EF1a-Cas9-リンカー-FLAG-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP055-pLenti2-EF1a-Cas9-リンカー-FLAG-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP056-pLenti2-EF1a-Cas9-リンカー-FLAG-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP057-pLenti2-EF1a-Cas9-GGGGGS$_3$-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP058-pLenti2-EF1a-Cas9-GGGGGS$_3$-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP059-pLenti2-EF1a-Cas9-GGGGGS$_3$-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP060-pLenti2-EF1a-Cas9-EAAAK$_3$-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP061-pLenti2-EF1a-Cas9-EAAAK$_3$-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE
pXRP062-pLenti2-EF1a-Cas9-EAAAK$_3$-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE

【０７６７】

実施例１８：コレステロール生合成、脂肪酸生合成、および他の代謝疾患に関与する遺伝子、アミロイド病および他の疾患に関与する誤って折り畳まれたタンパク質をコードする遺伝子、細胞形質転換を引き起こす癌遺伝子、潜伏ウイルス遺伝子、および数ある障害の中でも特にドミナントネガティブ障害を引き起こす遺伝子の標的欠失。

本出願人らは、ウイルス送達系あるいはナノ粒子送達系を用いた、代謝疾患、アミロイドーシスおよびタンパク質凝集関連疾患、遺伝子突然変異および転座により生じる細胞形質転換、遺伝子突然変異のドミナントネガティブ効果、潜伏ウイルス感染、および他の関連症状に罹患した、必要性のある対象または患者における肝組織、脳組織、眼組織、上皮組織、造血組織、または別の組織でのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の遺伝子送達を実証する。

【０７６８】

研究設計：代謝疾患、アミロイドーシスおよびタンパク質凝集関連疾患に罹患した、必要性のある対象または患者としては、限定はされないが、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、他の家畜および関連哺乳動物が含まれる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系はキメラガイドＲＮＡにガイドされ、開裂しようとするヒトゲノム遺伝子座の特定の部位を標的にする。開裂および非相同末端結合媒介性修復の後、フレームシフト突然変異により遺伝子のノックアウトがもたらされる。

【０７６９】

本出願人らは、上述の障害に関わる遺伝子を標的にするガイドＲＮＡを、最小限のオフターゲット活性で内因性遺伝子座に特異的であるように選択する。２つ以上のガイドＲＮＡを単一のＣＲＩＳＰＲアレイにコードすることによりＤＮＡに同時の二本鎖切断を誘導し、罹患した遺伝子または染色体領域の微小欠失を生じさせてもよい。

【０７７０】

遺伝子標的の同定および設計

各候補疾患遺伝子について、本出願人らは目的のＤＮＡ配列を選択し、それにはタンパク質コードエクソン、既知のドミナントネガティブ突然変異部位を含みかつそれに隣接する配列、病的反復配列を含みかつそれに隣接する配列が含まれる。遺伝子ノックアウト手法に関して、開始コドンに最も近接した初期コードエクソンが、完全なノックアウトを達成し、かつ部分的な機能を保持するトランケート型タンパク質産物となる可能性を最小限に抑えるのに最良の選択肢を提供する。

【０７７１】

本出願人らは、ＮＧＧモチーフ（ＳｐＣａｓ９系について）またはＮＮＡＧＡＡＷ（Ｓｔ１Ｃａｓ９系について）の直ちに５’側にある可能な全てのターゲティング可能２０ｂｐ配列に関して目的の配列を分析する。本出願人らは、特異性を決定する計算アルゴリズムに基づきオフターゲット効果が最小限に抑えられるように、ゲノムにおけるＲＮＡによ

ってガイドされるユニークな単一のＣａｓ９認識用配列を選択する。
【０７７２】
送達系へのガイド配列のクローニング
ガイド配列は二本鎖２０～２４ｂｐオリゴヌクレオチドとして合成される。オリゴを５’－リン酸化処理し、アニーリングにより二重鎖を形成した後、オリゴを送達方法に応じた好適なベクターにライゲートする：
【０７７３】
ウイルスベースの送達方法
ＡＡＶベースのベクター（ＰＸ２６０、３３０、３３４、３３５）が他の部分に記載されている。
レンチウイルスベースのベクターは、Ｕ６プロモーターによってドライブされるキメラＲＮＡ足場と、ＥＦ１ａプロモーターによってドライブされるＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼとを担持する単一のベクターにガイド配列を直接ライゲートする同様のクローニング戦略を用いる。
【０７７４】
ウイルス産生については他の部分に記載される。
【０７７５】
ナノ粒子ベースのＲＮＡ送達方法
１．Ｔ７プロモーター－ガイド配列キメラＲＮＡをコードするオリゴヌクレオチド二重鎖としてガイド配列を合成する。Ｔ７プロモーターを Ｃａｓ９の５’にＰＣＲ方法によって付加する。
【０７７６】
２．Ｔ７によりドライブされるＣａｓ９およびガイドキメラＲＮＡをインビトロで転写し、市販のキットを使用してＣａｓ９　ｍＲＮＡをさらにキャッピングし、Ａテールを付加する。キットの説明書に従いＲＮＡ産物を精製する。
【０７７７】
流体力学的尾静脈送達方法（マウスに対して）
ガイド配列を、上記および本出願の他の部分に記載するとおりＡＡＶプラスミドにクローニングする。
【０７７８】
細胞系に関するインビトロ検証
形質移入
１．ＤＮＡプラスミド形質移入
ガイド配列を担持するプラスミドをヒト胎児腎臓（ＨＥＫ２９３Ｔ）細胞またはヒト胚性幹（ｈＥＳ）細胞、他の関連性のある細胞型に、脂質ベース、化学ベースまたはエレクトロポレーションベースの方法を使用して形質移入する。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の２４ウェル形質移入（約２６０，０００細胞）に対しては、５００ｎｇの総ＤＮＡを、リポフェクタミン２０００を使用して各ウェルに形質移入する。ｈＥＳ細胞の１２ウェル形質移入に対しては、１ｕｇの総ＤＮＡを、Ｆｕｇｅｎｅ　ＨＤを使用して単一のウェルに形質移入する。
【０７７９】
２．ＲＮＡ形質移入
上記に記載する精製ＲＮＡを、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞への形質移入に使用する。１～２ｕｇのＲＮＡを、製造者の指示に従いリポフェクタミン２０００を使用して約２６０，０００個に形質移入し得る。Ｃａｓ９およびキメラＲＮＡのＲＮＡ送達を図２８に示す。
【０７８０】
インビトロインデル形成アッセイ
形質移入後７２時間で細胞を回収し、二本鎖切断の指標としてのインデル形成に関してアッセイする。
【０７８１】

簡潔に言えば、標的配列の周りのゲノム領域を、高フィデリティポリメラーゼを使用してＰＣＲ増幅する（約４００～６００ｂｐアンプリコンサイズ）。産物を精製し、等濃度に標準化し、９５℃から４℃まで徐々にアニーリングしてＤＮＡヘテロ二本鎖を形成させる。アニーリング後、Ｃｅｌ－Ｉ酵素を使用してヘテロ二本鎖を開裂し、得られた産物をポリアクリルアミドゲル上で分離し、インデル効率を計算する。

【０７８２】

動物におけるインビボ原理証明

送達機構

ＡＡＶまたはレンチウイルス作製については他の部分に記載される。

【０７８３】

ナノ粒子製剤：ナノ粒子製剤にＲＮＡを混合する

市販のキットを使用して、マウスにおけるＤＮＡプラスミドの流体力学的尾静脈注射を実施する。

Ｃａｓ９およびガイド配列は、ウイルス、ナノ粒子コーティングＲＮＡ混合物、またはＤＮＡプラスミドとして送達され、被験動物に注射される。並行する一組の対照動物に、滅菌生理食塩水、Ｃａｓ９およびＧＦＰ、またはガイド配列およびＧＦＰ単独を注射する。

【０７８４】

注射後３週間で症状の改善に関して動物を調べて犠牲にする。関係する臓器系のインデル形成を分析する。表現型アッセイには、ＨＤＬ、ＬＤＬ、脂質の血中濃度が含まれる。

【０７８５】

インデル形成アッセイ

市販キットを使用して組織からＤＮＡを抽出する；インデルアッセイは、インビトロ実証について記載されるとおり実施し得る。

【０７８６】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の治療適用は、候補疾患遺伝子の組織特異的かつ時間的に制御された標的欠失の達成に適している。例としては、数ある障害の中でも特に、コレステロールおよび脂肪酸代謝、アミロイド病、ドミナントネガティブ疾患、潜伏ウイルス感染症に関与する遺伝子が挙げられる。

【０７８７】

遺伝子座に標的インデルを導入するためのシングルガイドＲＮＡの例

【０７８８】

【表３５】

疾患	遺伝子	スペーサー	(配列番号___)	PAM	機構	参考文献
高コレステロール血症	HMG-CR	GCCAAATTGGACGACCCTCG		CGG	ノックアウト	「フルバスタチン: その薬理学および高コレステロール血症の管理における使用のレビュー(Fluvastatin: a review of its pharmacology and use in the management of hypercholesterolaemia)」(Plosker GL et al. Drugs 1996, 51(3):433-459)
高コレステロール血症	SQLE	CGAGGAGACCCCCGTTTCGG		TGG	ノックアウト	「非スタチン系コレステロール降下剤の潜在的な役割(Potential role of nonstatin cholesterol lowering agents)」(Trapani et al. IUBMB Life, Volume 63, Issue 11, pages 964–971, November 2011)
高脂血症	DGAT1	CCCGCCGCCGCCGTGGCTCG		AGG	ノックアウト	「抗肥満剤および抗糖尿病剤としてのDGAT1阻害因子(DGAT1 inhibitors as anti-obesity and anti-diabetic agents)」(Birch AM et al. Current Opinion in Drug Discovery & Development [2010, 13(4):489-496)
白血病	BCR-ABL	TGAGCTCTACGAGATCCACA		AGG	ノックアウト	「RNA干渉(RNAi)によるBCR/ABL融合遺伝子を用いた白血病細胞の死滅(Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi))」(Fuchs et al. Oncogene 2002, 21(37):5716-5724)

遺伝子座に染色体微小欠失を導入するためのガイドＲＮＡ対の例

【０７８９】

【表３６】

疾患	遺伝子	スペーサー	(配列番号___)	PAM	機構	参考文献
高脂血症	PLIN2ガイド1	CTCAAAATTCATACCGGTTG		TGG	微小欠失	「ペリリピン-2ヌルマウスは食事性肥満、脂肪炎症および脂肪肝疾患から保護される(Perilipin-2 Null Mice are Protected Against Diet-Induced Obesity, Adipose Inflammation and Fatty Liver Disease)」(McManaman JL et al. The Journal of Lipid Research, jlr.M035063. 初版、February 12, 2013)
高脂血症	PLIN2ガイド2	CGTTAAACAACAACCGGACT		TGG	微小欠失	
高脂血症	SREBPガイド1	TTCACCCCGCGGCGCTGAAT		ggg	微小欠失	「小分子ベツリンによるSREBPの阻害は高脂血症およびインスリン抵抗性を改善し、動脈硬化性プラークを低減する(Inhibition of SREBP by a Small Molecule, Betulin, Improves Hyperlipidemia and Insulin Resistance and Reduces Atherosclerotic Plaques)」(Tang J et al. Cell Metabolism, Volume 13, Issue 1, 44-56, 5 January 2011)
高脂血症	SREBPガイド2	ACCACTACCAGTCCGTCCAC		agg	微小欠失	

【０７９０】

実施例１９：疾患原因突然変異を有する遺伝子に対する修復の標的インテグレーション；酵素欠損症および他の関連疾患の再現

研究設計
Ｉ．遺伝子標的の同定および設計
・実施例２２に記載される
ＩＩ．送達系に対するガイド配列および修復テンプレートのクローニング
・上記の実施例２２に記載される
・本出願人らは、罹患アレルを含む相同性アームを含めるためのＤＮＡ修復テンプレートならびに野生型修復テンプレートをクローニングする
ＩＩＩ．細胞系に関するインビトロ検証
ａ．形質移入については、上記の実施例２２に記載される；Ｃａ９、ガイドＲＮＡ、および修復テンプレートを関連性のある細胞型に同時形質移入する。
ｂ．インビトロ修復アッセイ
ｉ．本出願人らは形質移入後７２時間で細胞を回収し、修復に関してアッセイする
ｉｉ．簡潔に言えば、本出願人らは修復テンプレートの周りのゲノム領域を、高フィデリティポリメラーゼを使用してＰＣＲ増幅する。本出願人らは突然変異体アレルの発生率の低下に関して産物を配列決定する。
ＩＶ．動物におけるインビボ原理証明
ａ．送達機構については、上記の実施例２２および３４に記載される。
ｂ．インビボ修復アッセイ
ｉ．本出願人らは、インビトロ実証に記載するとおり修復アッセイを実施する。
Ｖ．治療適用
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、候補疾患遺伝子の組織特異的かつ時間的に制御された標的欠失の達成に適している。例としては、数ある障害の中でも特に、コレステロールおよび脂肪酸代謝、アミロイド病、ドミナントネガティブ疾患、潜伏ウイルス感染症に関与する遺伝子が挙げられる。
【０７９１】
修復テンプレートによる一つの単一ミスセンス突然変異の例：
【０７９２】
【表３７】

疾患	遺伝子	スペーサー	PAM
家族性アミロイド多発ニューロパチー	TTR	AGCCTTTCTGAACACATGCA	CGG

機構	参考文献
V30M修復	「健康及び疾患におけるトランスサイレチン突然変異(Transthyretin mutations in health and disease)」(Joao et al. Human Mutation, Volume 5, Issue 3, pages 191–196, 1995)

V30M アレル	CCTGCCATCAATGTGGCCATGCATGTGTTCAGAAAGGCT (配列番号___)
WT アレル	CCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTCAGAAAGGCT (配列番号___)

【０７９３】
実施例２０：緑内障、アミロイドーシス、およびハンチントン病におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の治療適用
緑内障：本出願人らは、ミオシリン（ｍｙｃｉｌｉｎ）（ＭＹＯＣ）遺伝子の第１のエクソンをターゲティングするガイドＲＮＡを設計する。本出願人らはアデノウイルスベクター（Ａｄ５）を使用してＣａｓ９ならびにＭＹＯＣ遺伝子をターゲティングするガイドＲＮＡの両方をパッケージングする。本出願人らはこのアデノウイルスベクターを、細胞が緑内障の病態生理に関係付けられている小柱網に注入する。本出願人らは、初めにこれを、突然変異ＭＹＯＣ遺伝子を有するマウスモデルで試験して、アデノウイルスベクターが視力を改善し、および眼圧を低下させるかどうかを見る。ヒトにおける治療適用も同様の戦略を用いる。

【０７９４】
アミロイドーシス：本出願人らは、肝臓におけるトランスサイレチン（ＴＴＲ）遺伝子の第１のエクソンをターゲティングするガイドＲＮＡを設計する。本出願人らはＡＡＶ８を使用してＣａｓ９ならびにＴＴＲ遺伝子の第１のエクソンをターゲティングするガイドＲＮＡをパッケージングする。ＡＡＶ８は、効率的に肝臓をターゲティングすることが示されており、静脈内投与され得る。Ｃａｓ９は、アルブミンプロモーターなどの肝臓特異的プロモーターを使用するか、あるいは構成的プロモーターを使用してドライブすることができる。ｐｏｌ３プロモーターがガイドＲＮＡをドライブする。
【０７９５】
あるいは、本出願人らは、プラスミドＤＮＡの流体力学的送達を利用してＴＴＲ遺伝子をノックアウトする。本出願人らは、Ｃａｓ９とＴＴＲのエクソン１をターゲティングするガイドＲＮＡとをコードするプラスミドを送達する。
【０７９６】
さらなる代替的な手法として、本出願人らはＲＮＡの組み合わせ（Ｃａｓ９のｍＲＮＡ、およびガイドＲＮＡ）を投与する。ＲＮＡはＬｉｆｅ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのＩｎｖｉｖｏｆｅｃｔａｍｉｎｅなどのリポソームを使用してパッケージングし、静脈内送達することができる。ＲＮＡによって誘発される免疫原性を低下させ、Ｃａｓ９発現レベルおよびガイドＲＮＡの安定性を高めるため、本出願人らは５’キャッピングを用いてＣａｓ９　ｍＲＮＡを改変する。本出願人らはまた、改変されたＲＮＡヌクレオチドをＣａｓ９　ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡに組み込むことにより、それらの安定性を高め、免疫原性を低下させる（例えばＴＬＲの活性化）。効率を高めるため、本出願人らは複数回用量のウイルス、ＤＮＡ、またはＲＮＡを投与する。
【０７９７】
ハンチントン病：本出願人らは、患者のＨＴＴ遺伝子におけるアレル特異的突然変異に基づきガイドＲＮＡを設計する。例えば、ＣＡＧリピートが伸長したＨＴＴがヘテロ接合の患者において、本出願人らは、突然変異体ＨＴＴアレルに特有のヌクレオチド配列を同定し、それを使用してガイドＲＮＡを設計する。本出願人らは、突然変異体塩基がガイドＲＮＡの最後の９ｂｐの範囲内に位置することを確実にする（これは標的サイズとガイドＲＮＡとの間の単一のＤＮＡ塩基ミスマッチ間を識別する能力を有することが、本出願人らにより確認されている）。
【０７９８】
本出願人らは、突然変異体ＨＴＴアレル特異的ガイドＲＮＡおよびＣａｓ９をＡＡＶ９にパッケージングし、ハンチントン病患者の線条体内に送達する。ウイルスは開頭術によって定位的に線条体に注入する。ＡＡＶ９は、ニューロンを効率的に形質導入することが知られる。本出願人らはヒトシナプシンＩなどのニューロン特異的プロモーターを使用してＣａｓ９をドライブする。
【０７９９】
実施例２１：ＨＩＶにおけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の治療適用
慢性ウイルス感染症は、有意な罹患率および死亡率の原因である。これらのウイルスの多くに関しては、ウイルス複製の種々の側面を有効にターゲティングする従来の抗ウイルス治療薬が存在するが、現在の治療モダリティは、通常、「ウイルス潜伏」に起因して非治癒的な性質のものである。その性質上、ウイルス潜伏は、活性のあるウイルス産生のないウイルスのライフサイクルにおける休眠期により特徴付けられる。この期間中、ウイルスは大部分が免疫監視機構および従来の治療薬の両方を回避することができるため、ウイルスが宿主内に長期にわたるウイルスリザーバを構築することが可能となり、続いてそこから再活性化し、ウイルスの伝播および伝染を続行することができる。ウイルス潜伏の鍵は、ウイルスゲノムを安定的に維持する能力であり、これは、それぞれウイルスゲノムを細胞質に貯えるかまたはそれを宿主ゲノムにインテグレートするものであるエピソーム潜伏またはプロウイルス潜伏のいずれかによって達成される。初感染を防ぐ有効なワクチン接種がない場合、潜伏リザーバおよび溶菌作用のエピソードにより特徴付けられる慢性ウ

イルス感染症は重大な影響を及ぼし得る：ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）は子宮頸癌をもたらすことがあり、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）は肝細胞癌の原因となり、およびヒト免疫不全ウイルスは最終的には宿主免疫系を破壊して日和見感染に対する感受性をもたらす。このように、これらの感染症では、現在利用可能な抗ウイルス治療薬の生涯にわたる使用が必要となる。さらに問題を複雑にしているのは、これらのウイルスゲノムの多くの高い変異性であり、これが有効な治療の存在しない耐性株の進化につながっている。

【０８００】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、多重的能力のある配列特異的な形で二本鎖ＤＮＡ切断（ＤＳＢ）を誘導することが可能な細菌性適応免疫系であり、最近になって哺乳類細胞系内で再構成されている。１つまたは多数のガイドＲＮＡによってＤＮＡをターゲティングすると、介在配列にそれぞれインデルおよび欠失の両方がもたらされ得ることが示されている。このように、この新規技術は、高効率および高特異性で単一細胞内における標的化されかつ多重化されたＤＮＡ突然変異作成を達成し得る手段に相当する。結果的に、ウイルスＤＮＡ配列に対するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の送達は、進行中のウイルス産生がない場合であっても、潜伏ウイルスゲノムの標的化した破壊および欠失を可能にし得る。

【０８０１】

例として、ＨＩＶ－１による慢性感染症は、３３００万人の感染者を抱え、毎年２６０万人の感染が発生している世界的な健康問題である。ウイルス複製の複数の側面を同時にターゲティングする集学的高活性抗レトロウイルス療法（ＨＡＡＲＴ）の使用により、ＨＩＶ感染の大部分を、末期的でない慢性の病気として管理することが可能となっている。治療しなければ、通常９～１０年以内にＨＩＶからＡＩＤＳへの進行が起こり、宿主免疫系の枯渇および日和見感染症の発生がもたらされ、通常はその後間もなく死亡に至る。ウイルス潜伏に続発して、ＨＡＡＲＴの中断は必然的にウイルスのリバウンドを引き起こす。さらに、一時的ではあっても治療の寸断により、利用可能な手段では制御不可能なＨＩＶ耐性株が選択され得る。加えて、ＨＡＡＲＴ治療のコストは著しく高い：１年に１人当たり１０，０００～１５，０００米国ドルの範囲内である。このように、ウイルス複製のプロセスではなしに、ＨＩＶゲノムを直接ターゲティングする治療手法は、潜伏リザーバの根絶による治癒的な治療選択肢を可能にし得る手段に相当する。

【０８０２】

ＨＩＶ－１ターゲティングＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の開発および送達は、既存の標的ＤＮＡ突然変異生成手段、すなわちＺＦＮおよびＴＡＬＥＮとは区別され得るユニークな手法に相当し、数多くの治療的関連性を有する。ＨＡＡＲＴと併せたＣＲＩＳＰＲ媒介性ＤＳＢおよびインデルによるＨＩＶ－１ゲノムの標的破壊および欠失は、宿主内での活性なウイルス産生ならびに潜伏ウイルスリザーバの枯渇を同時に防ぐことを可能にし得る。

【０８０３】

宿主免疫系にインテグレートされると、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系によりＨＩＶ－１抵抗性亜集団の生成が可能となり、この亜集団は、ウイルスが完全には根絶されていない場合であっても、宿主免疫活性の維持および再構成を可能にし得る。これは、ウイルスゲノムの破壊によりウイルスの産生およびインテグレーションを妨げることで潜在的に初感染を予防するもので、「ワクチン接種」の手段に相当し得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の多重化した性質により、個々の細胞内においてゲノムの複数の側面を同時に標的化することが可能となる。

【０８０４】

ＨＡＡＲＴなどでは、複数の適応突然変異を同時に獲得する必要があるため、突然変異生成によるウイルスのエスケープが最小限に抑えられる。複数のＨＩＶ－１株を同時にターゲティングすることができ、従って重感染の可能性が最小限に抑えられ、かつ続く新規組換え株の作成が妨げられる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の、タンパク質媒介性よりむしろヌクレオチド媒介性の配列特異性により、送達機構を大幅に変更することなく治療薬を迅速に作成することが可能となる。

【０８０５】

これを達成するため、本出願人らは、有効範囲および有効性を最大化するためのＨＩＶ－１株変異体を考慮しながら大多数のＨＩＶ－１ゲノムを標的とするＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド ＲＮＡを作成する。ＨＩＶ－１サブタイプと変異体との間のゲノム保存の配列解析から、介在するウイルス配列を欠失させるかまたはウイルスの遺伝子機能を破壊し得るフレームシフト突然変異を導入することを目的としたゲノムの隣接保存領域のターゲティングが可能になるはずである。

【０８０６】

本出願人らは、従来どおり宿主免疫系のアデノウイルスまたはレンチウイルス媒介性感染によるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の送達を達成する。手法に応じて、宿主免疫細胞は、ａ）単離され、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓが形質導入され、選択され、および宿主に再導入されてもよく、またはｂ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の全身送達によりインビボで形質導入されてもよい。第１の手法は、抵抗性免疫集団の作成を可能にする一方、第２の手法は宿主内の潜伏ウイルスリザーバを標的にする傾向が強い。

【０８０７】

【表３８】

潜在的HIV-1標的スペーサーの例(出典Mcintyre *et al*)、これはHIV-1変異体の有効範囲が最大となるように最適化されたHIV-1に対するshRNAを生成した。
CACTGCTTAAGCCTCGCTCGAGG (配列番号)
TCACCAGCAATATTCGCTCGAGG (配列番号)
CACCAGCAATATTCCGCTCGAGG (配列番号)
TAGCAACAGACATACGCTCGAGG (配列番号)
GGGCAGTAGTAATACGCTCGAGG (配列番号)
CCAATTCCCATACATTATTGTAC (配列番号)

【０８０８】

実施例２２：嚢胞性線維症におけるΔＦ５０８または他の突然変異の標的補修

本発明の態様は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子治療粒子と生体適合性医薬担体とを含み得る医薬組成物を提供する。別の態様によれば、ＣＦＴＲ遺伝子に突然変異を有する対象を治療するための遺伝子治療方法は、対象の細胞に治療有効量のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子治療粒子を投与することを含む。

【０８０９】

本実施例は、嚢胞性線維症または嚢胞性線維症関連症状に罹患した、必要性がある対象または患者の気道における、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子を使用したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の遺伝子導入または遺伝子送達を実証する。

【０８１０】

研究設計：必要性がある対象または患者：関連するヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の家畜。この研究は、ＡＡＶベクターによるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の遺伝子導入の有効性を試験する。本出願人らは、遺伝子発現に十分な導入遺伝子レベルを決定し、Ｃａｓ９酵素を含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を利用してΔＦ５０８または他のＣＦＴＲ誘導突然変異をターゲティングする。

【０８１１】

治療対象は、自発呼吸下に各肺につき薬学的に有効な量のエアロゾル化したＡＡＶベクター系の気管支内送達を受ける。対照対象は、内在性の対照遺伝子を含む同量の偽型ＡＡＶベクター系の投与を受ける。ベクター系は、薬学的に許容可能なまたは生体適合性の医薬担体と共に送達され得る。ベクター投与後３週間または適切なインターバルを置いて、嚢胞性線維症関連症状の改善に関して治療対象を調べる。

【０８１２】

本出願人らは、アデノウイルスまたはＡＡＶ粒子を使用する。

【０８１３】

本出願人らは、各々が１つ以上の調節配列（Ｃａｓ９用のＣｂｈまたはＥＦ１ａプロモーター、キメラガイドＲＮＡ用のＵ６またはＨ１プロモーター）に作動可能に結合してい

る以下の遺伝子構築物を、１つ以上のアデノウイルスまたはＡＡＶベクターまたは任意の他の適合性ベクターにクローニングする：ＣＦＴＲΔ５０８ターゲティングキメラガイドＲＮＡ（図３１Ｂ）、ΔＦ５０８突然変異の修復テンプレート（図３１Ｃ）および場合により１つ以上の核局在化シグナルまたは配列（ＮＬＳ）、例えば２つのＮＬＳを有するコドン最適化Ｃａｓ９酵素。

【０８１４】

Ｃａｓ９標的部位の同定

本出願人らはヒトＣＦＴＲゲノム遺伝子座を解析し、Ｃａｓ９標的部位を同定した（図３１Ａ）。（ＰＡＭはＮＧＧまたはＮＮＡＧＡＡＷ（配列番号＿＿＿）モチーフを含み得る）。

【０８１５】

遺伝子修復戦略

本出願人らは、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９ニッカーゼ）およびガイドＲＮＡを含むアデノウイルス／ＡＡＶベクター系を、Ｆ５０８残基を含有する相同性修復テンプレートを含むアデノウイルス／ＡＡＶベクター系と共に対象に、先に考察した送達方法の一つによって導入する。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系はＣＦＴＲΔ　５０８キメラガイドＲＮＡによりガイドされ、ニックを入れられるかあるいは開裂されるＣＦＴＲゲノム遺伝子座の特定の部位を標的にする。開裂後、嚢胞性線維症をもたらしまたは嚢胞性線維症関連症状を引き起こす欠失を補修する相同組換えによって開裂部位に修復テンプレートが挿入される。適切なガイドＲＮＡでＣＲＩＳＰＲ系を直接送達し、その全身性の導入を提供するこの戦略を用いて遺伝子突然変異をターゲティングし、表Ｂにあるような代謝、肝臓、腎臓およびタンパク質の疾患および障害を引き起こす遺伝子を編集または他の方法で操作することができる。

【０８１６】

実施例２３：遺伝子ノックアウト細胞ライブラリの作成

本実施例は、各細胞がノックアウトされた単一遺伝子を有する細胞ライブラリを作成する方法を実証する：

本出願人らは、ＥＳ細胞のライブラリであって、各細胞はノックアウトされた単一遺伝子を有し、かつＥＳ細胞のライブラリ全体はあらゆる単一遺伝子がノックアウトされているライブラリを作製する。このライブラリは、細胞プロセスならびに疾患における遺伝子機能のスクリーニングに有用である。

【０８１７】

この細胞ライブラリを作成するため、本出願人らは、誘導性プロモーター（例えばドキシサイクリン誘導性プロモーター）によりドライブされるＣａｓ９をＥＳ細胞にインテグレートする。加えて、本出願人らは、ＥＳ細胞において特定の遺伝子を標的にする単一のガイドＲＮＡをインテグレートする。ＥＳ細胞ライブラリを作成するため、本出願人らは、単純に、ヒトゲノムにおける各遺伝子を標的にするガイドＲＮＡをコードする遺伝子のライブラリとＥＳ細胞を混合する。本出願人らは、初めに、単一のＢｘＢ１　ａｔｔＢ部位をヒトＥＳ細胞のＡＡＶＳ１遺伝子座に導入する。次に本出願人らは、ＢｘＢ１インテグラーゼを使用して、ＡＡＶＳ１遺伝子座のＢｘＢ１　ａｔｔＢ部位に対する個々のガイドＲＮＡ遺伝子のインテグレーションを促進する。インテグレーションを促進するため、各ガイドＲＮＡ遺伝子は単一のａｔｔＰ部位を担持するプラスミド上に含まれる。このようにしてＢｘＢ１がゲノムのａｔｔＢ部位をガイドＲＮＡ含有プラスミド上のａｔｔＰ部位と組み換え得る。

【０８１８】

細胞ライブラリを作成するため、本出願人らは、インテグレートされた単一のガイドＲＮＡを有しかつＣａｓ９発現を誘導する細胞のライブラリを取る。誘導後、ガイドＲＮＡによって指定された部位でＣａｓ９が二本鎖切断を媒介する。この細胞ライブラリの多様性を確認するため、本出願人らは全エクソンシーケンシングを実施し、本出願人らが単一の標的遺伝子毎に突然変異を観察可能であることを確実にする。この細胞ライブラリは、

全ライブラリベースのスクリーニングを含めた種々の用途に使用することができ、または選別して個々の細胞クローンにし、個々のノックアウトヒト遺伝子を有するクローン細胞系の迅速作成を促進することができる。

【０８１９】

実施例２４：Ｃａｓ９を使用する微細藻類のエンジニアリング

Ｃａｓ９を送達する方法

方法１：本出願人らは、構成的プロモーター、例えば、Ｈｓｐ７０Ａ－Ｒｂｃ　Ｓ２またはベータ２－チューブリンの制御下でＣａｓ９を発現するベクターを使用してＣａｓ９およびガイドＲＮＡを送達する。

【０８２０】

方法２：本出願人らは、構成的プロモーター、例えば、Ｈｓｐ７０Ａ－Ｒｂｃ　Ｓ２またはベータ２－チューブリンの制御下でＣａｓ９およびＴ７ポリメラーゼを発現するベクターを使用してＣａｓ９およびＴ７ポリメラーゼを送達する。ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡをドライブするＴ７プロモーターを含有するベクターを使用して送達する。

【０８２１】

方法３：本出願人らは、Ｃａｓ９ｍＲＮＡおよびインビトロで転写されたガイドＲＮＡを藻類細胞に送達する。ＲＮＡは、インビトロで転写させることができる。Ｃａｓ９ｍＲＮＡは、Ｃａｓ９についてのコード領域およびＣａｓ９ｍＲＮＡの安定化を確保するためのＣｏｐ１からの３’ＵＴＲからなる。

【０８２２】

相同組換えのため、本出願人らは、追加の相同組換え修復テンプレートを提供する。

【０８２３】

ベーター２チューブリンプロモーターの制御下でＣａｓ９の発現をドライブするカセットと、それに続くＣｏｐ１の３’ＵＴＲについての配列。

【化１２】

TCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGA
GACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTC
CTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATA
GCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAAC
ACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGC
TAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACATGTACCCATA
CGATGTTCCAGATTACGCTTCGCCGAAGAAAAAGCGCAAGGTCGAAGCGTCCGA
CAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTG
ATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACC
GACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCGACAGCGGC
GAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAG
ACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAA
GGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGAAGAGGAT
AAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTAC
CACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACC
GACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCC
GGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACA
AGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAAAACCCCAT
CAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAG
CAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCT
GTTCGGCAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAAC
TTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGAC
GACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGG
CCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACAC

【化１３】

CGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCA
CCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAG
TACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATTGACG
GCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGA
TGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGA
AGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGC
TGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCCTGAAGGACAACCG
GGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTG
GCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATC
ACCCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCCAGAGCTTCA
TCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCA
AGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAA
ATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAAAA
GGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCT
GAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGC
GTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATTA
TCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATA
TCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGA
AAACCTATGCCCACCTGTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGA
GATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACA
AGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAG
AAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAG
AAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTG
GCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGAC
GAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATG
GCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAAT
GAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACA
CCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG
AATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGAC
TACGATGTGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACA
ACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCT

【化１４】

CCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCA
AGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCC
TGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGC
AGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACG
ACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCTGAAGTCCAAGC
TGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGAGATCAACAA
CTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATC
AAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTAC
GACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCC
AAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGG
CCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGG
AGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCA
TGCCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCA
AAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGG
ACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGT
GCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTGAA
AGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAA
GCTGCCTAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGC
CTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGT
GAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGAT
AATGAGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATC
ATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGG
ACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGG
CCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTT
CAAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGT
GCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGAT
CGACCTGTCTCAGCTGGGAGGCGACAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGGAGGC
CAGCTAAGGATCCGGCAAGACTGGCCCCGCTTGGCAACGCAACAGTGAGCCCCTC
CCTAGTGTGTTTGGGGATGTGACTATGTATTCGTGTGTTGGCCAACGGGTCAACC

【化１５】

CGAACAGATTGATACCCGCCTTGGCATTTCCTGTCAGAATGTAACGTCAGTTGAT
GGTACT (配列番号__)

【０８２４】

ベーター２チューブリンプロモーターの制御下でＴ７ポリメラーゼの発現をドライブするカセットと、それに続くＣｏｐ１の３’ＵＴＲについての配列：

【化１６】

TCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGA
GACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTC
CTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATA
GCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAAC
ACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGC
TAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACatgcctaagaagaaga
ggaaggttaacacgattaacatcgctaagaacgacttctctgacatcgaactggctgctatcccgttcaacactctggctgaccatt
acggtgagcgtttagctcgcgaacagttggcccttgagcatgagtcttacgagatgggtgaagcacgcttccgcaagatgtttga
gcgtcaacttaaagctggtgaggttgcggataacgctgccgccaagcctctcatcactaccctactccctaagatgattgcacgc
atcaacgactggtttgaggaagtgaaagctaagcgcggcaagcgcccgacagccttccagttcctgcaagaaatcaagccgga
agccgtagcgtacatcaccattaagaccactctggcttgcctaaccagtgctgacaatacaaccgttcaggctgtagcaagcgca
atcggtcgggccattgaggacgaggctcgcttcggtcgtatccgtgaccttgaagctaagcacttcaagaaaaacgttgaggaa
caactcaacaagcgcgtagggcacgtctacaagaaagcatttatgcaagttgtcgaggctgacatgctctctaagggtctactcg
gtggcgaggcgtggtcttcgtggcataaggaagactctattcatgtaggagtacgctgcatcgagatgctcattgagtcaaccgg
aatggttagcttacaccgccaaaatgctggcgtagtaggtcaagactctgagactatcgaactcgcacctgaatacgctgaggct
atcgcaacccgtgcaggtgcgctggctggcatctctccgatgttccaaccttgcgtagttcctcctaagccgtggactggcattac
tggtggtggctattgggctaacggtcgtcgtcctctggcgctggtgcgtactcacagtaagaaagcactgatgcgctacgaagac
gtttacatgcctgaggtgtacaaagcgattaacattgcgcaaaacaccgcatggaaaatcaacaagaaagtcctagcggtcgcc
aacgtaatcaccaagtggaagcattgtccggtcgaggacatccctgcgattgagcgtgaagaactcccgatgaaaccggaaga
catcgacatgaatcctgaggctctcaccgcgtggaaacgtgctgccgctgctgtgtaccgcaaggacaaggctcgcaagtctcg
ccgtatcagccttgagttcatgcttgagcaagccaataagtttgctaaccataaggccatctggttcccttacaacatggactggcg
cggtcgtgtttacgctgtgtcaatgttcaacccgcaaggtaacgatatgaccaaaggactgcttacgctggcgaaaggtaaacca
atcggtaaggaaggttactactggctgaaaatccacggtgcaaactgtgcgggtgtcgacaaggttccgttccctgagcgcatca
agttcattgaggaaaaccacgagaacatcatggcttgcgctaagtctccactggagaacacttggtgggctgagcaagattctcc
gttctgcttccttgcgttctgctttgagtacgctggggtacagcaccacggcctgagctataactgctcccttccgctggcgtttgac
gggtcttgctctggcatccagcacttctccgcgatgctccgagatgaggtaggtggtcgcgcggttaacttgcttcctagtgaaac
cgttcaggacatctacgggattgttgctaagaaagtcaacgagattctacaagcagacgcaatcaatgggaccgataacgaagta

【化１７】

gttaccgtgaccgatgagaacactggtgaaatctctgagaaagtcaagctgggcactaaggcactggctggtcaatggctggct
tacggtgttactcgcagtgtgactaagcgttcagtcatgacgctggcttacgggtccaaagagttcggcttccgtcaacaagtgct
ggaagataccattcagccagctattgattccggcaagggtctgatgttcactcagccgaatcaggctgctggatacatggctaag
ctgatttgggaatctgtgagcgtgacggtggtagctgcggttgaagcaatgaactggcttaagtctgctgctaagctgctggctgc
tgaggtcaaagataagaagactggagagattcttcgcaagcgttgcgctgtgcattgggtaactcctgatggtttccctgtgtggc
aggaatacaagaagcctattcagacgcgcttgaacctgatgttcctcggtcagttccgcttacagcctaccattaacaccaacaa
agatagcgagattgatgcacacaaacaggagtctggtatcgctcctaactttgtacacagccaagacggtagccaccttcgtaag
actgtagtgtgggcacacgagaagtacggaatcgaatcttttgcactgattcacgactccttcggtacgattccggctgacgctgc
gaacctgttcaaagcagtgcgcgaaactatggttgacacatatgagtcttgtgatgtactggctgatttctacgaccagttcgctga
ccagttgcacgagtctcaattggacaaaatgccagcacttccggctaaaggtaacttgaacctccgtgacatcttagagtcggact
tcgcgttcgcgtaaGGATCCGGCAAGACTGGCCCCGCTTGGCAACGCAACAGTGAGCCC
CTCCCTAGTGTGTTTGGGGATGTGACTATGTATTCGTGTGTTGGCCAACGGGTCA
ACCCGAACAGATTGATACCCGCCTTGGCATTTCCTGTCAGAATGTAACGTCAGTT
GATGGTACT (配列番号__)

【０８２５】

Ｔ７プロモーターによりドライブされるガイドＲＮＡの配列（Ｔ７プロモーター、Ｎは、ターゲティング配列を表す）：

【化１８】

gaaat**TAATACGACTCACTATA**NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagc
taGAAAtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcttttttt (配列番号__)

遺伝子送達：

Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ Ｃｅｎｔｅｒからのコナミドリムシ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）株ＣＣ－１２４およびＣＣ－１２５を、エレクトロポレーションに使用する。エレクトロポレーションプロトコルは、ＧｅｎｅＡｒｔ Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇキットからの標準的な推奨プロトコルに従う。

【０８２６】

また、本出願人らは、Ｃａｓ９を構成的に発現するコナミドリムシ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）の系統を生成する。このことは、ｐＣｈｌａｍｙ１（ＰｖｕＩを使用して線形化）を使用し、ハイグロマイシン耐性コロニーを選択することにより行うことができる。Ｃａｓ９を含有するｐＣｈｌａｍｙ１についての配列を以下に示す。遺伝子ノックアウトを達成するためのこの手法において、ガイドＲＮＡのためのＲＮＡを送達することが必要なだけである。相同組換えのため、本出願人らは、ガイドＲＮＡおよび線形化相同組換えテンプレートを送達する。

【０８２７】

ｐＣｈｌａｍｙ１－Ｃａｓ９：

【化１９】

TGCGGTATTTCACACCGCATCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGC
GCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA

【化２０】

GATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAA
ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATC
AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACT
CCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCT
GCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACC
AGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT
CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGT
TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGG
TATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCC
ATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTA
AGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACT
GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATT
CTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGAT
AATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTT
CGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACC
CACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGT
GAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGG
AAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGG
TTATTGTCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG
ACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATC
TGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATC
AAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACC
AAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTA
GCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGTTGCCAGTGG
CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG
CAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACG
ACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTC
CCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGA
GAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCG
GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGG
AGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTG

【化２１】

GCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA
TTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG
CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGTCGCTGAGGCTTGACATGATTGGTGCGTATGT
TTGTATGAAGCTACAGGACTGATTTGGCGGGCTATGAGGGCGGGGGAAGCTCTGG
AAGGGCCGCGATGGGGCGCGCGGCGTCCAGAAGGCGCCATACGGCCCGCTGGCG
GCACCCATCCGGTATAAAAGCCCGCGACCCCGAACGGTGACCTCCACTTTCAGCG
ACAAACGAGCACTTATACATACGCGACTATTCTGCCGCTATACATAACCACTCAG
CTAGCTTAAGATCCCATCAAGCTTGCATGCCGGGCGCGCCAGAAGGAGCGCAGC
CAAACCAGGATGATGTTTGATGGGGTATTTGAGCACTTGCAACCCTTATCCGGAA
GCCCCCTGGCCCACAAAGGCTAGGCGCCAATGCAAGCAGTTCGCATGCAGCCCCT
GGAGCGGTGCCCTCCTGATAAACCGGCCAGGGGGCCTATGTTCTTTACTTTTTTAC
AAGAGAAGTCACTCAACATCTTAAAATGGCCAGGTGAGTCGACGAGCAAGCCCG
GCGGATCAGGCAGCGTGCTTGCAGATTTGACTTGCAACGCCCGCATTGTGTCGAC
GAAGGCTTTTGGCTCCTCTGTCGCTGTCTCAAGCAGCATCTAACCCTGCGTCGCCG
TTTCCATTTGCAGGAGATTCGAGGTACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACG
CTTCGCCGAAGAAAAAGCGCAAGGTCGAAGCGTCCGACAAGAAGTACAGCATCG
GCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAA
GGTGCCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAA
GAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCAC
CCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTG
CTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTC
CACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCAC
CCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACCA
TCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
TGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGA
GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGT
GCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGA
CGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCT
GATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTCGGCAACCTGATTGC
CCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGAT
GCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTG

【化２２】

GCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCG
ACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCC
CCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTG
CTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCG
ACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAG
AGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAAC
TGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACA
ACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCG
GCAGGAAGATTTTTACCCATTCCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGAT
CCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGA
TTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCCTGGAACTTCGAG
GAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAAC
TTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTAC
GAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGTGACCGAGGGA
ATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCT
GCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTT
CAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAGATCGGTTC
AACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACT
TCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGA
CACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCCACC
TGTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGG
GCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGA
CAATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAAACTTCATGCAGCT
GATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCAGGTGTC
CGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGC
CATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAGT
GATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCA
GACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAG
AGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACA
CCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATA
TGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACC

【化２３】

ATATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGAC
CAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCG
TGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCC
AGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCTGAGCGAACTGG
ATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGC
ACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACA
AGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTT
CCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGAGATCAACAACTACCACCACGCC
CACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTA
AGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGA
TGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATC
CGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGAT
AAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCATGCCCCAAGTGAAT
ATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTG
CCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAAG
AAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCA
AAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGG
ATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTTCTGGAAG
CCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACT
CCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAAC
TGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTTCCTGTACC
TGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGCAGAAAC
AGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCA
GCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCTGTC
CGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCAT
CCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCC
TGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCT
GGGAGGCGACAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGGAGGCCAGCTAACATATGATT
CGAATGTCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCG

【化２４】

GGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCC
CGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTG
TTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCAT
ATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCG
CACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACAT
GACACAAGAATCCCTGTTACTTCTCGACCGTATTGATTCGGATGATTCCTACGCG
AGCCTGCGGAACGACCAGGAATTCTGGGAGGTGAGTCGACGAGCAAGCCCGGCG
GATCAGGCAGCGTGCTTGCAGATTTGACTTGCAACGCCCGCATTGTGTCGACGAA
GGCTTTTGGCTCCTCTGTCGCTGTCTCAAGCAGCATCTAACCCTGCGTCGCCGTTT
CCATTTGCAGCCGCTGGCCCGCCGAGCCCTGGAGGAGCTCGGGCTGCCGGTGCCG
CCGGTGCTGCGGGTGCCCGGCGAGAGCACCAACCCCGTACTGGTCGGCGAGCCC
GGCCCGGTGATCAAGCTGTTCGGCGAGCACTGGTGCGGTCCGGAGAGCCTCGCG
TCGGAGTCGGAGGCGTACGCGGTCCTGGCGGACGCCCCGGTGCCGGTGCCCCGC
CTCCTCGGCCGCGGCGAGCTGCGGCCCGGCACCGGAGCCTGGCCGTGGCCCTACC
TGGTGATGAGCCGGATGACCGGCACCACCTGGCGGTCCGCGATGGACGGCACGA
CCGACCGGAACGCGCTGCTCGCCCTGGCCCGCGAACTCGGCCGGGTGCTCGGCCG
GCTGCACAGGGTGCCGCTGACCGGGAACACCGTGCTCACCCCCCATTCCGAGGTC
TTCCCGGAACTGCTGCGGGAACGCCGCGCGGCGACCGTCGAGGACCACCGCGGG
TGGGGCTACCTCTCGCCCCGGCTGCTGGACCGCCTGGAGGACTGGCTGCCGGACG
TGGACACGCTGCTGGCCGGCCGCGAACCCCGGTTCGTCCACGGCGACCTGCACGG
GACCAACATCTTCGTGGACCTGGCCGCGACCGAGGTCACCGGGATCGTCGACTTC
ACCGACGTCTATGCGGGAGACTCCCGCTACAGCCTGGTGCAACTGCATCTCAACG
CCTTCCGGGGCGACCGCGAGATCCTGGCCGCGCTGCTCGACGGGGCGCAGTGGA
AGCGGACCGAGGACTTCGCCCGCGAACTGCTCGCCTTCACCTTCCTGCACGACTT
CGAGGTGTTCGAGGAGACCCCGCTGGATCTCTCCGGCTTCACCGATCCGGAGGAA
CTGGCGCAGTTCCTCTGGGGGCCGCCGGACACCGCCCCCGGCGCCTGATAAGGAT
CCGGCAAGACTGGCCCCGCTTGGCAACGCAACAGTGAGCCCCTCCCTAGTGTGTT
TGGGGATGTGACTATGTATTCGTGTGTTGGCCAACGGGTCAACCCGAACAGATTG
ATACCCGCCTTGGCATTTCCTGTCAGAATGTAACGTCAGTTGATGGTACT(配列番号__)

【０８２８】

全ての改変コナミドリムシ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）細胞について、本出願人らは、ＰＣＲ、ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ、およびＤＮＡシーケンシングを使用して良好な改変を確認した。

【０８２９】

実施例２５：Ｃａｓ９を使用して種々の疾患型をターゲティングする

タンパク質コード配列の突然変異が関与する疾患：

優性障害は、ドミナントネガティブアレルを不活性化することによりターゲティングさ

れ得る。本出願人らは、Ｃａｓ９を使用してドミナントネガティブアレルにおけるユニーク配列をターゲティングし、ＮＨＥＪによって突然変異を導入する。ＮＨＥＪによって誘導されるインデルは、ドミナントネガティブアレルにフレームシフト突然変異を導入してドミナントネガティブタンパク質を除去することが可能であり得る。これは遺伝子がハプロ不全でない（ｈａｐｌｏ－ｓｕｆｆｉｃｉｅｎｔ）場合に機能し得る（例えばＭＹＯＣ突然変異によって生じる緑内障およびハンチントン病）。

【０８３０】

劣性遺伝疾患は、両方のアレルで疾患突然変異を修復することによりターゲティングされ得る。分裂細胞について、本出願人らはＣａｓ９を使用して突然変異部位の近傍に二本鎖切断を導入し、外来性組換えテンプレートを使用して相同組換え速度を増加させる。分裂細胞について、これは多重ニッカーゼ活性を用いて達成されてもよく、それにより、相補的なオーバーハングを有する外来性ＤＮＡ断片のＮＨＥＪ媒介性ライゲーションによる両方のアレルの突然変異配列の置換が触媒される。

【０８３１】

本出願人らはまた、Ｃａｓ９を使用して保護突然変異も導入する（例えばＨＩＶ感染を防ぐためのＣＣＲ５の不活性化、コレステロールを減少させるためのＰＣＳＫ９の不活性化、またはアルツハイマー病の可能性を低下させるＡＰＰへのＡ６７３Ｔの導入）。

【０８３２】

非コード配列が関与する疾患

本出願人らは、Ｃａｓ９を使用してプロモーター領域の非コード配列を破壊し、転写因子結合部位を変化させ、およびエンハンサーまたはリプレッサーエレメントを変化させる。例えば、Ｃａｓ９を使用して造血幹細胞のＫｌｆ１エンハンサーＥＨＳ１を切り出すことにより、ＢＣＬ１１ａレベルを低下させ、分化した赤血球における胎児グロビン遺伝子発現を再活性化し得る。

【０８３３】

本出願人らはまた、Ｃａｓ９を使用して５’または３’非翻訳領域の機能性モチーフを破壊する。例えば、筋強直性ジストロフィーの治療のため、Ｃａｓ９を使用してＤＭＰＫ遺伝子のＣＴＧリピート伸長を除去し得る。

【０８３４】

実施例２６：多重化ニッカーゼ

本出願に詳説されるＣａｓ９の最適化の態様および教示を使用してＣａｓ９ニッカーゼもまた作成し得る。本出願人らは、Ｃａｓ９ニッカーゼをガイドＲＮＡのペアと組み合わせて使用して、規定のオーバーハングを有するＤＮＡ二本鎖切断を作成する。ガイドＲＮＡの２つのペアが使用されるとき、介在するＤＮＡ断片を切り出すことが可能である。２つのガイドＲＮＡペアで外来性ＤＮＡ断片を開裂することによってゲノムＤＮＡと適合性のオーバーハングを作成する場合、外来性ＤＮＡ断片をゲノムＤＮＡにライゲートして切り出された断片を置き換え得る。例えば、これを用いてハンチンチン（ｈｕｎｔｉｎｔｉｎ）（ＨＴＴ）遺伝子のトリヌクレオチドリピート伸長を除去し、ハンチントン病を治療し得る。

【０８３５】

より少数のＣＡＧリピートを有する外来性ＤＮＡが提供される場合、同じオーバーハングを有するＤＮＡ断片を作成することが可能であり得るとともに、ＨＴＴゲノム遺伝子座にライゲートして、切り出された断片を置き換えることができる。

【化２５】

【０８３６】

これらは、それぞれ配列番号__～__である。ゲノムへの外来性ＤＮＡ断片のライゲーションは相同組換え機構を必要とせず、従ってこの方法はニューロンなどの分裂終了細胞で用いられ得る。

【０８３７】

実施例２７：ＣＲＩＳＰＲ系の送達

Ｃａｓ９およびそのキメラガイドＲＮＡ、またはｔｒａｃｒＲＮＡとｃｒＲＮＡとの組み合わせは、ＤＮＡとしても、あるいはＲＮＡとしても送達することができる。Ｃａｓ９およびガイドＲＮＡを両方ともにＲＮＡ（普通のまたは塩基もしくは骨格改変を含む）分子として送達することを用いて、Ｃａｓ９タンパク質が細胞内に留まる時間を低減することができる。これにより標的細胞におけるオフターゲット開裂活性のレベルが低下し得る。ｍＲＮＡとしてのＣａｓ９の送達はタンパク質に翻訳されるまでに時間がかかるため、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを送達した数時間後にガイドＲＮＡを送達して、Ｃａｓ９タンパク質との相互作用に利用可能なガイドＲＮＡのレベルを最大化することが有利であり得る。

【０８３８】

ガイドＲＮＡの量が限られている状況では、Ｃａｓ９をｍＲＮＡとして導入し、かつガイドＲＮＡを、ガイドＲＮＡの発現をドライブするプロモーターを含むＤＮＡ発現カセットの形態で導入することが望ましい場合もある。このようにして利用可能なガイドＲＮＡの量を転写によって増幅し得る。

【０８３９】

Ｃａｓ９（ＤＮＡまたはＲＮＡ）およびガイドＲＮＡ（ＤＮＡまたはＲＮＡ）を宿主細胞に導入するため種々の送達系を導入することができる。これには、リポソーム、ウイルスベクター、エレクトロポレーション、ナノ粒子、ナノワイヤ（Ｓｈａｌｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｎｏ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，２０１２）、エキソソームの使用が含まれる。分子トロイの木馬リポソーム（Ｐａｒｄｒｉｄｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂ　Ｐｒｏｔｏｃ；２０１０；ｄｏｉ：１０．１１０１／ｐｄｂ．ｐｒｏｔ５４０７）を使用して、Ｃａｓ９およびガイドＲＮＡを血液脳関門を越えて送達してもよい。

【０８４０】

実施例２８：トリヌクレオチドリピート障害の治療戦略

本出願で既述したとおり、ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチドは複数の疾患関連遺伝子およびポリヌクレオチドを含んでもよく、それらの疾患関連遺伝子の一部はトリヌクレオチドリピート障害と称される（またトリヌクレオチドリピート伸長障害、トリプレットリピート伸長障害またはコドン反復障害とも称される）一連の遺伝的障害に属し得る。

【０８４１】

これらの疾患は、特定の遺伝子のトリヌクレオチドリピートが正常な安定閾値（通常は遺伝子の点で異なり得る）を超える突然変異により引き起こされる。リピート伸長障害の発見が増えるにつれ、これらの障害を、根底にある類似した特性に基づきいくつかのカテゴリーに分類することが可能となっている。特定の遺伝子のタンパク質コード部分におけ

るＣＡＧリピート伸長によって引き起こされるハンチントン病（ＨＤ）および脊髄小脳失調症は、カテゴリーＩに含められる。伸長を有する疾患または障害であって、その表現型が多様になる傾向のある、かつ伸長が通常は規模が小さく、遺伝子のエクソンにも認められるものは、カテゴリーＩＩに含められる。カテゴリーＩＩＩは、カテゴリーＩまたはＩＩと比べてはるかに大きいリピート伸長によって特徴付けられ、かつ概してタンパク質コード領域の外側に位置する障害または疾患を含む。カテゴリーＩＩＩ疾患または障害の例には、限定はされないが、脆弱Ｘ症候群、筋強直性ジストロフィー、脊髄小脳失調症と、若年性ミオクローヌスてんかんと、フリードライヒ失調症とのうちの２つが含まれる。

【０８４２】

以下でフリードライヒ失調症に関して言及するものなどの、同様の治療戦略を取り入れて、さらに他のトリヌクレオチドリピートまたは伸長障害にも対処し得る。例えば、ほぼ同一の戦略を用いて治療することのできる別のトリプルリピート疾患は、３’ＵＴＲに伸長したＣＴＧモチーフがある筋強直性ジストロフィー１型（ＤＭ１）である。フリードライヒ失調症においては、疾患はフラタキシン（ＦＸＮ）の最初のイントロンにおけるＧＡＡトリヌクレオチドの伸長により生じる。ＣＲＩＳＰＲを使用した一つの治療戦略は、最初のイントロンからＧＡＡリピートを切り出すことである。伸長したＧＡＡリピートはＤＮＡ構造に影響を及ぼすと考えられ、ヘテロクロマチンの形成の動員がもたらされてフラタキシン遺伝子がオフになる（図３２Ａ）。

【０８４３】

他の治療戦略と比べて競争力のある利点を以下に列挙する：

疾患がフラタキシンの発現低下に起因するため、この場合にｓｉＲＮＡノックダウンは適用できない。ウイルス遺伝子療法が現在調査されている。動物モデルにおいてＨＳＶ－１ベースのベクターを使用してフラタキシン遺伝子が送達され、治療効果が示されている。しかしながら、ウイルスベースのフラタキシン送達の長期有効性は、いくつかの問題を抱えている：第一に、フラタキシンの発現を健常者の天然レベルに一致するように調節することが困難であり、第二に、フラタキシンの長期過剰発現は細胞死を引き起こす。

【０８４４】

ヌクレアーゼを使用してＧＡＡリピートを切り出すことにより健常な遺伝子型を回復し得るが、ジンクフィンガーヌクレアーゼおよびＴＡＬＥＮ戦略は、高い有効性のヌクレアーゼの２つのペアを送達する必要があり、これは送達ならびにヌクレアーゼのエンジニアリングの両方にとって困難である（ＺＦＮまたはＴＡＬＥＮによるゲノムＤＮＡの効率的な切り出しは達成が困難である）。

【０８４５】

上記の戦略とは対照的に、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系には明らかな利点がある。Ｃａｓ９酵素は効率性が高く、かつ多重化し易い、つまり１つ以上の標的を同時に設定し得るということになる。これまでのところ、ゲノムＤＮＡの効率的な切り出しはＣａｓ９によるとヒト細胞で３０％を超え、３０％もの高さであることもあり、将来改善され得る。さらに、ハンチントン病（ＨＤ）のような特定のトリヌクレオチドリピート障害に関しては、２つのアレル間に違いがある場合にコード領域におけるトリヌクレオチドリピートが対処され得る。具体的には、ＨＤ患者が突然変異体ＨＴＴに関してヘテロ接合であり、かつ野生型と突然変異体とのＨＴＴアレル間にＳＮＰなどのヌクレオチドの違いがある場合、Ｃａｓ９を使用して突然変異体ＨＴＴアレルを特異的に標的化し得る。ＺＦＮまたはＴＡＬＥＮは、一塩基の違いに基づく２つのアレルを区別する能力を有しないであろう。

【０８４６】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９酵素を使用してフリードライヒ失調症に対処する戦略を採るにおいて、本出願人らは、ＧＡＡ伸長に隣接する部位を標的にする複数のガイドＲＮＡを設計し、最も効率性および特異性が高いものを選択する（図３２Ｂ）。

【０８４７】

本出願人らは、ＦＸＮのイントロン１を標的にするガイドＲＮＡとＣａｓ９との組み合わせを送達することにより、ＧＡＡ伸長領域の切り出しを媒介する。ＡＡＶ９を使用して

Ｃａｓ９のおよび脊髄における効率的な送達を媒介し得る。
【０８４８】
ＧＡＡ伸長に隣接するＡｌｕエレメントが重要であると考えられる場合、標的にすることのできる部位の数に制約があり得るが、本出願人らはＡｌｕエレメントの破壊を回避する戦略を採り得る。
【０８４９】
代替的戦略：
Ｃａｓ９を使用してゲノムを改変するよりむしろ、本出願人らはまた、Ｃａｓ９（ヌクレアーゼ活性欠損）ベースのＤＮＡ結合ドメインを使用して転写活性化ドメインをＦＸＮ遺伝子にターゲティングすることでＦＸＮ遺伝子を直接活性化し得る。本出願人らは、Ｃａｓ９媒介性の人為的な転写活性化のロバスト性について取り組み、それが他の方法と比較して十分にロバストであることを確実にする必要があり得る（Ｔｒｅｍｂｌａｙ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ｉｎｄｕｃｅ ｔｈｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｆｒａｔａｘｉｎ Ｇｅｎｅ；Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ．Ａｕｇｕｓｔ ２０１２，２３（８）：８８３－８９０）。
【０８５０】
実施例２９：Ｃａｓ９ニッカーゼを使用してオフターゲット開裂を最小限に抑えるための戦略
本出願において既述したとおり、Ｃａｓ９を、以下の１つ以上の突然変異を介して一本鎖開裂を媒介し得るように突然変異させ得る：Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、およびＨ８４０Ａ。
【０８５１】
ＮＨＥＪによる遺伝子ノックアウトを媒介するため、本出願人らはニッカーゼバージョンのＣａｓ９を２つのガイドＲＮＡと共に使用する。各個別のガイドＲＮＡによるオフターゲットニッキングは主に突然変異を伴わず修復されてもよく、二本鎖切断（ＮＨＥＪによる突然変異を生じさせ得る）は、標的部位が互いに隣接するときに限り起こる。二重ニッキングにより導入される二本鎖切断は平滑末端ではないため、ＴＲＥＸ１などの末端プロセシング酵素の同時発現がＮＨＥＪ活性レベルを増加させ得る。
【０８５２】
以下の表形式の標的リストは、以下の疾患に関与する遺伝子に対するものである：
ラフォラ病－ニューロンにおけるグリコーゲンを低下させるための標的ＧＳＹ１またはＰＰＰ１Ｒ３Ｃ（ＰＴＧ）。
【０８５３】
高コレステロール血症－標的ＰＣＳＫ９
標的配列をペア（ＬおよびＲ）で列挙し、ここではスペーサーにおけるヌクレオチドの数は異なる（０～３ｂｐ）。各スペーサーそれ自体を野生型Ｃａｓ９と共に使用して標的遺伝子座に二本鎖切断を導入し得る。
【０８５４】

【表３９】

			(配列番号__)
GYS1 (ヒト)	GGCC-L	ACCCTTGTTAGCCACCTCCC	
	GGCC-R	GAACGCAGTGCTCTTCGAAG	
	GGNCC-L	CTCACGCCCTGCTCCGTGTA	
	GGNCC-R	GGCGACAACTACTTCCTGGT	
	GGNNCC-L	CTCACGCCCTGCTCCGTGTA	
	GGNNCC-R	GGGCGACAACTACTTCCTGG	
	GGNNNCC-L	CCTCTTCAGGGCCGGGGTGG	
	GGNNNCC-R	GAGGACCCAGGTGGAACTGC	
PCSK9 (ヒト)	GGCC-L	TCAGCTCCAGGCGGTCCTGG	
	GGCC-R	AGCAGCAGCAGCAGTGGCAG	
	GGNCC-L	TGGGCACCGTCAGCTCCAGG	
	GGNCC-R	CAGCAGTGGCAGCGGCCACC	
	GGNNCC-L	ACCTCTCCCCTGGCCCTCAT	
	GGNNCC-R	CCAGGACCGCCTGGAGCTGA	
	GGNNNCC-L	CCGTCAGCTCCAGGCGGTCC	
	GGNNNCC-R	AGCAGCAGCAGCAGTGGCAG	
PPP1R3C (PTG) (ヒト)	GGCC-L	ATGTGCCAAGCAAAGCCTCA	
	GGCC-R	TTCGGTCATGCCCGTGGATG	
	GGNCC-L	GTCGTTGAAATTCATCGTAC	
	GGNCC-R	ACCACCTGTGAAGAGTTTCC	
	GGNNCC-L	CGTCGTTGAAATTCATCGTA	
	GGNNCC-R	ACCACCTGTGAAGAGTTTCC	
Gys1 (マウス)	GGCC-L	GAACGCAGTGCTTTTCGAGG	
	GGCC-R	ACCCTTGTTGGCCACCTCCC	
	GGNCC-L	GGTGACAACTACTATCTGGT	
	GGNCC-R	CTCACACCCTGCTCCGTGTA	
	GGNNCC-L	GGGTGACAACTACTATCTGG	
	GGNNCC-R	CTCACACCCTGCTCCGTGTA	
	GGNNNCC-L	CGAGAACGCAGTGCTTTTCG	
	GGNNNCC-R	ACCCTTGTTGGCCACCTCCC	
PPP1R3C (PTG) (マウス)	GGCC-L	ATGAGCCAAGCAAATCCTCA	
	GGCC-R	TTCCGTCATGCCCGTGGACA	
	GGNCC-L	CTTCGTTGAAAACCATTGTA	
	GGNCC-R	CCACCTCTGAAGAGTTTCCT	
	GGNNCC-L	CTTCGTTGAAAACCATTGTA	
	GGNNCC-R	ACCACCTCTGAAGAGTTTCC	
	GGNNNCC-L	CTTCCACTCACTCTGCGATT	
	GGNNNCC-R	ACCATGTCTCAGTGTCAAGC	
PCSK9 (マウス)	GGCC-L	GGCGGCAACAGCGGCAACAG	
	GGCC-R	ACTGCTCTGCGTGGCTGCGG	
	GGNNCC-L	CCGCAGCCACGCAGAGCAGT	
	GGNNCC-R	GCACCTCTCCTCGCCCCGAT	

【０８５５】

ガイドＲＮＡの安定性を向上させかつ特異性を増加させるための代替的戦略

１．ガイドＲＮＡの５’におけるヌクレオチドは、天然ＲＮＡのようなリン酸エステル結合よりむしろ、チオールエステル結合で連結され得る。チオールエステル結合は、内因性ＲＮＡ分解機構によるガイドＲＮＡの消化を防止し得る。

【０８５６】

２．ガイドＲＮＡのガイド配列（５’２０ｂｐ）におけるヌクレオチドは、結合特異性を改善するためのベースとして架橋核酸（ｂｒｉｄｇｅｄ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ：ＢＮＡ）を使用することができる。

【０８５７】

実施例３０：迅速多重ゲノム編集用のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ

本発明の態様は、標的設計後３～４日以内に遺伝子改変の効率および特異性を試験することができ、かつ２～３週間以内に改変されたクローン細胞系を得ることができるプロトコルおよび方法に関する。

【０８５８】

プログラム可能なヌクレアーゼは、ゲノムエンジニアリングを高精度で媒介するのに強力な技術である。微生物ＣＲＩＳＰＲ適応免疫系由来のＲＮＡガイドＣａｓ９ヌクレアーゼを使用して、単純にそのガイドＲＮＡにおいて２０ｎｔターゲティング配列を指定することにより真核細胞における効率的なゲノム編集を促進することができる。本出願人らは、哺乳類細胞における効率的なゲノム編集を促進し、かつ下流機能性研究用の細胞系を作成するためＣａｓ９を応用する一組のプロトコルを記載する。標的設計から始めて３～４日以内に効率的かつ特異的な遺伝子改変を達成することができ、かつ２～３週間以内に改変されたクローン細胞系を得ることができる。

【０８５９】

生体系および生物をエンジニアリングする能力は、基礎科学、医薬、およびバイオテクノロジー全域にわたる非常に大きな適用可能性を有している。ここで、内在性ゲノム遺伝子座の正確な編集を促進するプログラム可能な配列特異的エンドヌクレアーゼが、これまで遺伝学的に扱い易くなかったものを含め、広範囲の種における遺伝的エレメントおよび原因遺伝子変異の体系的調査を可能にする。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、およびＲＮＡガイドＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼシステムを含め、多くのゲノム編集技術が近年出現している。最初の２つの技術は、エンドヌクレアーゼ触媒ドメインをモジュール式ＤＮＡ結合タンパク質にテザー係留して、特定のゲノム遺伝子座に標的ＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）を誘導するという共通した戦略を用いる。対照的に、Ｃａｓ９は、標的ＤＮＡとのワトソン・クリック型塩基対合を介して小さいＲＮＡにガイドされるヌクレアーゼであり、設計が容易で効率的な、かつ種々の細胞型および生物のハイスループットの多重化した遺伝子編集に良く適したシステムを呈する。ここで本出願人らは、最近開発されたＣａｓ９ヌクレアーゼを応用して哺乳類細胞における効率的なゲノム編集を促進し、かつ下流機能性研究用の細胞系を作成する一組のプロトコルを記載する。

【０８６０】

ＺＦＮおよびＴＡＬＥＮと同様に、Ｃａｓ９は標的ゲノム遺伝子座におけるＤＳＢを刺激することによりゲノム編集を促進する。Ｃａｓ９によって開裂されると、標的遺伝子座は２つの主要なＤＮＡ損傷修復経路であるエラープローン非相同末端結合（ＮＨＥＪ）経路または高フィデリティ相同性組換え修復（ＨＤＲ）経路のうちの一方を経る。いずれの経路を利用しても所望の編集結果を達成し得る。

【０８６１】

ＮＨＥＪ：修復テンプレートが存在しない場合、ＮＨＥＪプロセスはＤＳＢを再びライゲートし直し、これによりインデル突然変異の形態の傷跡が残り得る。コードエクソン内に現れるインデルはフレームシフト突然変異および未成熟終止コドンをもたらし得るため、このプロセスを利用して遺伝子ノックアウトを達成することができる。ゲノムにおいて大きい欠失を媒介するため複数のＤＳＢも利用し得る。

【０８６２】

ＨＤＲ：相同性組換え修復は、ＮＨＥＪの代替となる主要なＤＮＡ修復経路である。ＨＤＲは典型的にはＮＨＥＪと比べて起こる頻度が低いが、ＨＤＲを利用すると、外因的に導入された修復テンプレートの存在下で標的遺伝子座に正確な定義付けられた改変を作成し得る。修復テンプレートは、二本鎖ＤＮＡの形態であって、挿入配列に隣接する相同性

アームを含む従来のＤＮＡターゲティング構築物と同様に設計されてもよく、あるいは一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）の形態であってもよい。後者は、原因遺伝子変異を探索するための単一のヌクレオチド突然変異の導入など、ゲノムに小さい編集を作製するための有効かつ単純な方法を提供する。ＮＨＥＪと異なり、ＨＤＲは概して分裂細胞においてのみ活性であり、その効率は細胞型および細胞状態に応じて変化する。

【０８６３】

ＣＲＩＳＰＲの概要：ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、対照的に、Ｃａｓ９ヌクレアーゼと低分子ガイドＲＮＡとからなる最小でも二成分系である。Ｃａｓ９を異なる遺伝子座にターゲティングし直し、または複数の遺伝子を同時に編集するために必要なことは、単純に、異なる２０ｂｐオリゴヌクレオチドのクローニングである。Ｃａｓ９ヌクレアーゼの特異性は未だ完全には解明されていないが、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の単純なワトソン・クリック型塩基対合はＺＦＮまたはＴＡＬＥＮドメインのそれより予測可能性が高いように思われる。

【０８６４】

ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ（クラスター化等間隔短鎖回分リピート）は、Ｃａｓ９を使用して外来性遺伝子エレメントを開裂する細菌適応免疫系である。Ｃａｓ９は、可変的ｃｒＲＮＡと必須の補助的ｔｒａｃｒＲＮＡとの非コードＲＮＡのペアによりガイドされる。ｃｒＲＮＡは、ワトソン・クリック型塩基対合で標的ＤＮＡの位置を特定することにより特異性を決定する２０ｎｔガイド配列を含む。天然の細菌系では複数のｃｒＲＮＡが共転写され、Ｃａｓ９を種々の標的に向けさせる。化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）に由来するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系では、標的ＤＮＡが５’－ＮＧＧ／ＮＲＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）（他のＣＲＩＳＰＲ系については異なり得る）の直前になければならない。

【０８６５】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓは、哺乳類細胞ではヒトコドン最適化Ｃａｓ９および必須のＲＮＡ成分の異種発現により再構成される。さらに、ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡとを融合してキメラの合成ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を作り出すことができる。このように、ｓｇＲＮＡ内の２０ｎｔガイド配列を変えることにより、目的とするいかなる標的にもＣａｓ９を仕向け直すことができる。

【０８６６】

その実現の容易さおよび多重化可能性を所与として、Ｃａｓ９は、ＮＨＥＪおよびＨＤＲの両方による特定の突然変異を担持するエンジニアリングされた真核細胞の作成に用いられてきた。加えて、ｓｇＲＮＡおよびＣａｓ９をコードするｍＲＮＡの胚への直接注入が、複数の改変アレルを有するトランスジェニックマウスの迅速な作成を可能にしている；これらの結果は、本来遺伝的に扱いが困難な生物の編集に有望である。

【０８６７】

その触媒ドメインの１つに破壊を有する突然変異体Ｃａｓ９が、ＤＮＡを開裂するというよりむしろそれにニックを入れるようにエンジニアリングされており、一本鎖切断およびＨＤＲによる優先的修復が可能となって、オフターゲットＤＳＢによる望ましくないインデル突然変異が潜在的に改良されている。加えて、突然変異したＤＮＡ開裂触媒残基を両方ともに有するＣａｓ９突然変異体が、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）における転写調節を可能にするように適合されており、多様な適用に合わせてＣａｓ９を機能性にし得る可能性を実証している。本発明の特定の態様は、ヒト細胞の多重編集用Ｃａｓ９の構築および適用に関する。

【０８６８】

本出願人らは、真核生物遺伝子編集を促進するため核局在化配列が隣接するヒトコドン最適化Ｃａｓ９を提供している。本出願人らは、２０ｎｔガイド配列を設計するに当たっての考慮点、ｓｇＲＮＡの迅速な構築および機能検証プロトコル、および最後に、Ｃａｓ９ヌクレアーゼを使用したヒト胎児腎臓系（ＨＥＫ－２９３ＦＴ）およびヒト幹細胞系（ＨＵＥＳ９）におけるＮＨＥＪベースおよびＨＤＲベースの両方のゲノム改変の媒介を記

載する。このプロトコルは他の細胞型および生物にも同様に適用することができる。

【０８６９】

ｓｇＲＮＡの標的選択：遺伝子ターゲティング用の２０ｎｔガイド配列の選択には、２つの主な考慮点がある：１）化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９については標的配列が５’－ＮＧＧ　ＰＡＭの前になければならず、および２）ガイド配列はオフターゲット活性を最小限に抑えるように選択されなければならない。本出願人らは、目的の入力配列を取り込み好適な標的部位を同定するオンラインＣａｓ９ターゲティング設計ツールを提供した。各ｓｇＲＮＡについてオフターゲット改変を実験的に評価するため、本出願人らはまた、塩基対合ミスマッチのアイデンティティ、位置、および分布の効果に関する本出願人らの定量的特異性分析に従い順位が付けられた、意図する各標的についての計算的に予測されたオフターゲット部位も提供する。

【０８７０】

計算的に予測されたオフターゲット部位に関する詳細情報は以下のとおりである：

オフターゲット開裂活性の考慮点：他のヌクレアーゼと同様に、Ｃａｓ９は低い頻度でゲノムにおけるオフターゲットＤＮＡ標的を開裂し得る。所与のガイド配列がオフターゲット活性を呈する程度は、酵素濃度、用いられる特定のガイド配列の熱力学、および標的ゲノムにおける同様の配列の存在量を含めた複合的な要因に依存する。Ｃａｓ９の常法の適用については、オフターゲット開裂の程度を最小限に抑えるとともに、オフターゲット開裂の存在を検出可能である方法を考慮することが重要である。

【０８７１】

オフターゲット活性の最小化：細胞系における適用について、本出願人らは、以下の２ステップでオフターゲットゲノム改変の程度を低下させることを推奨する。第一に、本発明者らのオンラインＣＲＩＳＰＲ標的選択ツールを使用して、所与のガイド配列がオフターゲット部位を有する可能性を計算的に評価することが可能である。このような分析は、ガイド配列と同様の配列であるオフターゲット配列に関してゲノムを網羅的に検索することにより実施される。ｓｇＲＮＡとその標的ＤＮＡとの間のミスマッチ塩基の効果の包括的な実験研究から、ミスマッチの許容範囲は、１）位置依存性－ガイド配列の３’末端側８～１４ｂｐは、５’塩基と比べてミスマッチに対する許容度が低い、２）数量依存性－一般に３個より多いミスマッチは許容されない、３）ガイド配列依存性－一部のガイド配列は他と比べてミスマッチに対する許容度が低い、および４）濃度依存性－オフターゲット開裂は形質移入されたＤＮＡの量に対する感度が極めて高いことが明らかになった。本出願人らの標的部位分析ウェブツール（ウェブサイトｇｅｎｏｍｅ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．ｏｒｇ／ｔｏｏｌｓで利用可能）は、これらの基準を統合し、標的ゲノムにおける推定オフターゲット部位の予測を提供する。第二に、本出願人らは、Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡ発現プラスミドの量をタイトレートしてオフターゲット活性を最小限に抑えることを推奨する。

【０８７２】

オフターゲット活性の検出：本出願人らのＣＲＩＳＰＲターゲティングウェブツールを使用して、最も可能性の高いオフターゲット部位ならびにそれらの部位のＳＵＲＶＥＹＯＲまたはシーケンシング分析を実施するプライマーのリストを作成することが可能である。Ｃａｓ９を使用して作成されるアイソジェニッククローンについて、本出願人らは、これらの候補オフターゲット部位のシーケンシングにより任意の望ましくない突然変異を調べることを強く推奨する。予測された候補リストに含まれない部位にオフターゲット改変があり得ることは注記に値し、完全なゲノム配列を実施してオフターゲット部位がないことを完全に確かめるべきである。さらに、同じゲノム内にいくつかのＤＳＢが誘導される多重アッセイでは、低率の転座イベントがあり得、ディープシーケンシングなどの種々の技法を用いて評価され得る。

【０８７３】

本オンラインツールは、１）ｓｇＲＮＡ構築物の調製、２）標的改変効率のアッセイ、および３）潜在的なオフターゲット部位における開裂の評価に必要なあらゆるオリゴおよ

びプライマーの配列を提供する。ｓｇＲＮＡの発現に使用されるＵ６　ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターは、その転写物の最初の塩基としてグアニン（Ｇ）ヌクレオチドを好むため、２０ｎｔガイド配列がＧから始まらないｓｇＲＮＡの５’に追加のＧが付加されることは注記に値する。

【０８７４】

ｓｇＲＮＡの構築および送達手法：所望の適用に応じて、ｓｇＲＮＡは、１）発現カセットを含有するＰＣＲアンプリコン、または２）ｓｇＲＮＡ発現プラスミドのいずれかとして送達され得る。ＰＣＲベースのｓｇＲＮＡ送達は、Ｕ６プロモーターテンプレートの増幅に使用されるリバースＰＣＲプライマーにカスタムのｓｇＲＮＡ配列を付加する。得られるアンプリコンが、Ｃａｓ９含有プラスミド（ＰＸ１６５）と同時形質移入され得る。この方法は、ｓｇＲＮＡコードプライマーを得て僅か数時間後に機能性試験用の細胞形質移入を実施することができるため、複数の候補ｓｇＲＮＡの迅速スクリーニングに最適である。この単純な方法ではプラスミドベースのクローニングおよび配列検証が不要となるため、大規模なノックアウトライブラリの作成または他のスケールに影響される適用のため多数のｓｇＲＮＡを試験しまたは同時形質移入することに良く適している。プラスミドベースのｓｇＲＮＡ送達に必要な約２０ｂｐオリゴと比較して、ｓｇＲＮＡコードプライマーが１００ｂｐを超える点は留意すべきである。

【０８７５】

ｓｇＲＮＡ用の発現プラスミドの構築もまた単純かつ高速であり、部分的に相補的なオリゴヌクレオチドのペアによる単一のクローニングことを含む。オリゴペアのアニーリング後、得られるガイド配列が、Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡ配列の残り部分を有する不変の足場の両方を有するプラスミド（ＰＸ３３０）に挿入され得る。形質移入プラスミドもまた、インビボ送達用のウイルス産生を可能にするように改変され得る。

【０８７６】

ＰＣＲおよびプラスミドベースの送達に加え、Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡの両方をＲＮＡとして細胞に導入することができる。

【０８７７】

修復テンプレートの設計：従来、標的ＤＮＡ改変は、変化させる部位に隣接する相同性アームを含むプラスミドベースのドナー修復テンプレートを使用する必要があった。両側の相同性アームの長さは様々であってもよいが、典型的には５００ｂｐより長い。この方法を使用して、蛍光タンパク質または抗生物質耐性マーカーなどのレポーター遺伝子の挿入を含む大きい改変を作成することができる。ターゲティングプラスミドの設計および構築は、他の部分に記載されている。

【０８７８】

最近になって、クローニングを含まない定義付けられた遺伝子座の範囲内の短い改変には、ターゲティングプラスミドの代わりに一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）が使用されている。高いＨＤＲ効率を達成するため、ｓｓＯＤＮは標的領域と相同の少なくとも４０ｂｐのフランキング配列を両側に含み、標的遺伝子座に対してセンス方向にも、またはアンチセンス方向にも向くことができる。

【０８７９】

機能性試験

ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ：本出願人らは、ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ（またはＰＣＲアンプリコンシーケンシングのいずれかによりインデル突然変異を検出した。本出願人らのオンラインＣＲＩＳＰＲ標的設計ツールは、両方の手法に推奨されるプライマーを提供する。しかしながら、ＳＵＲＶＥＹＯＲまたはシーケンシングプライマーはまた、ゲノムＤＮＡから目的の領域を増幅し、かつ非特異的なアンプリコンを回避するようにＮＣＢＩプライマーＢｌａｓｔを使用して手動で設計されてもよい。ＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーは、ゲル電気泳動による開裂バンドの明確な可視化を可能にするため、Ｃａｓ９標的の両側で３００～４００ｂｐ（６００～８００ｂｐの総アンプリコンに対して）を増幅するように設計されなければならない。過剰なプライマー二量体形成

を防ぐため、ＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーは、典型的には融解温度が約６０℃の２５ｎｔ長未満であるように設計されなければならない。本出願人らは、特定のＰＣＲアンプリコンに対する候補プライマーの各ペアを試験し、ならびにＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼ消化プロセスの間に非特異的な開裂が存在しないことについても試験することを推奨する。

【０８８０】

プラスミド媒介性またはｓｓＯＤＮ媒介性ＨＤＲ：ＨＤＲは改変領域のＰＣＲ増幅およびシーケンシングにより検出することができる。この目的上、ＰＣＲプライマーは、残存する修復テンプレート（ＨＤＲ　ＦｗｄおよびＲｅｖ、図３０）の誤検出を回避するため相同性アームが広がる領域の外側にアニールしなければならない。ｓｓＯＤＮ媒介性ＨＤＲはＳＵＲＶＥＹＯＲ　ＰＣＲプライマーを使用することができる。

【０８８１】

シーケンシングによるインデルまたはＨＤＲの検出：本出願人らは、サンガー法または次世代ディープシーケンシング（ＮＧＳ）のいずれかにより標的ゲノム改変を検出した。前者については、ＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーまたはＨＤＲプライマーのいずれかを使用して改変領域からゲノムＤＮＡを増幅することができる。アンプリコンは、形質転換のためｐＵＣ１９などのプラスミドにサブクローニングしなければならない；個々のコロニーをシーケンシングすることによりクローン遺伝子型を明らかにすることができる。

【０８８２】

本出願人らは、より短いアンプリコン用の次世代シーケンシング（ＮＧＳ）プライマーを、典型的には１００～２００ｂｐのサイズ範囲で設計した。ＮＨＥＪ突然変異の検出には、より長いインデルの検出が可能であるように、プライミング領域とＣａｓ９標的部位との間が少なくとも１０～２０ｂｐのプライマーを設計することが重要である。本出願人らは、多重ディープシーケンシング用のバーコード付きアダプターを取り付ける二段階ＰＣＲ法に関する指針を提供する。本出願人らは、偽陽性インデルレベルが全般的に低いことから、Ｉｌｌｕｍｉｎａプラットフォームを推奨する。次に、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ、または単純な配列解析スクリプトなどのリードアラインメントプログラムを用いてオフターゲット分析（先述した）を実施することができる。

【０８８３】

材料および試薬

ｓｇＲＮＡ調製：

超高純度ＤＮアーゼＲＮアーゼ不含蒸留水（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０９７７－０２３）

Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ融合ポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号６００６７９）

重要。標準Ｔａｑポリメラーゼ、これは３’－５’エキソヌクレアーゼ校正活性を欠いており、フィデリティが低く、増幅エラーをもたらし得る。Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩは高フィデリティポリメラーゼ（Ｐｆｕと同等のフィデリティ）であり、最小限の最適化で高収率のＰＣＲ産物を生じる。他の高フィデリティポリメラーゼに代えてもよい。

【０８８４】

Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ反応緩衝液（５×；Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ポリメラーゼと同梱）

ｄＮＴＰ溶液ミックス（各２５ｍＭ；Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ、カタログ番号Ｎ２０５Ｌ）

ＭｇＣｌ２（２５ｍＭ；ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ｒ０９７１）

ＱＩＡｑｕｉｃｋゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号２８７０４）

ＱＩＡｐｒｅｐ　ｓｐｉｎミニプレップキット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号２７１０６）

超高純度ＴＢＥ緩衝液（１０×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１５５８１－０２８）

ＳｅａＫｅｍ　ＬＥアガロース（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号５０００４）

ＳＹＢＲ　Ｓａｆｅ　ＤＮＡ染色（１０，０００×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅ

ｓ、カタログ番号Ｓ３３１０２）
１ｋｂ　Ｐｌｕｓ　ＤＮＡラダー（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０７８７－０１８）
ＴｒａｃｋＩｔ　ＣｙａｎＯｒａｎｇｅローディング緩衝液（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０４８２－０２８）
ＦａｓｔＤｉｇｅｓｔ　ＢｂｓＩ（ＢｐｉＩ）（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ／ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＦＤ１０１４）
Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ　Ｔａｎｇｏ緩衝液（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ／ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＢＹ５）
ＤＬ－ジチオスレイトール（ＤＴＴ；Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ／ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ｒ０８６２）
Ｔ７　ＤＮＡリガーゼ（Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ、カタログ番号Ｌ６０２Ｌ）
重要：より一般的に用いられるＴ４リガーゼを代用しないこと。Ｔ７リガーゼは付着末端で平滑末端と比べて１，０００倍高い活性を有し、かつ市販の高濃度Ｔ４リガーゼと比べて全体的な活性が高い。
【０８８５】
Ｔ７　２×迅速ライゲーション緩衝液（Ｔ７　ＤＮＡリガーゼと同梱、Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ、カタログ番号Ｌ６０２Ｌ）
Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｍ０２０１Ｓ）
Ｔ４ＤＮＡリガーゼ反応緩衝液（１０×；Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｂ０２０２Ｓ）
アデノシン５’－三リン酸（１０ｍＭ；Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｐ０７５６Ｓ）
ＰｌａｓｍｉｄＳａｆｅ　ＡＴＰ依存性ＤＮアーゼ（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ、カタログ番号Ｅ３１０１Ｋ）
Ｏｎｅ　Ｓｈｏｔ　Ｓｔｂｌ３化学的コンピテント大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）（Ｅ．ｃｏｌｉ）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｃ７３７３－０３）
ＳＯＣ培地（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｂ９０２０Ｓ）
ＬＢ培地（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｌ３０２２）
ＬＢ寒天培地（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｌ２８９７）
アンピシリン、滅菌ろ過済み（１００ｍｇ　ｍｌ－１；Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ａ５３５４）
哺乳類細胞培養：
ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｒ７００－０７）
ダルベッコ最小イーグル培地（ＤＭＥＭ、１×、高グルコース；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０３１３－０３９）
ダルベッコ最小イーグル培地（ＤＭＥＭ、１×、高グルコース、フェノールレッド不含；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号３１０５３－０２８）
ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ、１×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１４１９０－２５０）
ウシ胎仔血清、適格品（ｑｕａｌｉｆｉｅｄ）かつ熱失活済み（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０４３８－０３４）
Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ　Ｉ低血清培地（ＦＢＳ；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１１０５８－０２１）
ペニシリン－ストレプトマイシン（１００×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１５１４０－１６３）
ＴｒｙｐＬＥ（商標）Ｅｘｐｒｅｓｓ（１×、フェノールレッド不含；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃ

ｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１２６０４－０１３）
リポフェクタミン２０００形質移入試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１１６６８０２７）
Ａｍａｘａ　ＳＦ細胞系４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）ＸキットＳ（３２　ＲＣＴ；Ｌｏｎｚａ、カタログ番号Ｖ４ＸＣ－２０３２）
ＨＵＥＳ　９細胞系（ＨＡＲＶＡＲＤ　ＳＴＥＭ　ＣＥＬＬ　ＳＣＩＥＮＣＥ）
Ｇｅｌｔｒｅｘ　ＬＤＥＶ不含低成長因子基底膜マトリックス（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ａ１４１３２０１）
ｍＴｅＳＲ１培地（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号０５８５０）
Ａｃｃｕｔａｓｅ細胞剥離液（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号０７９２０）
ＲＯＣＫ阻害薬（Ｙ－２７６３２；Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号ＳＣＭ０７５）
Ａｍａｘａ　Ｐ３初代細胞４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）ＸキットＳ（３２　ＲＣＴ；Ｌｏｎｚａカタログ番号Ｖ４ＸＰ－３０３２）
【０８８６】
遺伝子型解析：
ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ　ＤＮＡ抽出溶液（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ、カタログ番号ＱＥ０９０５０）
ＳＵＲＶＥＹＯＲ、ＲＦＬＰ分析、またはシーケンシング用のＰＣＲプライマー（プライマー表参照）
Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ融合ポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号６００６７９）
重要。Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイは一塩基ミスマッチの感度を有するため、高フィデリティポリメラーゼを使用することが特に重要である。他の高フィデリティポリメラーゼに代えてもよい。
【０８８７】
　Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ反応緩衝液（５×；Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ポリメラーゼと同梱）
ｄＮＴＰ溶液ミックス（各２５ｍＭ；Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ、カタログ番号Ｎ２０５Ｌ）
ＱＩＡｑｕｉｃｋゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号２８７０４）
Ｔａｑ緩衝液（１０×；Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ、カタログ番号Ｂ０００５）
標準ゲル電気泳動用のＳＵＲＶＥＹＯＲ突然変異検出キット（Ｔｒａｎｓｇｅｎｏｍｉｃ、カタログ番号７０６０２５）
超高純度ＴＢＥ緩衝液（１０×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１５５８１－０２８）
ＳｅａＫｅｍ　ＬＥアガロース（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号５０００４）
４～２０％ＴＢＥゲル　１．０ｍｍ、１５ウェル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号ＥＣ６２２５５ＢＯＸ）
Ｎｏｖｅｘ（登録商標）高密度ＴＢＥ試料緩衝液（５×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号ＬＣ６６７８）
ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ核酸ゲル染色（１０，０００×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｓ－１１４９４）
１ｋｂ　Ｐｌｕｓ　ＤＮＡラダー（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０７８７－０１８）
ＴｒａｃｋＩｔ　ＣｙａｎＯｒａｎｇｅローディング緩衝液（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０４８２－０２８）
ＦａｓｔＤｉｇｅｓｔ　ＨｉｎｄＩＩＩ（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ／ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＦＤ０５０４）
【０８８８】

機器
フィルター付き滅菌ピペットチップ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）
標準１．５ｍｌ微量遠心管（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ、カタログ番号００３０　１２５．１５０）
Ａｘｙｇｅｎ９６ウェルＰＣＲプレート（ＶＷＲ、カタログ番号ＰＣＲ－９６Ｍ２－ＨＳＣ）
Ａｘｙｇｅｎ　８ストリップＰＣＲチューブ（Ｆｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１４－２２２－２５０）
Ｆａｌｃｏｎチューブ、ポリプロピレン、１５ｍｌ（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、カタログ番号３５２０９７）
Ｆａｌｃｏｎチューブ、ポリプロピレン、５０ｍｌ（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、カタログ番号３５２０７０）
細胞ストレーナーキャップ付き丸底チューブ、５ｍｌ（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、カタログ番号３５２２３５）
ペトリ皿（６０ｍｍ×１５ｍｍ；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号３５１００７）
組織培養プレート（２４ウェル；ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、カタログ番号３５３０４７）
組織培養プレート（９６ウェル、平底；ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、カタログ番号３５３０７５）
組織培養皿（１００ｍｍ；ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、３５３００３）
プログラム可能な温度ステッピング機能付き９６ウェルサーモサイクラー（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｖｅｒｉｔｉ、カタログ番号４３７５７８６）。
【０８８９】
卓上微量遠心機５４２４、５８０４（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）
ゲル電気泳動システム（ＰｏｗｅｒＰａｃ　ｂａｓｉｃ　ｐｏｗｅｒ　ｓｕｐｐｌｙ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号１６４－５０５０、およびＳｕｂ－Ｃｅｌｌ　ＧＴシステムゲルトレー、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号１７０－４４０１）
Ｎｏｖｅｘ　ＸＣｅｌｌ　ＳｕｒｅＬｏｃｋ　Ｍｉｎｉ－Ｃｅｌｌ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号ＥＩ０００１）
デジタルゲルイメージングシステム（ＧｅｌＤｏｃ　ＥＺ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号１７０－８２７０、および青色試料トレー、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号１７０－８２７３）
青色光トランスイルミネーターおよびオレンジフィルターゴーグル（ＳａｆｅＩｍａｇｅｒ　２．０；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｇ６６００）
ゲル定量化ソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、ＩｍａｇｅＬａｂ、ＧｅｌＤｏｃ　ＥＺと同梱、または国立衛生研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ）のオープンソースＩｍａｇｅＪ、ウェブサイトｒｓｂｗｅｂ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｉｊ／で利用可能）
紫外分光光度計（ＮａｎｏＤｒｏｐ　２０００ｃ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）
【０８９０】
試薬セットアップ
トリス－ホウ酸ＥＤＴＡ（ＴＢＥ）電気泳動溶液　ＴＢＥ緩衝液を蒸留水に希釈し、アガロースゲルをキャスティングするためおよびゲル電気泳動用緩衝液として使用するための１×ワーキング溶液とする。緩衝液は室温（１８～２２℃）で少なくとも１年間保存しておくことができる。
・ＡＴＰ、１０ｍＭ　１０ｍＭ　ＡＴＰを５０μｌアリコートに分け、－２０℃で最長１年間保存する；凍結－融解サイクルを繰り返すことは避ける。
・ＤＴＴ、１０ｍＭ　蒸留水中に１０ｍＭ　ＤＴＴ溶液を調製し、２０μｌアリコートとして－７０℃で最長２年間保存する；ＤＴＴは酸化し易いため、反応毎に新しいアリコー

トを使用する。
・Ｄ１０培養培地　ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を培養するため、ＤＭＥＭに１×　ＧｌｕｔａＭＡＸおよび１０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）ウシ胎仔血清を補給することによりＤ１０培養培地を調製する。プロトコルに示すとおり、この培地はまた１×ペニシリン－ストレプトマイシンを補給してもよい。Ｄ１０培地は前もって作製しておき、４℃で最長１ヶ月間保存することができる。
・ｍＴｅＳＲ１培養培地　ヒト胚性幹細胞の培養のため、５×サプリメント（ｍＴｅＳＲ１基本培地と同梱）、および１００ｕｇ／ｍｌ　Ｎｏｒｍｏｃｉｎを補給してｍＴｅＳＲ１培地を調製する。
【０８９１】
手順
ターゲティング成分の設計およびオンラインツールの使用・タイミング１日
　１｜標的ゲノムＤＮＡ配列を入力する。本出願人らは、目的の入力配列を受け取り、好適な標的部位を同定してそれに順位を付け、および意図する標的毎にオフターゲット部位を計算的に予測するオンラインＣａｓ９ターゲティング設計ツールを提供する。あるいは、任意の５’－ＮＧＧの直ちに上流で２０ｂｐ配列を同定することにより、ガイド配列を手動で選択してもよい。
【０８９２】
　２｜オンラインツールによって特定されるとおりの必要なオリゴおよびプライマーを注文する。部位を手動で選択する場合、オリゴおよびプライマーを設計しなければならない。
【０８９３】
ｓｇＲＮＡ発現構築物の調製
　３｜ｓｇＲＮＡ発現構築物を作成するため、ＰＣＲベースまたはプラスミドベースのいずれのプロトコルも用いることができる。
【０８９４】
（Ａ）ＰＣＲ増幅による・タイミング２時間
　（ｉ）本出願人らは希釈Ｕ６　ＰＣＲテンプレートを調製する。本出願人らはＰＸ３３０をＰＣＲテンプレートとして使用することを推奨するが、任意のＵ６含有プラスミドを同様にＰＣＲテンプレートとして使用することができる。本出願人らはテンプレートを１０ｎｇ／ｕｌの濃度となるようにddH_2Oで希釈した。Ｕ６によってドライブされるｓｇＲＮＡを既に含んでいるプラスミドまたはカセットがテンプレートとして使用される場合、ゲル抽出を実施して、産物が意図したｓｇＲＮＡのみを含み、テンプレートからのｓｇＲＮＡキャリーオーバーの痕跡を含まないことを確実にする必要がある点に留意されたい。
【０８９５】
　（ｉｉ）本出願人らは希釈ＰＣＲオリゴを調製した。Ｕ６－ＦｗｄおよびＵ６－ｓｇＲＮＡ－Ｒｅｖプライマーは、ddH_2O中１０ｕＭの最終濃度に希釈される（１０ｕｌの１００ｕＭプライマーを９０ｕｌ　ddH_2Oに添加する）。
【０８９６】
　（ｉｉｉ）Ｕ６－ｓｇＲＮＡ　ＰＣＲ反応。本出願人らは、各Ｕ６－ｓｇＲＮＡ－Ｒｅｖプライマーおよび必要に応じてマスターミックスに対して以下の反応をセットアップした：
【０８９７】

【表４０】

成分:	量 (ul)	最終濃度
Herculase II PCR 緩衝液, 5X	10	1X
dNTP, 100mM (各 25mM)	0.5	1 mM
U6 テンプレート (PX330)	1	0.2 ng/ul
U6-フォワードプライマー	1	0.2 uM
U6-sgRNA-リバースプライマー (可変)	1	0.2 uM
Herculase II 融合ポリメラーゼ	0.5	
蒸留水	36	
合計	50	

【０８９８】

（ｉｖ）本出願人らは、ステップ（ｉｉｉ）の反応物に対し、以下のサイクル条件を使用してＰＣＲ反応を実施した：

【０８９９】

【表４１】

サイクル数	変性	アニーリング	伸長
1	95°C, 2 分		
2-31	95°C, 20 秒	60°C, 20 秒	72°C, 20 秒
32			72°C, 3 分

【０９００】

（ｖ）反応の完了後、本出願人らは産物をゲル上で泳動させて、シングルバンドの増幅の成功を確かめた。１×ＳＹＢＲ　Ｓａｆｅ色素を含む１×ＴＢＥ緩衝液に２％（ｗｔ／ｖｏｌ）アガロースゲルをキャスティングする。５ｕｌのＰＣＲ産物をゲル中１５Ｖｃｍ－１で２０～３０分間泳動させる。成功したアンプリコンは、１つのシングル３７０ｂｐ産物を生じるはずであり、テンプレートは見えないはずである。ＰＣＲアンプリコンをゲル抽出する必要はないはずである。

【０９０１】

（ｖｉ）本出願人らは、製造者の指示に従いＱＩＡｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用してＰＣＲ産物を精製した。３５ｕｌの緩衝液ＥＢまたは水中にＤＮＡを溶出させる。精製したＰＣＲ産物は４℃または－２０℃で保存しておくことができる。

【０９０２】

（Ｂ）Ｃａｓ９含有バイシストロニック発現ベクターへのｓｇＲＮＡのクローニング・タイミング３日

（ｉ）ｓｇＲＮＡオリゴインサートを調製する。本出願人らは、各ｓｇＲＮＡ設計について、１００ｕＭの最終濃度となるようにオリゴの上部鎖および下部鎖を再懸濁した。オリゴを以下のとおりリン酸化およびアニーリングする：

【０９０３】

【表４２】

オリゴ 1 (100 uM)	1 ul
オリゴ 2 (100 uM)	1 ul
T4 ライゲーション緩衝液, 10X	1 ul
T4 PNK	1 ul
ddH_2O	6 ul
合計	10 ul

【０９０４】
（ｉｉ）以下のパラメータを使用してサーモサイクラーでアニーリングする：
３７℃で３０分
９５℃で５分
毎分５℃で２５℃まで下降させる。
【０９０５】
（ｉｉｉ）本出願人らは、１ｕｌのオリゴを１９９ｕｌの室温ｄｄＨ$_2$Ｏに添加することにより、リン酸化およびアニーリングしたオリゴを１：２００希釈した。
【０９０６】
（ｉｖ）ｓｇＲＮＡオリゴをＰＸ３３０にクローニングする。本出願人らは、各ｓｇＲＮＡについてＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ反応をセットアップする。本出願人らは、インサートのない、ＰＸ３３０のみの陰性対照を設定することを推奨する。
【０９０７】
【表４３】

PX330 (100 ng)	x ul
ステップ(iii)の希釈オリゴ二重鎖	2 ul
Tango 緩衝液, 10X	2 ul
DTT, 10mM	1 ul
ATP, 10mM	1 ul
FastDigest BbsI	1 ul
T7 リガーゼ	0.5 ul
ddH_2O	x ul
合計	20 ul

【０９０８】
（ｖ）Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ反応物を合計１時間インキュベートする：
【０９０９】
【表４４】

サイクル数	条件
1-6	37°C で 5 分, 21°C で 5 分

【０９１０】
（ｖｉ）本出願人らはＰｌａｓｍｉｄＳａｆｅエキソヌクレアーゼでＧｏｌｄｅｎ　Ｇ

ａｔｅ反応物を処理することにより、任意の残留する線状ＤＮＡを消化させた。このステップは任意選択であるものの、強く推奨される。

【０９１１】

【表４５】

ステップ４の Golden Gate 反応物	11 ul
10X PlasmidSafe 緩衝液	1.5 ul
ATP, 10 mM	1.5 ul
PlasmidSafe エキソヌクレアーゼ	1 ul
合計	15 ul

【０９１２】

（ｖｉｉ）本出願人らはＰｌａｓｍｉｄＳａｆｅ反応物を３７℃で３０分間インキュベートし、続いて７０℃で３０分間不活性化した。休題：完了後、反応物を凍結させて後に続行してもよい。環状ＤＮＡは少なくとも１週間安定しているはずである。

【０９１３】

（ｖｉｉｉ）形質転換。本出願人らはＰｌａｓｍｉｄＳａｆｅ処理したプラスミドを、細胞と共に提供されるプロトコルに従いコンピテントな大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株に形質転換した。本出願人らは迅速な形質転換のためＳｔｂｌ３を推奨する。簡潔に言えば、本出願人らは、ステップ（ｖｉｉ）からの５ｕｌの産物を２０ｕｌの化学的にコンピテントな氷冷Ｓｔｂｌ３細胞に添加した。次にこれを氷上で１０分間インキュベートし、４２℃で３０秒間熱ショックを与え、直ちに氷上に２分間戻し、１００ｕｌのＳＯＣ培地を添加し、これを１００ｕｇ／ｍｌアンピシリンを含有するＬＢプレートにプレーティングして３７℃で一晩インキュベートする。

【０９１４】

（ｉｘ）２日目：本出願人らはコロニーの成長に関してプレートを調べた。典型的には、陰性対照プレート（ＢｂｓＩ消化ＰＸ３３０のみのライゲーション、アニーリングされたｓｇＲＮＡオリゴなし）にはコロニーはなく、ＰＸ３３０－ｓｇＲＮＡクローニングプレートには数十個ないし数百個のコロニーがある。

【０９１５】

（ｘ）本出願人らは各プレートから２～３個のコロニーを取り、ｓｇＲＮＡが正しく挿入されていることを確かめた。本出願人らは、滅菌ピペットチップを使用して単一のコロニーを１００ｕｇ／ｍｌアンピシリン含有ＬＢ培地の３ｍｌ培養液に接種した。３７℃で一晩インキュベートし、振盪する。

【０９１６】

（ｘｉ）３日目：本出願人らはＱｉＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎミニプレップキットを製造者の指示に従い使用して、一晩培養物からプラスミドＤＮＡを単離した。

【０９１７】

（ｘｉｉ）ＣＲＩＳＰＲプラスミドを配列検証する。本出願人らはＵ６プロモーターからＵ６－Ｆｗｄプライマーを使用してシーケンシングすることにより各コロニーの配列を検証した。任意選択：以下のプライマー表に掲載するプライマーを使用してＣａｓ９遺伝子を配列決定する。

【０９１８】

【表４６】

プライマー	配列 (5'から3')	(配列番号)	目的
U6-フォワード	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC		U6-sgRNAを増幅する
U6-リバース	AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAG CTCTAAAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNC CGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAG		U6-sgRNAを増幅する; Nは標的の逆相補体である
sgRNA-トップ	CACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNN		sgRNAをPX330にクローニング
sgRNA-ボトム	AAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNC		sgRNAをPX330にクローニング
U6-*EMX1*-リバース	AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAG CTCTAAAACCCCTAGTCATTGGAGGTGACC GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAG		U6-EMX1 sgRNAを増幅する
EMX1-トップ	CACCGTCACCTCCAATGACTAGGG		EMX1 sgRNAをPX330にクローニングする
EMX1-ボトム	AAACCCCTAGTCATTGGAGGTGAC		EMX1 sgRNAをPX330にクローニングする
ssODN-センス	CAGAAGAAGAAGGGCTCCCATCACATCAACCGGTGGCGCATTGCCACGAAGCAGGCCAATGGGGAGGACATC GATGTCACCTCCAATGACAAGCTTGCTAGC GGTGGGCAACCACAAACCCACGAGGGCAG AGTGCTGCTTGCTG CTGGCCAGGCCCCTGCGTGGGCCCAAGCTG GACTCTGGCCACTCCCT		EMX1 HDR (センス; 挿入には下線を引く)
ssODN-アンチセンス	AGGGAGTGGCCAGAGTCCAGCTTGGGCCCACGCAGGGGCCTGGCCAGCAGCAAGCAGCACTCTGCCCTCGTG GGTTTGTGGTTGCCCACCGCTAGCAAGCTTGTCATTGGAGGTGACATCGATGTCCTCCCCATTGGCCTGCTTCG TGGCAATGCGCCACCGGTTGATGTGATGGGAGCCCTTCTTCTTCTG		EMX1 HDR (アンチセンス; 挿入には下線を引く)
EMX1-SURV-フォワード	CCATCCCCTTCTGTGAATGT		EMX1 SURVEYORアッセイPCR、

【０９１９】

【表４７】

			シーケンシング
EMX1-SURV-リバース	GGAGATTGGAGACACGGAGA		EMX1 SURVEYOR アッセイPCR、シーケンシング
EMX1-HDR-フォワード	GGCTCCCTGGGTTCAAAGTA		EMX1 RFLP分析PCR、シーケンシング
EMX1-HDR-リバース	AGAGGGGTCTGGATGTCGTAA		EMX1 RFLP分析PCR、シーケンシング
pUC19-フォワード	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC		pUC19多重クローニング部位フォワードプライマー、サンガーシーケンシング用

【０９２０】
本出願人らはシーケンシングの結果をＰＸ３３０クローニングベクター配列と照合し、Ｕ６プロモーターとｓｇＲＮＡ足場の残り部分との間に２０ｂｐガイド配列が挿入されたことを確かめた。ＧｅｎＢａｎｋベクターマップフォーマット（＊．ｇｂ　ｆｉｌｅ）でのＰＸ３３０マップの詳細および配列を、ウェブサイトｃｒｉｓｐｒ．ｇｅｎｏｍｅ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．ｏｒｇで見ることができる。
【０９２１】
（任意選択）ｓｓＯＤＮテンプレートの設計・タイミング３日　事前計画
３｜ｓｓＯＤＮを設計および注文する。センスまたはアンチセンスのいずれかのｓｓＯＤＮを供給業者から直接購入することができる。本出願人らは、両側に少なくとも４０ｂｐおよび最適なＨＤＲ効率のためには９０ｂｐの相同性アームを設計することを推奨する。本出願人らの経験上、改変効率はアンチセンスオリゴの方がやや高い。
【０９２２】
４｜本出願人らはｓｓＯＤＮウルトラマー（ｕｌｔｒａｍｅｒ）を１０ｕＭの最終濃度となるように再懸濁して希釈した。センスｓｓＯＤＮとアンチセンス　ｓｓＯＤＮとを組み合わせない、またはアニーリングしないこと。－２０℃で保存する。
【０９２３】
５｜ＨＤＲ適用に関する注記として、本出願人らはｓｇＲＮＡをＰＸ３３０プラスミドにクローニングすることを推奨する。
【０９２４】
ｓｇＲＮＡの機能検証：細胞培養および形質移入・タイミング３～４日
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は多くの哺乳類細胞系で使用されている。細胞系毎に条件が異なり得る。以下のプロトコルは、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞の形質移入条件を詳説する。ｓｓＯＤＮ媒介性ＨＤＲ形質移入に関する注記として、ｓｓＯＤＮの最適な送達のためＡｍａｘａ　ＳＦ細胞系Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒキットが使用される。これは次節に記載する。
【０９２５】
７｜ＨＥＫ２９３ＦＴの維持。細胞は製造者の推奨に従い維持される。簡潔に言えば、本出願人らは、Ｄ１０培地（１０％ウシ胎仔血清を補給したＧｌｕｔａＭａｘ　ＤＭＥＭ）中、３７℃および５％ＣＯ２で細胞を培養した。

【０９２６】
８｜継代のため、本出願人らは培地を取り出し、細胞を押し退けないようＤＰＢＳを容器の側面に穏やかに加えることにより１回リンスした。本出願人らはＴ７５フラスコに２ｍｌのＴｒｙｐＬＥを添加し、３７℃で５分間インキュベートした。１０ｍｌの温Ｄ１０培地を添加して失活させ、５０ｍｌ　Ｆａｌｃｏｎチューブに移した。本出願人らは細胞を穏やかに粉砕することにより解離させ、必要に応じて新しいフラスコに播種し直した。本出願人らは、典型的には２～３日毎に１：４または１：８の分割比で細胞を継代し、細胞を７０％を超えるコンフルエンシーに至らせることが絶対にないようにする。細胞系は継代数が１５に達したところで再出発する。
【０９２７】
９｜形質移入用細胞の調製。本出願人らは、形質移入の１６～２４時間前に、十分に解離した細胞を２４ウェルプレートの抗生物質不含Ｄ１０培地にウェル当たり１．３×10^5細胞の播種密度および５００ｕｌの播種容積でプレーティングした。必要に応じて製造者のマニュアルに従いスケールアップまたはスケールダウンする。推奨される密度より多い細胞をプレーティングすることは、そうすることによって形質移入効率が低下し得るため勧められない。
【０９２８】
１０｜形質移入当日、細胞は７０～９０％コンフルエンシーで最適である。細胞は、リポフェクタミン２０００またはＡｍａｘａ　ＳＦ細胞系Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒキットで製造者のプロトコルに従い形質移入し得る。
【０９２９】
（Ａ）ＰＸ３３０にクローニングされるｓｇＲＮＡについては、本出願人らは５００ｎｇの配列検証したＣＲＩＳＰＲプラスミドを形質移入した；２つ以上のプラスミドを形質移入する場合、等モル比および合計５００ｎｇ以下で混合する。
【０９３０】
（Ｂ）ＰＣＲによって増幅するｓｇＲＮＡについては、本出願人らは以下を混合した：
【０９３１】
【表４８】

PX165 (Cas9 のみ)	200 ng
sgRNA アンプリコン(各)	40 ng
pUC19	総 DNA が 500 ng になるまで補充

【０９３２】
本出願人らは、信頼のおける定量化のため技術的トリプリケートで形質移入することおよび形質移入対照（例えばＧＦＰプラスミド）を入れて形質移入効率をモニタすることを推奨する。加えて、下流機能アッセイの陰性対照としてＰＸ３３０クローニングプラスミドおよび／またはｓｇＲＮＡアンプリコンを単独で形質移入してもよい。
【０９３３】
１１｜本出願人らはリポフェクタミン複合体を細胞に添加し、ここでＨＥＫ２９３ＦＴ細胞はプレートから容易に剥がれ易く、形質移入効率の低下がもたらされ得るため、穏やかに添加した。
【０９３４】
１２｜本出願人らは、蛍光顕微鏡を使用して対照（例えばＧＦＰ）形質移入における蛍光細胞の割合を推定することにより、形質移入後２４時間の細胞の効率を調べた。典型的には７０％を超える細胞が形質移入される。
【０９３５】
１３｜本出願人らは、培養培地にさらに５００ｕｌの温Ｄ１０培地を補給した。細胞が容易に剥がれ得るため、Ｄ１０はウェルの側面に極めてゆっくりと加え、低温の培地は使

用しないこと。
【０９３６】
１４｜細胞は形質移入後合計４８～７２時間インキュベートしてからインデル分析のため回収する。４８時間以降はインデル効率の著しい増加はない。
【０９３７】
（任意選択）ＨＲ用のＣＲＩＳＰＲプラスミドとｓｓＯＤＮまたはターゲティングプラスミドとの同時形質移入・タイミング３～４日
１５｜ターゲティングプラスミドを線状化する。ターゲティングベクターは、可能な場合には、相同性アームの一方の近傍またはいずれかの相同性アームの遠位端におけるベクター骨格中の制限部位で１回切断することにより線状化する。
【０９３８】
１６｜本出願人らは、少量の線状化プラスミドを切断されていないプラスミドと共に０．８～１％アガロースゲル上で泳動させて、線状化の成功を確認した。線状化プラスミドはスーパーコイルプラスミドより上に泳動するはずである。
【０９３９】
１７｜本出願人らはＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットで線状化プラスミドを精製した。
【０９４０】
１８｜形質移入用の細胞を調製する。本出願人らはＴ７５またはＴ２２５フラスコでＨＥＫ２９３ＦＴを培養した。形質移入当日までに十分な細胞数が計画される。Ａｍａｘａストリップキュベットフォーマットには、形質移入当たり2×10^{6}細胞が使用される。
【０９４１】
１９｜形質移入用のプレートを調製する。本出願人らは１２ウェルプレートの各ウェルに１ｍｌの温Ｄ１０培地を添加した。プレートはインキュベーターに置かれ、培地が温かいまま保たれる。
【０９４２】
２０｜ヌクレオフェクション。本出願人らは、以下のステップに適合させて、Ａｍａｘａ　ＳＦ細胞系Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　４Ｄキットの製造者の指示に従いＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を形質移入した。
【０９４３】
ａ．ｓｓＯＤＮとＣＲＩＳＰＲとの同時形質移入については、ＰＣＲチューブに以下のＤＮＡを予め混合する：
【０９４４】
【表４９】

pCRISPR プラスミド (Cas9 + sgRNA)	500 ng
ssODN テンプレート (10uM)	1 ul

【０９４５】
ｂ．ＨＤＲターゲティングプラスミドとＣＲＩＳＰＲとの同時形質移入については、ＰＣＲチューブに以下のＤＮＡを予め混合する：
【表５０】

CRISPR プラスミド (Cas9 + sgRNA)	500 ng
線状化したターゲティングプラスミド	500 ng

【０９４６】
形質移入対照に関しては前節を参照されたい。加えて、本出願人らは、陰性対照としてｓｓＯＤＮまたはターゲティングプラスミドを単独で形質移入することを推奨する。
【０９４７】

２１｜単一細胞に解離する。本出願人らは培地を取り出し、細胞を押し退けないよう注意しながらＤＰＢＳで１回穏やかにリンスした。２ｍｌのＴｒｙｐＬＥをＴ７５フラスコに添加し、３７℃で５分間インキュベートする。１０ｍｌの温Ｄ１０培地を添加して失活させ、５０ｍｌ　Ｆａｌｃｏｎチューブにおいて穏やかに粉砕する。細胞は穏やかに粉砕して単一細胞に解離することが推奨される。大きい凝集塊は形質移入効率を低下させ得る。本出願人らは懸濁液から１０ｕｌアリコートを取り、カウントのため９０ｕｌのＤ１０培地に希釈した。本出願人らは細胞をカウントし、形質移入に必要な細胞数および懸濁液の容積を計算した。本出願人らは、典型的にはＡｍａｘａ　Ｎｕｃｌｅｏｃｕｖｅｔｔｅストリップを使用して条件当たり2×10^5細胞を形質移入したとともに、後続のピペッティングステップでの容積損失を調整するため所要数より２０％多い細胞を計算することを推奨する。必要な容積を新しいＦａｌｃｏｎチューブに移す。

【０９４８】

２３｜本出願人らはこの新しいチューブを２００×ｇで５分間スピンダウンした。

【０９４９】

本出願人らは、ＳＦ溶液とＳ１サプリメントとをＡｍａｘａが推奨するとおり混合して形質移入溶液を調製した。Ａｍａｘａストリップキュベットについては、形質移入当たり合計２０ｕｌの補給ＳＦ溶液が必要である。同様に、本出願人らは、所要量より２０％多い容積を計算することを推奨する。

【０９５０】

２５｜本出願人らは、ステップ２３のペレット化した細胞から培地を完全に取り除き、適切な容積（2×10^5細胞当たり２０ｕｌ）のＳ１補給ＳＦ溶液に穏やかに再懸濁した。細胞をＳＦ溶液中に長時間置いたままにしないこと。

【０９５１】

２６｜２０ｕｌの再懸濁した細胞をステップ２０の各ＤＮＡプレミックスにピペッティングする。穏やかにピペッティングして混合し、Ｎｕｃｌｅｏｃｕｖｅｔｔｅストリップチャンバに移す。これを形質移入条件毎に繰り返す。

【０９５２】

Ａｍａｘａが推奨するＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　４Ｄプログラム$CM-130$を使用して細胞をエレクトロポレートする。

【０９５３】

２８｜本出願人らは、１００ｕｌの温Ｄ１０培地を各Ｎｕｃｌｅｏｃｕｖｅｔｔｅストリップチャンバに穏やかにかつゆっくりとピペッティングし、全容積をステップ１９の予め温めたプレートに移す。重要。この段階で細胞は極めて脆弱であり、苛酷なピペッティングは細胞死を引き起こし得る。２４時間インキュベートする。この時点で、陽性形質移入対照における蛍光細胞の割合から形質移入効率を推定することができる。ヌクレオフェクションは、典型的には７０～８０％より高い形質移入効率をもたらす。本出願人らは、各ウェルに１ｍｌの温Ｄ１０培地を、細胞を押し退けないようにしてゆっくりと添加した。細胞を合計７２時間インキュベートする。

【０９５４】

ヒト胚性幹細胞（ＨＵＥＳ　９）培養および形質移入・タイミング３～４日

ｈＥＳＣ（ＨＵＥＳ９）株の維持。本出願人らはＨＵＥＳ９細胞系をｍＴｅＳＲ１培地による無フィーダー条件に常法で維持する。本出願人らは、基本培地と同梱の５×サプリメントおよび１００ｕｇ／ｍｌ　Ｎｏｒｍｏｃｉｎを添加することによりｍＴｅＳＲ１培地を調製した。本出願人らは、１０ｕＭ　Ｒｏｃｋ阻害薬をさらに補給したｍＴｅＳＲ１培地の１０ｍｌアリコートを調製した。組織培養プレートをコーティングする。冷Ｇｅｌ　Ｔｒｅｘを冷ＤＭＥＭに１：１００希釈し、１００ｍｍ組織培養プレートの表面全体をコーティングする。

【０９５５】

プレートをインキュベーターに３７℃で少なくとも３０分間置く。細胞のバイアルを１５ｍｌ　Ｆａｌｃｏｎチューブにおいて３７℃で解凍し、５ｍｌのｍＴｅＳＲ１培地を添

加し、および２００×ｇで５分間ペレット化する。ＧｅｌＴｒｅｘコーティングを吸い取り、Ｒｏｃｋ阻害薬を含有する１０ｍｌ　ｍＴｅＳＲ１培地に約１×１０^{6}細胞を播種する。形質移入後２４時間で通常のｍＴｅＳＲ１培地に交換し、毎日リフィードする。細胞を継代する。細胞に新鮮なｍＴｅＳＲ１培地を毎日リフィードし、７０％のコンフルエンシーに達するまで継代する。ｍＴｅＳＲ１培地を吸い取り、細胞をＤＰＢＳで１回洗浄する。２ｍｌのＡｃｃｕｔａｓｅを添加して３７℃で３～５分間インキュベートすることにより細胞を解離する。１０ｍｌ　ｍＴｅＳＲ１培地を添加して細胞を剥がし、１５ｍｌ　Ｆａｌｃｏｎチューブに移して穏やかに再懸濁する。ＧｅｌＴｒｅｘをコーティングしたプレートの１０ｕＭ　Ｒｏｃｋ阻害薬含有ｍＴｅＳＲ１培地に改めてプレーティングする。プレーティング後２４時間で通常のｍＴｅＳＲ１培地に交換する。

【０９５６】

形質移入。本出願人らは、解凍後少なくとも１週間細胞を培養した後にＡｍａｘａ　Ｐ３初代細胞４－Ｄ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒキット（Ｌｏｎｚａ）を使用して形質移入することを推奨する。対数期増殖細胞に新鮮培地を２時間リフィードした後形質移入する。ａｃｃｕｔａｓｅで単一細胞または１０細胞以下の小さいクラスターに解離し、穏やかに再懸濁する。ヌクレオフェクションに必要な細胞の数をカウントし、２００×ｇで５分間スピンダウンする。培地を完全に取り除き、推奨される容積のＳ１補給Ｐ３ヌクレオフェクション溶液に再懸濁する。１×Ｒｏｃｋ阻害薬の存在下で、コーティングされたプレートにエレクトロポレートした細胞を穏やかにプレーティングする。

【０９５７】

形質移入の成功を確かめ、通常のｍＴｅＳＲ１培地を毎日、ヌクレオフェクション後２４時間目から始めてリフィードする。典型的には、本出願人らはＡｍａｘａヌクレオフェクションで７０％より高い形質移入効率を観察する。ＤＮＡを回収する。形質移入後４８～７２時間でａｃｃｕｔａｓｅを使用して細胞を解離し、５倍容積のｍＴｅＳＲ１を添加することにより失活させる。細胞を２００×ｇで５分間スピンダウンする。ペレット化した細胞はＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ溶液によるＤＮＡ抽出用に直接処理することができる。細胞をａｃｃｕｔａｓｅを用いずに機械的に解離することは推奨されない。ａｃｃｕｔａｓｅを失活させずにまたは推奨速度より高速で細胞をスピンダウンすることは推奨されない；それを行うと細胞の溶解が引き起こされ得る。

【０９５８】

ＦＡＣＳによるクローン細胞系の単離。タイミング・２～３時間ハンズオン；２～３週間拡大

形質移入後２４時間でＦＡＣＳによるかまたは段階希釈によりクローン単離を実施し得る。

【０９５９】

５４｜ＦＡＣＳ緩衝液を調製する。有色の蛍光を使用して選別する必要のない細胞は、１×ペニシリン／ストレプトマイシン（ｓｔｒｅｐｔｉｎｏｍｙｃｉｎ）を補給した通常のＤ１０培地で選別し得る。有色の蛍光選別もまた必要である場合、フェノール不含ＤＭＥＭまたはＤＰＢＳが通常のＤＭＥＭに代用される。１×ペニシリン／ストレプトマイシン（ｓｔｒｅｐｔｉｎｏｍｙｃｉｎ）を補給し、０．２２ｕｍ　Ｓｔｅｒｉｆｌｉｐフィルターでろ過する。

【０９６０】

５５｜９６ウェルプレートを調製する。本出願人らは、各ウェルにつき１×ペニシリン／ストレプトマイシン（ｓｔｒｅｐｔｉｎｏｍｙｃｉｎ）を補給した１００ｕｌのＤ１０培地を添加し、所望の数のクローンに必要なとおりのプレート数を調製した。

【０９６１】

５６｜ＦＡＣＳ用の細胞を調製する。本出願人らは培地を完全に吸い取り、２４ウェルプレートのウェル当たり１００ｕｌ　ＴｒｙｐＬＥを添加することにより、細胞を解離した。５分間インキュベートし、４００ｕｌの温Ｄ１０培地を添加した。

【０９６２】

５７｜再懸濁した細胞を１５ｍｌ　Ｆａｌｃｏｎチューブに移し、２０回穏やかに粉砕する。確実に単一細胞に解離したことを顕微鏡下で確かめることが推奨される。

【０９６３】

５８｜細胞を２００×ｇで５分間スピンダウンする。

【０９６４】

５９｜本出願人らは培地を吸引し、細胞を２００ｕｌのＦＡＣＳ培地に再懸濁した。

【０９６５】

６０｜細胞を３５ｕｍメッシュフィルターでろ過し、ラベルを付したＦＡＣＳチューブに入れる。本出願人らは、ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ細胞ストレーナーキャップ付き１２×７５ｍｍチューブを使用することを推奨する。選別時まで細胞を氷上に置く。

【０９６６】

６１｜本出願人らは単一細胞を、ステップ５５で調製した９６ウェルプレートに選別した。本出願人らは、各プレート上の一つの単一の指定されたウェルに１００細胞を陽性対照として選別することを推奨する。

【０９６７】

注。残りの細胞をとっておき、集団レベルでの遺伝子タイピングに使用して全体的な改変効率を評価し得る。

【０９６８】

６２｜本出願人らは細胞をインキュベーターに戻して２～３週間拡大させた。選別後５日で１００ｕｌの温Ｄ１０培地を添加する。必要に応じて３～５日おきに１００ｕｌの培地を交換する。

【０９６９】

６３｜選別後１週間でコロニーの「クローンのような」外観、すなわち中心点から放射状に広がる丸いコロニーについて調べる。空のウェル、またはダブレットまたはマルチプレットが播種された可能性のあるウェルに印を付ける。

【０９７０】

６４｜細胞が６０％を上回ってコンフルエントになったとき、本出願人らは、継代用に一組のレプリカ平板を調製した。レプリカ平板の各ウェルに１００ｕｌのＤ１０培地を添加する。本出願人らは上下に激しく２０回ピペッティングすることにより細胞を直接解離した。調製したレプリカ平板に再懸濁容積の２０％をプレーティングしてクローン株を維持した。その後培地を２～３日おきに交換し、それに従い継代する。

【０９７１】

６５｜残りの８０％の細胞はＤＮＡ単離および遺伝子タイピングに使用する。

【０９７２】

任意選択：希釈によるクローン細胞系の単離。タイミング・２～３時間ハンズオン；２～３週間拡大

６６｜本出願人らは上記に記載したとおり２４ウェルプレートから細胞を解離した。確実に単一細胞に解離する。細胞ストレーナーを使用して細胞の凝集を防ぐことができる。

【０９７３】

６７｜条件毎に細胞の数をカウントする。各条件を１００ｕｌ当たり０．５細胞の最終濃度となるようにＤ１０培地に段階稀釈する。各９６ウェルプレートについて、本出願人らは、１２ｍｌのＤ１０中６０細胞の最終カウントとなるように希釈することを推奨する。適切なクローン希釈のため細胞数を正確にカウントすることが推奨される。正確を期すため細胞を段階希釈の中間段階で再度カウントしてもよい。

【０９７４】

６８｜マルチチャンネルピペットを使用して１００ｕｌの希釈細胞を９６ウェルプレートの各ウェルにピペッティングした。

【０９７５】

注。残りの細胞をとっておき、集団レベルでの遺伝子タイピングに使用して全体的な改変効率を評価し得る。

【０９７６】
６９｜本出願人らは、プレーティング後約１週間でコロニーの「クローンのような」外観、すなわち中心点から放射状に広がる丸いコロニーについて調べた。ダブレットまたはマルチプレットが播種された可能性のあるウェルに印を付ける。
【０９７７】
７０｜本出願人らは細胞をインキュベーターに戻して２～３週間拡大させた。前節に詳説したとおり必要に応じて細胞にリフィードする。
【０９７８】
ＣＲＩＳＰＲ開裂効率のＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイ。タイミング・５～６時間
形質移入細胞の開裂効率をアッセイする前に、本出願人らは、以下に記載するプロトコルを使用するＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼ消化のステップにより陰性（形質移入されていない）対照試料でそれぞれの新規ＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーを試験することを推奨する。時折、シングルバンドのクリーンなＳＵＲＶＥＹＯＲ　ＰＣＲ産物であっても非特異的ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼ開裂バンドを生じ、正確なインデル分析を妨げる可能性がある。
【０９７９】
７１｜ＤＮＡ用の細胞を回収する。細胞を解離し、２００×ｇで５分間スピンダウンする。注。形質移入細胞系をとっておく必要に応じてこの段階でレプリカ平板を作製する。
【０９８０】
７２｜上清を完全に吸引する。
【０９８１】
７３｜本出願人らはＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ　ＤＮＡ抽出溶液を製造者の指示に従い使用した。本出願人らは典型的には２４ウェルプレートの各ウェルに５０ｕｌの溶液を使用し、および９６ウェルプレートについては１０ｕｌを使用した。
【０９８２】
７４｜本出願人らは抽出ＤＮＡをｄｄＨ２Ｏで１００～２００ｎｇ／ｕｌの最終濃度となるように標準化した。休題：抽出ＤＮＡは－２０℃で数ヶ月間保存しておくことができる。
【０９８３】
７５｜ＳＵＲＶＥＹＯＲ　ＰＣＲをセットアップする。本出願人らのオンライン／コンピュータアルゴリズムツールによって提供されるＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーを使用して以下をマスターミックスする：
【０９８４】
【表５１】

成分:	量 (ul)	最終濃度
Herculase II PCR 緩衝液, 5X	10	1X
dNTP, 100mM (各 25mM)	1	1 mM
SURVEYOR フォワードプライマー (10uM)	1	0.2 uM
SURVEYOR リバースプライマー (10uM)	1	0.2 uM
Herculase II 融合ポリメラーゼ	1	
$MgCl_2$ (25mM)	2	1 mM
蒸留水	33	
合計	49 (各反応につき)	

【０９８５】
７６｜本出願人らは、各反応について１００～２００ｎｇのステップ７４からの標準化ゲノムＤＮＡテンプレートを添加した。
【０９８６】
７７｜３０回以下の増幅サイクルに対し、以下のサイクル条件を使用してＰＣＲ反応を実施した：
【０９８７】
【表５２】

サイクル数	変性	アニーリング	伸長
1	95°C, 2 分		
2-31	95°C, 20 秒	60°C, 20 秒	72°C, 30 秒
32			72°C, 3 分

【０９８８】
７８｜本出願人らは２～５ｕｌのＰＣＲ産物を１％ゲル上で泳動させてシングルバンド産物を確認した。これらのＰＣＲ条件は多くのＳＵＲＶＥＹＯＲプライマー対で機能するように設計されているが、一部のプライマーは、テンプレート濃度、$MgCl_2$濃度、および／またはアニーリング温度を調整することによるさらなる最適化が必要になり得る。
【０９８９】
７９｜本出願人らはＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用してＰＣＲ反応物を精製し、溶離液を２０ｎｇ／ｕｌに標準化した。休題：精製したＰＣＲ産物は－２０℃で保存しておくことができる。
【０９９０】
８０｜ＤＮＡヘテロ二重鎖形成。アニーリング反応を以下のとおりセットアップした：
【０９９１】
【表５３】

Taq PCR 緩衝液, 10X	2 ul
標準化 DNA (20 ng/ul)	18 ul
総容積	20 ul

【０９９２】
８１｜以下の条件を用いて反応物をアニーリングする：
【０９９３】

【表５４】

サイクル数	条件
1	95°C, 10 分
2	95°C-85°C, -2°C/秒
3	85°C, 1 分
4	85°C-75°C, -0.3°C/秒
5	75°C, 1 分
6	75°C-65°C, -0.3°C/秒
7	65°C, 1 分
8	65°C-55°C, -0.3°C/秒
9	55°C, 1 分
10	55°C-45°C, -0.3°C/秒
11	45°C, 1 分
12	45°C-35°C, -0.3°C/秒
13	35°C, 1 分
14	35°C-25°C, -0.3°C/秒
15	25°C, 1 分

【０９９４】

８２｜ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼＳ消化。本出願人らはマスターミックスを調製し、氷上で以下の成分を添加して、２５ｕｌの総最終容積についてステップ８１のヘテロ二本鎖をアニーリングした：

【０９９５】

【表５５】

成分	量 (ul)	最終濃度
$MgCl_2$ 溶液, 0.15M	2.5	15mM
ddH_2O	0.5	
SURVEYOR ヌクレアーゼ S	1	1X
SURVEYOR エンハンサーS	1	1X
合計	5	

【０９９６】

８３｜十分にボルテックスし、スピンダウンする。反応物を４２℃で１時間インキュベートする。

【０９９７】

８４｜任意選択：ＳＵＲＶＥＹＯＲキットの停止液２ｕｌを添加してもよい。休題。消化産物は、後の分析のため－２０℃で保存しておくことができる。

【０９９８】

８５｜ＳＵＲＶＥＹＯＲ反応を可視化する。２％アガロースゲル上でＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼ消化産物を可視化し得る。分解能を良くするため、産物を４～２０％勾配ポリアクリルアミドＴＢＥゲル上で泳動させてもよい。本出願人らは推奨されるローディング緩衝液で１０ｕｌの産物をロードし、製造者の指示に従いゲルを泳動させた。典型的には、本出願人らはブロモフェノールブルー色素が移動してゲルの底に達するまで泳動させる。同じゲル上にＤＮＡラダーおよび陰性対照を含める。

【０９９９】

８６｜本出願人らは、ＴＢＥ中に希釈した１×ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ色素でゲルを染色した。ゲルを１５分間穏やかに揺り動かした。

【１０００】

８７｜本出願人らは、バンドを過度に露光することなく定量的イメージングシステムを使用してゲルをイメージングした。陰性対照は、ＰＣＲ産物のサイズに対応する１つのバンドのみを有するはずであるが、時折、他のサイズの非特異的な開裂バンドを有し得る。これらは、標的の開裂バンドとサイズが異なる場合には分析を妨げない。本出願人らのオンライン／コンピュータアルゴリズムツールによって提供される標的開裂バンドのサイズの合計は、ＰＣＲ産物のサイズと等しいはずである。

【１００１】

８８｜開裂強度を推定する。本出願人らはＩｍａｇｅＪまたは他のゲル定量化ソフトウェアを使用して各バンドの面積強度を定量化した。

【１００２】

８９｜各レーンについて、本出願人らは、以下の式を使用して開裂されたＰＣＲ産物の割合（f_{cut}）を計算した：$f_{cut}=(b+c)/(a+b+c)$（式中、ａは消化されなかったＰＣＲ産物の面積強度であり、ｂおよびｃは各開裂産物の面積強度である）。９０｜開裂効率は、二重鎖形成の二項確率分布に基づき、以下の式を使用して推定し得る：

９１｜

【数１】

$$\text{インデル}(\%) = 100 \times \left(1-\sqrt{(1-f_{cut})}\right)$$

ＣＲＩＳＰＲ開裂効率を評価するためのサンガーシーケンシング。タイミング・３日

最初のステップは、ＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイのステップ７１～７９と同じである。注：フォワードおよびリバースプライマーに適切な制限部位が付加される場合、サンガーシーケンシングにＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーを用い得る。推奨されるｐＵＣ１９骨格へのクローニングに関しては、フォワードプライマーにＥｃｏＲＩおよびリバースプライマーにＨｉｎｄＩＩＩを用い得る。

【１００３】

９２｜アンプリコン消化。消化反応を以下のとおりセットアップする：

【１００４】

【表５６】

成分	量 (ul)
Fast Digest 緩衝液, 10X	3
FastDigest EcoRI	1
FastDigest HindIII	1
標準化 DNA (20 ng/ul)	10
ddH_2O	15
総容積	30

【１００５】
９３｜ｐＵＣ１９骨格消化。消化反応を以下のとおりセットアップする：
【１００６】
【表５７】

成分	量 (ul)
Fast Digest 緩衝液, 10X	3
FastDigest EcoRI	1
FastDigest HindIII	1
FastAP アルカリホスファターゼ	1
pUC19 ベクター (200 ng/ul)	5
ddH_2O	20
総容積	30

【１００７】
９４｜本出願人らは、ＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用して消化反応物を精製した。休題：精製したＰＣＲ産物は－２０℃で保存しておくことができる。
【１００８】
９５｜本出願人らは、消化したｐＵＣ１９骨格およびサンガーアンプリコンを１：３のベクター：インサート比で以下のとおりライゲートした：
【１００９】

【表５８】

成分	量 (ul)
消化したpUC19	x (50 ng)
消化したインサート	x (1:3 ベクター:インサートモル比)
T7リガーゼ	1
2X 迅速ライゲーション緩衝液	10
ddH_2O	x
総容積	20

【１０１０】
９６｜形質転換。本出願人らは、細胞と共に供給されるプロトコルに従いＰｌａｓｍｉｄＳａｆｅ処理したプラスミドをコンピテント大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株に形質転換した。本出願人らは迅速な形質転換のためＳｔｂｌ３を推奨する。簡潔に言えば、５ｕｌのステップ９５の産物を２０ｕｌの氷冷化学コンピテントＳｔｂｌ３細胞に添加し、氷上で１０分間インキュベートし、４２℃で３０秒間熱ショックを与え、直ちに氷に２分間戻し、１００ｕｌのＳＯＣ培地を添加し、１００ｕｇ／ｍｌアンピシリンを含有するＬＢプレートにプレーティングする。これを３７℃で一晩インキュベートする。
【１０１１】
９７｜２日目：本出願人らはプレートのコロニー成長を調べた。典型的には、陰性対照プレート（ＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ消化ｐＵＣ１９のみのライゲーション、サンガーアンプリコンインサート無し）にはコロニーがなく、ｐＵＣ１９－サンガーアンプリコンクローニングプレートには数十個ないし数百個のコロニーがある。
【１０１２】
９８｜３日目：本出願人らは、ＱＩＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎミニプレップキットを製造者の指示に従い使用して、一晩培養物からプラスミドＤＮＡを単離した。
【１０１３】
９９｜サンガーシーケンシング。本出願人らは、ｐＵＣ１９骨格からｐＵＣ１９－フォワードプライマーを使用してシーケンシングすることにより各コロニーの配列を確かめた。本出願人らはシーケンシング結果を予想ゲノムＤＮＡ配列と照合し、Ｃａｓ９誘発性のＮＨＥＪ突然変異の存在を調べた。％編集効率＝（改変クローン数）／（総クローン数）。正確な改変効率を得るには、妥当な数のクローン（＞２４）を選ぶことが重要である。
【１０１４】
微小欠失のための遺伝子タイピング。タイミング・２～３日ハンズオン；２～３週間拡大
１００｜上記に記載したとおり、欠失させる領域を標的にするｓｇＲＮＡのペアを細胞に形質移入した。
【１０１５】
１０１｜形質移入後２４時間で、クローン株を上記に記載したとおりＦＡＣＳまたは段階希釈によって単離する。
【１０１６】
１０２｜細胞を２～３週間拡大させる。
【１０１７】
１０３｜本出願人らは上記に記載したとおり１０ｕｌ　ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ溶液を使用してクローン株からＤＮＡを回収し、ゲノムＤＮＡを５０～１００ｎｇ／ｕｌの最終濃度となるようにｄｄＨ$_2$Ｏで標準化した。
【１０１８】
１０４｜改変領域をＰＣＲ増幅する。ＰＣＲ反応を以下のとおりセットアップする：

【１０１９】
【表５９】

成分:	量 (ul)	最終濃度
Herculase II PCR 緩衝液, 5X	10	1X
dNTP, 100mM (各 25mM)	1	1 mM
外側フォワードプライマー (10uM)	1	0.2 uM
外側リバースプライマー (10uM)	1	0.2 uM
Herculase II 融合ポリメラーゼ	1	
MgCl2 (25mM)	2	1 mM
ddH_2O	32	
合計	48 (各反応につき)	

注：欠失サイズが１ｋｂより大きい場合、内側フォワードプライマーおよび内側リバースプライマーを含む並行する一組のＰＣＲ反応をセットアップし、野生型アレルの存在についてスクリーニングする。

【１０２０】
１０５｜逆位についてスクリーニングするため、ＰＣＲ反応を以下のとおりセットアップする：

【１０２１】
【表６０】

成分:	量 (ul)	最終濃度
Herculase II PCR 緩衝液, 5X	10	1X
dNTP, 100mM (各 25mM)	1	1 mM
外側フォワードまたは外側リバースプライマー (10uM)	1	0.2 uM
内側フォワードまたは内側リバースプライマー (10uM)	1	0.2 uM
Herculase II 融合ポリメラーゼ	1	
$MgCl_2$ (25mM)	2	1 mM
ddH_2O	32	
合計	48 (各反応につき)	

注：プライマーは、外側フォワード＋内側フォワード、または外側リバース＋内側リバースのいずれかとしてペアにされる。

【１０２２】
１０６｜本出願人らは、各反応について１００～２００ｎｇのステップ１０３の標準化ゲノムＤＮＡテンプレートを添加した。

【１０２３】
１０７｜以下のサイクル条件を使用してＰＣＲ反応を実施した：

【１０２４】

【表６１】

サイクル数	変性	アニーリング	伸長
1	95°C, 2 分		
2-31	95°C, 20 秒	60°C, 20 秒	72°C, 30 秒
32			72°C, 3 分

【１０２５】
１０８｜本出願人らは２～５ｕｌのＰＣＲ産物を１～２％ゲル上で泳動させて産物を確認した。これらのＰＣＲ条件は多くのプライマーで機能するように設計されるが、一部のプライマーは、テンプレート濃度、$MgCl_2$濃度、および／またはアニーリング温度を調整することによるさらなる最適化が必要となり得る。
【１０２６】
ＨＤＲによる標的改変のための遺伝子タイピング。タイミング・２～３日、２～３時間ハンズオン
１０９｜本出願人らは上記に記載したとおりＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ溶液を使用してＤＮＡを回収し、ゲノムＤＮＡを１００～２００ｎｇ／ｕｌの最終濃度となるようにＴＥで標準化した。
【１０２７】
１１０｜改変領域をＰＣＲ増幅する。ＰＣＲ反応を以下のとおりセットアップする：
【１０２８】
【表６２】

成分:	量 (ul)	最終濃度
Herculase II PCR 緩衝液, 5X	10	1X
dNTP, 100 mM (各 25 mM)	1	1 mM
HDR フォワードプライマー (10 uM)	1	0.2 uM
HDR リバースプライマー (10 uM)	1	0.2 uM
Herculase II 融合ポリメラーゼ	1	
$MgCl_2$ (25mM)	2	1 mM
ddH_2O	33	
合計	49 (各反応につき)	

【１０２９】
１１１｜本出願人らは各反応について１００～２００ｎｇのステップ１０９のゲノムＤＮＡテンプレートを添加し、以下のプログラムを実行した。
【１０３０】

【表６３】

サイクル数	変性	アニーリング	伸長
1	95°C, 2 分		
2-31	95°C, 20 秒	60°C, 20 秒	72°C, *30-60 秒／kb*
32			72°C, 3 分

【１０３１】
１１２｜本出願人らは５ｕｌのＰＣＲ産物を０．８～１％ゲル上で泳動させてシングルバンド産物を確認した。プライマーは、テンプレート濃度、ＭｇＣｌ$_2$濃度、および／またはアニーリング温度を調整することによるさらなる最適化が必要となり得る。
【１０３２】
１１３｜本出願人らはＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用してＰＣＲ反応物を精製した。
【１０３３】
１１４｜ＨＤＲの例では、ＥＭＸ１遺伝子にＨｉｎｄＩＩＩ制限部位が挿入される。これらはＰＣＲアンプリコンの制限酵素消化により検出される：
【１０３４】
【表６４】

成分	量 (ul)
精製 PCR アンプリコン (200-300ng)	x
F.D. 緩衝液、緑色	1
HindIII	0.5
ddH2O	x
合計	10

【１０３５】
ｉ．ＤＮＡを３７℃で１０分間消化する：
【１０３６】
ｉｉ．本出願人らは、ローディング色素を含む１０ｕｌの消化産物を、４～２０％勾配ポリアクリルアミドＴＢＥゲル上でキシレンシアノールバンドが移動してゲルの底に達するまで泳動させた。
【１０３７】
ｉｉｉ．本出願人らは１５分間揺り動かしながら１×ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ色素でゲルを染色した。
【１０３８】
ｉｖ．上記でＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイの節に記載したとおり開裂産物をイメージングして定量化する。ＨＤＲ効率は以下の式により推定される：（ｂ＋ｃ）／（ａ＋ｂ＋ｃ）（式中、ａは消化されなかったＨＤＲ　ＰＣＲ産物の面積強度であり、ｂおよびｃはＨｉｎｄＩＩＩ切断断片の面積強度である）。
【１０３９】
１１５｜あるいは、ステップ１１３の精製ＰＣＲアンプリコンをクローニングし、サンガーシーケンシングまたはＮＧＳを用いて遺伝子型を決定してもよい。
【１０４０】
ディープシーケンシングおよびオフターゲット分析・タイミング１～２日

オンラインＣＲＩＳＰＲ標的設計ツールは、同定された標的部位のそれぞれについて候補ゲノムオフターゲット部位を作成する。これらの部位でのオフターゲット分析は、ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ、サンガーシーケンシング、または次世代ディープシーケンシングにより実施することができる。これらの部位の多くで改変率が低いまたは検出不能である可能性を考えると、本出願人らは、高感度および高精度のためのＩｌｌｕｍｉｎａ　Ｍｉｓｅｑプラットフォームによるディープシーケンシングを推奨する。プロトコルはシーケンシングプラットフォームによって異なり得る；ここで本出願人らは、シーケンシングアダプターをつなぎ合わせるための融合ＰＣＲ方法について簡単に記載する。

【１０４１】

１１６｜ディープシーケンシングプライマーを設計する。次世代シーケンシング（ＮＧＳ）プライマーは、典型的には１００～２００ｂｐサイズ範囲の、より短いアンプリコン向けに設計される。プライマーはＮＣＢＩプライマーＢｌａｓｔを使用して手動で設計されてもよく、またはオンラインＣＲＩＳＰＲ標的設計ツール（ｇｅｎｏｍｅ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．ｏｒｇ／ｔｏｏｌｓにあるウェブサイト）で生成されてもよい。

【１０４２】

１１７｜Ｃａｓ９標的細胞からゲノムＤＮＡを回収する。ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔゲノムＤＮＡをｄｄＨ２Ｏで１００～２００ｎｇ／ｕｌに標準化する。

【１０４３】

１１８｜初期ライブラリ調製ＰＣＲ。ステップ１１６のＮＧＳプライマーを使用して初期ライブラリ調製ＰＣＲを調製する。

【１０４４】

【表６５】

成分:	量 (ul)	最終濃度
Herculase II PCR 緩衝液, 5X	10	1X
dNTP, 100mM (各 25mM)	1	1 mM
NGS フォワードプライマー (10uM)	1	0.2 uM
NGS リバースプライマー (10uM)	1	0.2 uM
Herculase II 融合ポリメラーゼ	1	
MgCl2 (25mM)	2	1 mM
ddH2O	33	
合計	49 (各反応につき)	

【１０４５】

１１９｜各反応につき１００～２００ｎｇの標準化したゲノムＤＮＡテンプレートを加える。

【１０４６】

１２０｜２０回以下の増幅サイクルについて、以下のサイクル条件を使用してＰＣＲ反応を実施する：

【１０４７】

【表６６】

サイクル数	変性	アニーリング	伸長
1	95°C, 2 分		
2-21	95°C, 20 秒	60°C, 20 秒	72°C, 15 秒
22			72°C, 3 分

【１０４８】
１２１｜２～５ｕｌのＰＣＲ産物を１％ゲル上で泳動させてシングルバンド産物を確認する。あらゆるゲノムＤＮＡ　ＰＣＲと同様に、ＮＧＳプライマーは、テンプレート濃度、$MgCl_2$濃度、および／またはアニーリング温度を調整することによるさらなる最適化が必要となり得る。
【１０４９】
１２２｜ＰＣＲ反応物をＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用して精製し、溶離液を２０ｎｇ／ｕｌに標準化する。休題：精製したＰＣＲ産物は－２０℃で保存しておくことができる。
【１０５０】
１２３｜Ｎｅｘｔｅｒａ　ＸＴ　ＤＮＡ試料調製キット。製造者のプロトコルに従い、各試料に対するユニークバーコードでＭｉｓｅｑシーケンシング準備ライブラリを作成する。
【１０５１】
１２４｜シーケンシングデータを分析する。ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ、または単純な配列解析スクリプトなどのリードアラインメントプログラムにより、オフターゲット分析を実施し得る。
【１０５２】
タイミング
ステップ１～２　ｓｇＲＮＡオリゴおよびｓｓＯＤＮの設計および合成：１～５日、供給業者によって変動
ステップ３～５　ＣＲＩＳＰＲプラスミドまたはＰＣＲ発現カセットの構築：２時間～３日
ステップ６～５３　細胞系への形質移入：３日（１時間のハンズオン時間）
ステップ５４～７０　任意選択のクローン株誘導：１～３週間、細胞型によって変動
ステップ７１～９１　ＳＵＲＶＥＹＯＲによるＮＨＥＪの機能検証：５～６時間
ステップ９２～１２４　サンガー法または次世代ディープシーケンシングによる遺伝子タイピング：２～３日（３～４時間のハンズオン時間）
【１０５３】

【表６７】

本明細書の実施例に関わる状況への対処

状況	解決法
sgRNA の増幅がない	U6-テンプレート濃度をタイトレートする
SURVEYOR または HDR PCR が汚いまたは増幅なし	$MgCl_2$ をタイトレートする; テンプレート濃度を標準化およびタイトレートする; アニーリング温度勾配; プライマーを再設計する
微小欠失 PCR におけるアレルのむらのある増幅	別の PCR をセットアップして野生型および欠失アレルを検出する; 同程度のサイズのアンプリコンでプライマーを再設計する
陰性対照プレート上のコロニー	*Bbs*I を増加させる; Golden Gate 反応サイクル数を増加させる, Antarctic ホスフェート処理で PX330 を別個に切断する
sgRNA 配列がない、または誤った配列	さらなるコロニーをスクリーニングする
リポフェクタミントランスフェクション効率が低い	細胞の健康状態および密度を確認する; DNA をタイトレートする; GFP トランスフェクション対照を加える
ヌクレオフェクショントランスフェクション効率が低い	細胞の健康状態および密度を確認する; DNA をタイトレートする; 単一細胞に懸濁する
FACS 後の凝集塊または細胞なし	FACS 前に細胞を選別する; 単一細胞に解離する; 適切な密度に再懸濁する
段階希釈における凝集塊または細胞なし	細胞を再カウントする; 単一細胞に解離してストレーナーで選別する; 段階希釈を確かめる
陰性試料で SURVEYOR バックグラウンドが高い	別の位置からプライミングするようにプライマーを再設計する
ゲル上の SURVEYOR 結果が汚い	PCR 産物を精製する; 入力 DNA を減らす; 42°C インキュベーションを 30 分間に短縮する
SURVEYOR 開裂がない	PCR 産物を精製して標準化する; TaqB 緩衝液で再アニーリングする; sgRNA を再設計する; 配列について px330 骨格上の Cas9 を確認する
試料が TBE アクリルアミドゲルに沈まない	15mM の最終濃度となるように MgCl2 を補足するかまたはグリセロールを含むローディング緩衝液を加える

【１０５４】

考察

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓは容易に多重化し得るため、いくつかの遺伝子の同時改変が促進され、かつ高効率で染色体微小欠失が媒介される。本出願人らは２つのｓｇＲＮＡを使用することにより、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞において最大６８％の効率でのヒトＧＲＩＮ２ＢおよびＤＹＲＫ１Ａ遺伝子座の同時標的化を実証した。同様に、ｓｇＲＮＡのペアを使用することによりエクソンの切り出しなどの微小欠失を媒介することができ、これはクローンレベルでＰＣＲにより遺伝子型決定され得る。エクソン接合部の正確な位置は異なり得ることに留意されたい。本出願人らはまた、ｓｓＯＤＮおよびターゲティングベクターを使用したＨＥＫ　２９３ＦＴ細胞およびＨＵＥＳ９細胞におけるＣａｓ９の野生型およびニッカーゼ突然変異体の両方によるＨＤＲの媒介も実証した（図３０）。本出願人らはＣａｓ９ニッカーゼを使用したＨＵＥＳ９細胞でのＨＤＲを検出できていないことに留意されたく、これはＨＵＥＳ９細胞における修復活性の低い効率または潜在的な違いに起因し得る。これらの値は典型的であるが、所与のｓｇＲＮＡの開裂効率にはいくらかのばらつきがあり、まれにある種のｓｇＲＮＡは、未だ解明されていない理由により機能しないこともある。本出願人らは、各遺伝子座につき２つのｓｇＲＮＡを設計し、かつ意図される細胞型におけるそれらの効率を試験することを推奨する。

【１０５５】

実施例３１：ＮＬＳ

Ｃａｓ９転写モジュレーター：本出願人らは、Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ　ＣＲＩＳＰＲ系を、ＤＮＡ開裂の域を越える機能が遂行され得る汎用ＤＮＡ結合システムに転換しようと試みた。例えば、１つまたは複数の機能ドメインを触媒的に不活性なＣａｓ９と融合することにより、本出願人らは新規機能、例えば転写活性化／抑制、メチル化／脱メチル化、またはクロマチン改変を付与している。この目標を達成するため、本出願人らは、ヌクレアーゼ活性に必須の２つの残基Ｄ１０およびＨ８４０をアラニンに変えることにより、触媒的に不活性なＣａｓ９突然変異体を作製した。これらの２つの残基を突然変異させることにより、Ｃａｓ９のヌクレアーゼ活性を消失させ、一方で標的ＤＮＡとの結合能は維持する。本出願人らが自らの仮説を検証するため着目することに決めた機能ドメインは、転写活性化因子ＶＰ６４ならびに転写リプレッサーＳＩＤおよびＫＲＡＢである。

【１０５６】

Ｃａｓ９核局在：本出願人らは、最も有効なＣａｓ９転写モジュレーターが、転写に対してその最も大きい影響を及ぼし得るところである核に強力に局在し得るという仮説を立てた。さらに、細胞質内に残る任意のＣａｓ９が望ましくない効果を有する可能性がある。本出願人らは、野生型Ｃａｓ９が核に局在せず、複数の核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含まないことを決定した（ＣＲＩＳＰＲ系が１つ以上のＮＬＳを有する必要はないが、有利には少なくとも１つ以上のＮＬＳを有する）。複数のＮＬＳ配列が必要であったため、Ｃａｓ９を核に入れるのが困難であることは妥当であったとともに、Ｃａｓ９と融合する任意のさらなるドメインが核局在を破壊する可能性があった。従って、本出願人らは、異なるＮＬＳ配列（ｐＸＲＰ０２－ｐＬｅｎｔｉ２－ＥＦ１ａ－ＮＬＳ－ｈＳｐＣｓｎ１（１０Ａ，８４０Ａ）－ＮＬＳ－ＶＰ６４－ＥＧＦＰ、ｐＸＲＰ０４－ｐＬｅｎｔｉ２－ＥＦ１ａ－ＮＬＳ－ｈＳｐＣｓｎ１（１０Ａ，８４０Ａ）－ＮＬＳ－ＶＰ６４－２Ａ－ＥＧＦＰ－ＮＬＳ、ｐＸＲＰ０６－ｐＬｅｎｔｉ２－ＥＦ１ａ－ＮＬＳ－ＥＧＦＰ－ＶＰ６４－ＮＬＳ－ｈＳｐＣｓｎ１（１０Ａ，８４０Ａ）－ＮＬＳ、ｐＸＲＰ０８－ｐＬｅｎｔｉ２－ＥＦ１ａ－ＮＬＳ－ＶＰ６４－ＮＬＳ－ｈＳｐＣｓｎ１（１０Ａ，８４０Ａ）－ＮＬＳ－ＶＰ６４－ＥＧＦＰ－ＮＬＳ）を有する４つのＣａｓ９－ＶＰ６４－ＧＦＰ融合構築物を作製した。これらの構築物をヒトＥＦ１ａプロモーターの発現下にあるレンチ骨格にクローニングした。よりロバストなタンパク質発現のため、ＷＰＲＥエレメントもまた加えた。各構築物を、リポフェクタミン２０００（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｅ　２０００）を使用してＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に形質移入し、形質移入後２４時間でイメージングした。融合タンパク質が融合タンパク質のＮ末端およびＣ末端の両方にＮＬＳ配列を有するとき、最良の核局在が得られる。観察された最も高い核局在は、４つのＮＬＳエレメントを有する構築物で起こった。

【１０５７】

Ｃａｓ９に対するＮＬＳエレメントの影響をさらに確実に理解するため、本出願人らは同じαインポーチンＮＬＳ配列を、０～３個のタンデムリピートを見てＮ末端またはＣ末端のいずれかに付加することにより、１６個のＣａｓ９－ＧＦＰ融合物を作製した。各構築物を、リポフェクタミン２０００（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｅ　２０００）を使用してＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に形質移入し、形質移入後２４時間でイメージングした。顕著なことに、ＮＬＳエレメントの数は核局在の程度と直接相関しない。Ｃ末端にＮＬＳを付加する方が、Ｎ末端への付加と比べて核局在により大きい影響を及ぼす。

【１０５８】

Ｃａｓ９転写活性化因子：本出願人らは、Ｓｏｘ２遺伝子座を標的にしてＲＴ－ｑＰＣＲで転写活性化を定量化することにより、Ｃａｓ９－ＶＰ６４タンパク質の機能試験を行った。Ｓｏｘ２のプロモーターに跨るように８個のＤＮＡ標的部位を選択した。各構築物を、リポフェクタミン２０００（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｅ　２０００）を使用してＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に形質移入し、形質移入後７２時間で細胞から全ＲＮＡを抽出した。１ｕｇのＲＮＡを４０ｕｌ反応物でｃＤＮＡに逆転写した（ｑＳｃｒｉｐｔ　Ｓｕｐｅｒｍｉｘ）。単一の２０ｕｌ　ＴａｑＭａｎアッセイｑＰＣＲ反応に２ｕｌの反応産物を加えた

。各実験は生物学的および技術的トリプリケートで実施した。ＲＴ対照反応およびテンプレート対照反応はいずれも増幅を示さなかった。強力な核局在を示さない構築物ｐＸＲＰ０２およびｐＸＲＰ０４は、活性化が起こらない。実に強力な核局在を示した構築物、ｐＸＲＰ０８については、中程度の活性化が観察された。ガイドＲＮＡＳｏｘ２．４およびＳｏｘ２．５の場合に統計的に有意な活性化が観察された。

【１０５９】

実施例３２：インビボマウスデータ

材料および試薬

Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ融合ポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号６００６７９）

１０×　ＮＥ緩衝液　４（ＮＥＢ、カタログ番号Ｂ７００４Ｓ）

ＢｓａＩ　ＨＦ（ＮＥＢ、カタログ番号Ｒ３５３５Ｓ）

Ｔ７　ＤＮＡリガーゼ（Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ、カタログ番号Ｌ６０２Ｌ）

Ｆａｓｔ　Ｄｉｇｅｓｔ緩衝液、１０×（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ｂ６４）

ＦａｓｔＤｉｇｅｓｔ　ＮｏｔＩ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＦＤ０５９４）

ＦａｓｔＡＰアルカリホスファターゼ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＥＦ０６５１）

リポフェクタミン２０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１１６６８－０１９）

トリプシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１５４０００５４）

鉗子＃４（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｚ１６８７７７－１ＥＡ）

鉗子＃５（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｆ６５２１－１ＥＡ）

１０×　ハンクス平衡塩類溶液（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｈ４６４１－５００ＭＬ）

ペニシリン／ストレプトマイシン溶液（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｐ４３３３）

Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号２１１０３０４９）

Ｂ２７サプリメント（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１７５０４０４４）

Ｌ－グルタミン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号２５０３００８１）

グルタミン酸塩（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号ＲＥＳ５０６３Ｇ－Ａ７）

β－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｍ６２５０－１００ＭＬ）

ＨＡウサギ抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、カタログ番号３７２４Ｓ）

ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）細胞イメージングキット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｒ３７６０１）

３０Ｇ　Ｗｏｒｌｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔシリンジ（Ｗｏｒｌｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、カタログ番号ＮＡＮＯＦＩＬ）

定位固定装置（Ｋｏｐｆ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）

ＵｌｔｒａＭｉｃｒｏＰｕｍｐ３（Ｗｏｒｌｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、カタログ番号ＵＭＰ３－４）

スクロース（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｓ７９０３）

塩化カルシウム（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｃ１０１６）

酢酸マグネシウム（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｍ０６３１）

トリス－ＨＣｌ（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｔ５９４１）

ＥＤＴＡ（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｅ６７５８）

ＮＰ－４０（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号ＮＰ４０）

フェニルメタンスルホニルフルオリド（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号７８８３０）

塩化マグネシウム（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｍ８２６６）
塩化カリウム（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｐ９３３３）
β－グリセロリン酸（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｇ９４２２）
グリセロール（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｇ９０１２）
Ｖｙｂｒａｎｔ（登録商標）ＤｙｅＣｙｃｌｅ（商標）Ｒｕｂｙ染色（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｓ４９４２）
ＦＡＣＳ　Ａｒｉａ　Ｆｌｕ－ａｃｔ－細胞選別機（Ｋｏｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　ＭＩＴ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、米国）
ＤＮＡｅａｓｙ血液および組織キット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号６９５０４）

【１０６０】

手順

インビボで脳において使用されるｇＲＮＡ多重体の構築

本出願人らは、マウスＴＥＴおよびＤＮＭＴファミリーメンバーを標的にする単一のｇＲＮＡを設計し、ＰＣＲ増幅した（本明細書に記載されるとおり）。標的化効率をＮ２ａ細胞系で評価した（図３３）。インビボでいくつかの遺伝子の同時改変を達成するため、効率的なｇＲＮＡをＡＡＶパッケージングベクターに多重化した（図３４）。系の効率のさらなる分析を促進するため、本出願人らは、ヒトシナプシンＩプロモーターの制御下にあるＧＦＰ－ＫＡＳＨドメイン融合タンパク質からなる発現カセットを系に加えた（図３４）。この改変により、ニューロン集団における系の効率のさらなる分析が可能になる（さらに詳細な手順は「核の選別およびインビボ結果」の節にある）。

【１０６１】

系の４つ全てのパーツを、Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ融合ポリメラーゼを使用し、以下のプライマーを使用してＰＣＲ増幅した：

【化２６】

第1のU6フォワード:

gagggtctcgtccttgcggccgcgctagcgagggcctatttcccatgattc (配列番号__)

第1のgRNAリバース:

ctcggtctcggtAAAAAAgcaccgactcggtgccacttttttcaagttgataacggactagc
cttattttaacttgctaTTTCtagctctaaaacNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGTGTTTC
GTCCTTTCCAC (配列番号__)

第2のU6フォワード:

gagggtctcTTTaccggtgagggcctatttcccatgattcc (配列番号__)

第2のgRNAリバース:

ctcggtctcctcAAAAAAgcaccgactcggtgccacttttttcaagttgataacggac
tagc
cttattttaacttgctaTTTCtagctctaaaacNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGTGTTTC
GTCCTTTCCAC (配列番号__)

第3のU6フォワード:

gagggtctcTTTgagctcgagggcctatttcccatgattc

第3のgRNAリバース:

ctcggtctcgcgtAAAAAAgcaccgactcggtgccacttttttcaagttgataacgga
ctag
ccttattttaacttgctaTTTCtagctctaaaacNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGTGTTT
CGTCCTTTCCA (配列番号__)

hSyn_GFP-kashフォワード: gagggtctcTTacgcgtgtgtctagac (配列番号__)

hSyn_GFP-kashリバース:

ctcggtctcAaggaCAGGGAAGGGAGCAGTGGTTCACGCCTGTAATCCCAGCAATTT
GGGA GGCCAAGGTGGGTAGATCACCTGAGATTAGGAGTTGC (配列番号__)

（ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮ（配列番号））
は、標的ゲノム配列の逆相補体である）

【１０６２】

本出願人らは、Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ戦略を用いて単一ステップ反応で系の全てのパーツを組み立てた（１：１分子比）：

【１０６３】

【表６８】

第１のU6_gRNA	18 ng
第２のU6_gRNA	18 ng
第３のU6_gRNA	18 ng
Syn_GFP-kash	100 ng
10x NE緩衝液４	1.0 μl
10x BSA	1.0 μl
10 mM ATP	1.0 μl
BsaI HF	0.75 μl
T7リガーゼ	0.25 μl
ddH_2O	10 μl

サイクル数	条件
1-50	37°Cで５分, 21°Cで５分

【１０６４】
Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ反応産物を、Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ融合ポリメラーゼおよび以下のプライマーを使用してＰＣＲ増幅した：

【化２７】

フォワード　5’ cctgtccttgcggccgcgctagcgagggcc　(配列番号__)

リバース　5’ cacgcggccgcaaggacagggaagggagcag　(配列番号__)

【１０６５】
ＰＣＲ産物を、Ｎｏｔ Ｉ制限部位を使用してＡＡＶ骨格のＩＴＲ配列間にクローニングした：
ＰＣＲ産物消化：

【１０６６】
【表６９】

Fast Digest緩衝液, 10X	3 μl
FastDigest NotI	1 μl
DNA	1 μg
ddH_2O	最大30 μl

【１０６７】
ＡＡＶ骨格消化：

【１０６８】

【表７０】

Fast Digest 緩衝液, 10X	3 μl
FastDigest NotI	1 μl
FastAP アルカリホスファターゼ	1 μl
AAV 骨格	1 μg
ddH_2O	最大 30 μl

【１０６９】
３７℃で２０分間インキュベートした後、ＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用して試料を精製した。標準化した試料を１：３のベクター：インサート比で以下のとおりライゲートした：

【１０７０】
【表７１】

消化した pUC19	50 ng
消化したインサート	1:3 ベクター:インサートモル比
T7 リガーゼ	1 μl
2X 迅速ライゲーション緩衝液	5 μl
ddH_2O	最大 10 μl

【１０７１】
細菌をライゲーション反応産物で形質転換した後、本出願人らは、得られたクローンをサンガーシーケンシングで確認した。

【１０７２】
Ｃａｓ９構築物との同時形質移入後に陽性ＤＮＡクローンをＮ２ａ細胞で試験した（図３５および図３６）。

【１０７３】
ＡＡＶ送達用新規Ｃａｓ９構築物の設計
ＡＡＶ送達系は、そのユニークな特徴にも関わらず、パッキングに限界がある－インビボでの発現カセットの送達を成功させるには、４．７ｋｂ未満のサイズでなければならない。ＳｐＣａｓ９発現カセットのサイズを小さくして送達を促進するため、本出願人らはいくつかの変更を試験した：異なるプロモーター、より短いポリＡシグナルおよび最後により小さいバージョンの黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）由来Ｃａｓ９（ＳａＣａｓ９）（図３７および図３８）。試験した全てのプロモーターが、マウスＭｅｃｐ２（Ｇｒａｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）、ラットＭａｐ１ｂおよびトランケート型ラットＭａｐ１ｂ（Ｌｉｕ　ａｎｄ　Ｆｉｓｃｈｅｒ，１９９６）を含め、以前試験され、ニューロンにおいて活性であることが発表されたものである。代替的な合成ポリＡ配列は、同様に機能性であることが以前示されたものである（Ｌｅｖｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９；Ｇｒａｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）。クローニングした全ての構築物を、リポフェクタミン２０００による形質移入後にＮ２ａ細胞で発現させ、ウエスタンブロッティング法で試験した（図３９）。

【１０７４】
初代ニューロンでＡＡＶ多重系を試験する
開発した系のニューロンにおける機能性を確認するため、本出願人らはインビトロで初代ニューロン培養物を使用する。Ｂａｎｋｅｒ　ａｎｄ　Ｇｏｓｌｉｎ（Ｂａｎｋｅｒ　ａｎｄ　Ｇｏｓｌｉｎ，１９８８）により既発表のプロトコルに従いマウス皮質ニューロ

ンを調製した。
【１０７５】
神経細胞は１６日目の胚から得られる。安楽死させた妊娠中の雌から胚を摘出し、断頭し、頭部を氷冷ＨＢＳＳに置く。次に頭蓋から鉗子（＃４および＃５）で脳を摘出し、別の交換した氷冷ＨＢＳＳに移す。氷冷ＨＢＳＳで満たしたペトリ皿において実体顕微鏡および＃５鉗子の助けを借りてさらなるステップを実施する。半球を互いに分離し、脳幹から髄膜を取り除く。次に海馬を極めて慎重に解剖し、氷冷ＨＢＳＳで満たした１５ｍｌの円錐管に入れる。海馬解剖後に残る皮質を、脳幹の残りの部分および嗅球を取り除いた後に類似のプロトコルを用いたさらなる細胞単離に使用することができる。単離された海馬は１０ｍｌ氷冷ＨＢＳＳで３回洗浄し、ＨＢＳＳ中トリプシン（海馬当たり１０μｌ　２．５％トリプシンを添加した４ｍｌ　ＨＢＳＳ）と共に３７℃で１５分間インキュベートして解離する。トリプシン処理後、海馬を３７℃に予熱したＨＢＳＳで３回極めて慎重に洗浄して痕跡量のトリプシンを取り除き、温ＨＢＳＳ中に解離する。本出願人らは、通常、１ｍｌ　ＨＢＳＳ中の１０～１２個の胚から１ｍｌピペットチップを使用して細胞を解離し、解離した細胞を４ｍｌに至るまで希釈する。細胞を２５０細胞／ｍｍ２の密度でプレーティングし、３７℃および５％ＣＯ２で最長３週間培養する。
ＨＢＳＳ
４３５ｍｌ　Ｈ２Ｏ
５０ｍｌ　１０×ハンクス平衡塩類溶液
１６．５ｍｌ　０．３Ｍ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．３
５ｍｌ　ペニシリン－ストレプトマイシン溶液
ろ過（０．２μｍ）および保存４℃
ニューロンプレーティング培地（１００ｍｌ）
９７ｍｌ　Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ
２ｍｌ　Ｂ２７サプリメント
１ｍｌ　ペニシリン－ストレプトマイシン溶液
２５０μｌ　グルタミン
１２５μｌ　グルタミン酸
【１０７６】
ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞のろ過培地からの濃縮ＡＡＶ１／２ウイルスまたはＡＡＶ１ウイルスを、培養下で４～７日間ニューロンに形質導入し、送達された遺伝子を発現させるため形質導入後少なくとも１週間培養下に保つ。
【１０７７】
系のＡＡＶドライブ発現
本出願人らは、ＡＡＶ送達後のニューロン培養物におけるＳｐＣａｓ９およびＳａＣａｓ９の発現を、ウエスタンブロット法を用いて確認した（図４２）。形質導入後１週間でニューロンをβ－メルカプトエタノール含有ＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳローディング緩衝液に回収し、タンパク質を９５℃で５分間変性させた。試料をＳＤＳ　ＰＡＧＥゲル上で分離し、ＷＢタンパク質検出用のＰＶＤＦ膜に移した。ＨＡ抗体でＣａｓ９タンパク質を検出した。
【１０７８】
ｇＲＮＡ多重ＡＡＶからのＳｙｎ－ＧＦＰ－ｋａｓｈの発現が蛍光顕微鏡法で確認された（図５０）。
【１０７９】
毒性
ＣＲＩＳＰＲ系を含むＡＡＶの毒性を評価するため、本出願人らはウイルス形質導入後１週間のニューロンの全体的な形態を調べた（図４５）。加えて、本出願人らは、設計した系の潜在的毒性を、培養下の生細胞と死細胞との区別を可能にするＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）細胞イメージングキットで調べた。これは、細胞内エステラーゼ活性の存在（非蛍光カルセインＡＭから強度に緑色の蛍光カルセインへの酵素変換により決定される

とおりの）に基づく。他方で、キットの赤色の細胞不透過性成分は、破損した膜を有する細胞に限り侵入し、ＤＮＡに結合して死細胞で蛍光を生じる。両方のフルオロフォアとも、生細胞では蛍光顕微鏡法で容易に可視化され得る。初代皮質ニューロンにおけるＣａｓ９タンパク質および多重ｇＲＮＡ構築物のＡＡＶドライブ発現は十分な忍容性を有し、非毒性であった（図４３および図４４）ことから、設計されたＡＡＶ系がインビボ試験に好適であることを示している。

【１０８０】

ウイルス産生

ＭｃＣｌｕｒｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１に記載される方法により濃縮ウイルスを作製した。ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞において上清ウイルス産生が生じた。

【１０８１】

脳手術

ウイルスベクター注入のため、１０～１５週齢雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｎマウスをケタミン／キシラジンカクテル（１００ｍｇ／ｋｇのケタミン用量および１０ｍｇ／ｋｇのキシラジン用量）で腹腔内注射により麻酔した。先制鎮痛薬（１ｍｇ／ｋｇ）としてブプレネックス（Ｂｕｐｒｅｎｅｘ）の腹腔内（ｉｎｔｒａｐｅｒｉｔｏｎｉａｌ）投与を使用した。動物を、耳内位置決めスタッドおよびトゥースバーを使用してＫｏｐｆ定位固定装置に固定化し、固定された頭蓋を維持した。手持形ドリルを使用して、ブレグマの－３．０ｍｍ後方および３．５ｍｍ側方に、海馬のＣＡ１野における注入用の穴（１～２ｍｍ）を開けた。３０Ｇ　Ｗｏｒｌｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔシリンジを２．５ｍｍの深さで使用して、総容積１ｕｌのＡＡＶウイルス粒子の溶液を注入した。注入は「Ｗｏｒｌｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　ＵｌｔｒａＭｉｃｒｏＰｕｍｐ３」注入ポンプにより０．５ｕｌ／分の流量でモニタして組織損傷を防いだ。注入が完了した時点で注射針をゆっくりと、０．５ｍｍ／分の速度で取り出す。注入後、６－０　Ｅｔｈｉｌｏｎ縫合糸で皮膚を閉じた。動物を術後に１ｍＬの乳酸加リンゲル液（皮下）で水分補給させ、歩行可能な回復に達するまで温度制御された（３７℃）環境に収容した。術後３週間で深麻酔により動物を安楽死させ、続いて核選別のため組織を摘出するか、または免疫化学のため４％パラホルムアルデヒドを灌流させた。

【１０８２】

核の選別およびインビボ結果

本出願人らは、標識した細胞核の蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）ならびにＤＮＡ、ＲＮＡおよび核タンパク質の下流処理のためｇＲＮＡ標的神経細胞核をＧＦＰで特異的に遺伝的にタグ標識する方法を設計した。そのために、本出願人らの多重ターゲティングベクターが、ＧＦＰとマウス核膜タンパク質ドメインＫＡＳＨ（Ｓｔａｒｒ　ＤＡ，２０１１，Ｃｕｒｒｅｎｔ　ｂｉｏｌｏｇｙ）との間の融合タンパク質および目的の特異的遺伝子座を標的にする３つのｇＲＮＡの両方を発現するように設計された（図３４）。ＧＦＰ－ＫＡＳＨはヒトシナプシンプロモーターの制御下で発現してニューロンを特異的に標識した。融合タンパク質ＧＦＰ－ＫＡＳＨのアミノ酸は以下であった：

【化２８】

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICT
TGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGN
YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIK
VNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMV
LLEFVTAAGITLGMDELYKSGLRSREEEEETDSRMPHLDSPGSSQPRRSFLSRVIRAAL
PLQLLLLLLLLLACLLPASEDDYSCTQANNFARSFYPMLRYTNGPPPT (配列番号__)

【１０８３】

脳へのＡＡＶ１／２媒介性送達後１週間でＧＦＰ－ＫＡＳＨのロバストな発現が観察さ

れた。標識された核のＦＡＣＳおよび下流処理のため、術後３週間で海馬を解剖し、勾配遠心ステップを用いて細胞核精製用に処理した。そのために、３２０ｍＭ　スクロース、５ｍＭ　ＣａＣｌ、３ｍＭ　Ｍｇ（Ａｃ）２、１０ｍＭ　トリス　ｐＨ７．８、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％ＮＰ４０、０．１ｍＭ　フェニルメタンスルホニルフルオリド（ＰＭＳＦ）、１ｍＭ　β－メルカプトエタノール中で２ｍｌ　Ｄｏｕｎｃｅホモジナイザー（Ｓｉｇｍａ）を使用して組織をホモジナイズした。ホモジナイズ処理物を、２５％～２９％のＯｐｔｉｐｒｅｐ（登録商標）勾配で製造者のプロトコルに従い３０分間３．５００ｒｐｍ、４℃で遠心した。核ペレットを、３４０ｍＭ　スクロース、２ｍＭ　ＭｇＣｌ２、２５ｍＭ　ＫＣｌ、６５ｍＭ　グリセロリン酸、５％グリセロール、０．１ｍＭ　ＰＭＳＦ、１ｍＭ　β－メルカプトエタノール中に再懸濁し、Ｖｙｂｒａｎｔ（登録商標）ＤｙｅＣｙｃｌｅ（商標）Ｒｕｂｙ染色（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を添加して細胞核を標識した（ＤＮＡに近赤外放射を提供する）。標識し精製した核を、Ａｒｉａ　Ｆｌｕ－ａｃｔ細胞選別機およびＢＤＦＡＣＳ　Ｄｉｖａソフトウェアを使用してＦＡＣＳにより選別した。選別されたＧＦＰ＋核およびＧＦＰ－核を最終的に使用することにより、標的ゲノム領域のＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイ分析のためＤＮＡｅａｓｙ血液および組織キット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してゲノムＤＮＡを精製した。同じ手法を、下流処理のための標的細胞からの核ＲＮＡまたはタンパク質の精製に容易に用いることができる。本出願人らがこの手法で用いているのが２ベクター系（図３４）であることに起因して、脳のごく一部の細胞（多重ターゲティングベクターおよびＣａｓ９コードベクターの両方を同時感染させた細胞）においてのみ効率的なＣａｓ９媒介性ＤＮＡ開裂が起こることが予想された。ここに記載する方法は、本出願人らが目的の３つのｇＲＮＡを発現する細胞集団からＤＮＡ、ＲＮＡおよび核タンパク質を特異的に精製することを可能にし、従ってＣａｓ９媒介性ＤＮＡ開裂を起こすはずである。この方法を用いることにより、本出願人らは、ごく一部の細胞においてのみ起こるインビボでの効率的なＤＮＡ開裂を可視化することができた。

【１０８４】

本質的に、本出願人らがここで示したものは、標的インビボ開裂である。さらに本出願人らは多重的手法を使用し、ここではいくつかの異なる配列が同時に、但し独立してターゲティングされる。提供される系は、脳の病的状態（遺伝子ノックアウト、例えばパーキンソン病）の研究に応用することができ、また脳におけるゲノム編集ツールのさらなる開発分野も切り開くことができる。ヌクレアーゼ活性を遺伝子転写調節因子または後成的調節因子に置き換えることにより、病的状態のみならず、学習および記憶形成のような生理学的過程における遺伝子調節および脳の後成的変化の役割に関するあらゆる種類の科学的問題に答えることが可能になる。最後に、提供される技術は、霊長類のようなより複雑な哺乳類系において応用することができ、これにより現在の技術の限界を乗り越えることが可能となる。

【１０８５】

実施例３３：モデルデータ

いくつかの疾患モデルが特に研究されている。それらには、デノボ自閉症リスク遺伝子ＣＨＤ８、ＫＡＴＮＡＬ２、およびＳＣＮ２Ａ；および症候性自閉症（アンジェルマン症候群）遺伝子ＵＢＥ３Ａが含まれる。これらの遺伝子および得られる自閉症モデルは当然ながら好ましいが、本発明を任意の遺伝子に適用することができ、従って任意のモデルが可能であることを示している。

【１０８６】

本出願人らは、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）においてＣａｓ９ヌクレアーゼを使用してこれらの細胞系を作製した。これらの株は、ｈＥＳＣにＣｂｈ－Ｃａｓ９－２Ａ－ＥＧＦＰおよびｐＵ６－ｓｇＲＮＡを一過性に形質移入することにより作成された。ほとんどの場合に、自閉症患者の全エクソンシーケンシング研究から患者ナンセンス（ノックアウト）突然変異が最近になって記載されている同じエクソンを標的にして、各遺伝子につき２つのｓｇＲＮＡが設計される。本計画のため特にＣａｓ９－２Ａ－ＥＧＦＰおよびｐＵ６

プラスミドを作成した。
【１０８７】
実施例３４：ＡＡＶ産生系またはプロトコル
本明細書には、ハイスループットスクリーニング用途のために開発された、かつそれで特に上手く機能するＡＡＶ産生系またはプロトコルが提供され、しかしながらこれは、本発明においても同様により広い適用性を有する。内因性遺伝子発現の操作は、発現速度が、調節エレメント、ｍＲＮＡプロセシング、および転写物の安定性を含めた多くの要因に依存するため、種々の難題を突きつける。この難題を解消するため、本出願人らは、送達用のアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベースのベクターを開発した。ＡＡＶはｓｓＤＮＡベースのゲノムを有し、従って組換えを起こしにくい。
【１０８８】
ＡＡＶ１／２（血清型ＡＡＶ１／２、すなわち、ハイブリッドまたはモザイクＡＡＶ１／ＡＡＶ２カプシドＡＡＶ）ヘパリン精製濃縮ウイルスプロトコル
培地：Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ
５００ｍｌボトルＤＭＥＭ高グルコース＋Ｇｌｕｔａｍａｘ（ＧＩＢＣＯ）
５０ｍｌ　Ｈｙｃｌｏｎｅ　ＦＢＳ（熱失活）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ）
５．５ｍｌ　ＨＥＰＥＳ溶液（１Ｍ、ＧＩＢＣＯ）
細胞：低継代ＨＥＫ２９３ＦＴ（ウイルス産生時の継代数＜１０、ウイルス産生には継代数２～４の新しい細胞を解凍し、３～５代成長させる）
形質移入試薬：ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）「Ｍａｘ」
５０ｍｌ滅菌超高純度Ｈ２Ｏに５０ｍｇ　ＰＥＩ「Ｍａｘ」を溶解する
ｐＨを７．１に調整する
０．２２ｕｍフリップトップフィルターでろ過する
チューブを密閉し、パラフィルムで包む
アリコートを－２０℃で凍結する（保存のため、また直ちに使用してもよい）
細胞培養
Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ中で低継代ＨＥＫ２９３ＦＴを培養する
毎日１：２～１：２．５で継代する
有利には細胞を８５％より高いコンフルエンシーに至らせない
Ｔ７５について
－フラスコ当たり１０ｍｌ　ＨＢＳＳ（－Ｍｇ２＋、－Ｃａ２＋、ＧＩＢＣＯ）＋１ｍｌ　ＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（ＧＩＢＣＯ）を３７℃に温める（ウォーターバス）
培地を完全に吸引する
－１０ｍｌの温ＨＢＳＳを穏やかに添加する（培地を完全に洗い流すため）
－フラスコ当たり１ｍｌのＴｒｙｐＬＥを添加する
－フラスコをインキュベーター（３７℃）に１分間置く
－フラスコを揺り動かして細胞を剥がす
－９ｍｌのＤ１０＋ＨＥＰＥＳ培地（３７℃）を添加する
－上下に５回ピペッティングして単一細胞懸濁液を作成する
－１：２～１：２．５（Ｔ７５には１２ｍｌの培地）の比で分割する（細胞の成長が遅い場合、廃棄して新しいバッチを解凍する、それらは最適成長でない）
－十分な（大量の細胞の取り扱いが容易になるだけの）細胞が存在するようになったら直ちにＴ２２５に移す
ＡＡＶ産生（構築物当たり５×１５ｃｍディッシュスケール）：
１０００万細胞を１５ｃｍディッシュ中２１．５ｍｌ培地にプレーティングする
３７℃で１８～２２時間インキュベートする
８０％コンフルエンスでの形質移入が理想的である
プレート当たり
２２ｍｌ培地（Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ）を予熱する
ＤＮＡ混合物を含むチューブを調製する（内毒素不含ｍａｘｉｐｒｅｐ　ＤＮＡを使用す

る）：
５．２ｕｇ　目的のベクターのプラスミド
４．３５ｕｇ　ＡＡＶ血清型１プラスミド
４．３５ｕｇ　ＡＡＶ血清型２プラスミド
１０．４ｕｇ　ｐＤＦ６プラスミド（アデノウイルスヘルパー遺伝子）・ボルテックスして混合する
４３４ｕＬ　ＤＭＥＭを添加する（無血清！）
１３０ｕｌ　ＰＥＩ溶液を添加する
５～１０秒間ボルテックスする
ＤＮＡ／ＤＭＥＭ／ＰＥＩ混合物を予熱した培地に添加する
短時間ボルテックスして混合する
１５ｃｍディッシュ中の培地をＤＮＡ／ＤＭＥＭ／ＰＥＩ混合物に交換する
３７℃インキュベーターに戻す
４８時間インキュベートした後回収する（培地が過度に酸性にならないようにすること）

【１０８９】
ウイルス回収：
１．１５ｃｍディッシュから培地を慎重に吸引する（有利には細胞を押し退けない）

【１０９０】
２．各プレートに２５ｍｌ　ＲＴ　ＤＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を添加し、細胞スクレーパーで細胞を穏やかに剥がし取る。５０ｍｌチューブに懸濁液を収集する。

【１０９１】
３．８００×ｇで１０分間細胞をペレット化する。

【１０９２】
４．上清を廃棄する。

【１０９３】
休題：必要に応じて細胞ペレットを－８０℃で凍結する
５．ペレットを１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス　ｐＨ８．０中に再懸濁し、組織培養プレート当たり１０ｍｌを使用する。

【１０９４】
６．ｄＨ２Ｏ中に１０％デオキシコール酸ナトリウムの新鮮な溶液を調製する。これを０．５％の最終濃度で組織培養プレート当たり１．２５ｍｌ添加する。ベンゾナーゼ（ｂｅｎｚｏｎａｓｅ）ヌクレアーゼを５０単位／ｍｌの最終濃度となるように添加する。チューブを徹底的に混合する。

【１０９５】
７．３７℃で１時間（ウォーターバス）インキュベートする。

【１０９６】
８．３０００×ｇで１５分間遠心することにより細胞残屑を除去する。新鮮な５０ｍｌチューブに移し、ヘパリンカラムの詰まりを防ぐため、全ての細胞残屑が除去されたことを確実にする。

【１０９７】
ＡＡＶ１／２のヘパリンカラム精製：
１．蠕動ポンプを使用して、溶液が毎分１ｍｌでカラムを通って流れるようにＨｉＴｒａｐヘパリンカラムをセットアップする。ヘパリンカラム内に気泡が取り込まれないよう確実にすることが重要である。

【１０９８】
２．蠕動ポンプを使用して、１０ｍｌ　１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０でカラムを平衡化する。

【１０９９】
３．ウイルスの結合：５０ｍｌウイルス溶液をカラムに加え、中を通って流れさせる。

【１１００】

４．洗浄ステップ１：カラムを２０ｍｌ　１００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０で（蠕動ポンプを使用）。

【１１０１】

５．洗浄ステップ２：３ｍｌまたは５ｍｌシリンジを使用して、１ｍｌ　２００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０、続いて１ｍｌ　３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０でカラムの洗浄を続ける。

【１１０２】

フロースルーは廃棄する。

（上記のウイルス溶液を５０分間流す間、種々の緩衝液でシリンジを調製する）

【１１０３】

６．溶出　５ｍｌシリンジおよび軽い圧力（＜１ｍｌ／分の流量）を使用して、以下を加えることによりカラムからウイルスを溶出させる：

１．５ｍｌ　４００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０

３．０ｍｌ　４５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０

１．５ｍｌ　５００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０

これらを１５ｍｌ遠心管に収集する。

【１１０４】

ＡＡＶ１／２の濃縮：

１．濃縮ステップ１：１００，０００分子量カットオフのＡｍｉｃｏｎ　ｕｌｔｒａ　１５ｍｌ遠心フィルターユニットを使用して、溶出したウイルスを濃縮する。カラム溶出物を濃縮機にロードし、２０００×ｇで２分間遠心する（室温で。濃縮された容積を確認する－約５００μｌとなるはずである。必要であれば、正しい容積に達するまで１分間隔で遠心する。

【１１０５】

２．緩衝液交換：１ｍｌの滅菌ＤＰＢＳをフィルターユニットに添加し、正しい容積（５００ｕｌ）に達するまで１分間隔で遠心する。

【１１０６】

３．濃縮ステップ２：５００ｕｌの濃縮物をＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　０．５ｍｌ　１００Ｋフィルターユニットに添加する。６０００ｇで２分間遠心する。濃縮された容積を確認する－約１００μｌとなるはずである。必要であれば、正しい容積に達するまで１分間隔で遠心する。

【１１０７】

４．回収：フィルターインサートを反転させ、新鮮な収集チューブに挿入する。１０００ｇで２分間遠心する。

【１１０８】

アリコートに分け、－８０℃で凍結する

典型的には注入部位当たり１ｕｌが必要であり、従って少量のアリコート（例えば５ｕｌ）が推奨される（ウイルスの凍結融解を回避する）。

ｑＰＣＲを使用してＤＮアーゼＩ耐性ＧＣ粒子力価を決定する（別個のプロトコルを参照）

【１１０９】

材料

Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ、０．５ｍｌ、１００Ｋ；ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ；ＵＦＣ５１００２４

Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ、１５ｍｌ、１００Ｋ；ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ；ＵＦＣ９１００２４

Ｂｅｎｚｏｎａｓｅヌクレアーゼ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｅ１０１４

ＨｉＴｒａｐヘパリンカートリッジ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；５４８３６

デオキシコール酸ナトリウム；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｄ５６７０

【１１１０】

ＡＡＶ１上清産生プロトコル
培地：Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ
５００ｍｌボトルＤＭＥＭ高グルコース＋Ｇｌｕｔａｍａｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）
５０ｍｌ　Ｈｙｃｌｏｎｅ　ＦＢＳ（熱失活）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ）
５．５ｍｌ　ＨＥＰＥＳ溶液（１Ｍ、ＧＩＢＣＯ）
細胞：低継代ＨＥＫ２９３ＦＴ（ウイルス産生時の継代数＜１０）
ウイルス産生には継代数２～４の新しい細胞を解凍し、２～５代成長させる
形質移入試薬：ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）「Ｍａｘ」
５０ｍｌ滅菌超高純度Ｈ２Ｏに５０ｍｇ　ＰＥＩ「Ｍａｘ」を溶解する
ｐＨを７．１に調整する
０．２２ｕｍフリップトップフィルターでろ過する
チューブを密閉し、パラフィルムで包む
アリコートを－２０℃で凍結する（保存のため、また直ちに使用してもよい）
【１１１１】
細胞培養
Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ中で低継代ＨＥＫ２９３ＦＴを培養し、毎日１：２～１：２．５で継代する
有利には細胞を８５％より高いコンフルエンシーに至らせる
Ｔ７５について
－フラスコ当たり１０ｍｌ　ＨＢＳＳ（－Ｍｇ２＋、－Ｃａ２＋、ＧＩＢＣＯ）＋１ｍｌ　ＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（ＧＩＢＣＯ）を３７℃に温める（ウォーターバス）
－培地を完全に吸引する
－１０ｍｌの温ＨＢＳＳを穏やかに添加する（培地を完全に洗い流すため）
－フラスコ当たり１ｍｌのＴｒｙｐＬＥを添加する
－フラスコをインキュベーター（３７℃）に１分間置く
－フラスコを揺り動かして細胞を剥がす
－９ｍｌのＤ１０＋ＨＥＰＥＳ培地（３７℃）を添加する
－上下に５回ピペッティングして単一細胞懸濁液を作成する
－１：２～１：２．５（Ｔ７５には１２ｍｌの培地）の比で分割する（細胞の成長が遅い場合、廃棄して新しいバッチを解凍する、それらは最適成長でない）
－十分な（大量の細胞の取り扱いが容易になるだけの）細胞が存在するようになったら直ちにＴ２２５に移す
ＡＡＶ産生（単一１５ｃｍディッシュスケール）
１０００万細胞を１５ｃｍディッシュ中２１．５ｍｌ培地にプレーティングする
３７℃で１８～２２時間インキュベートする
プレート毎に８０％コンフルエンスでの形質移入が理想的である
２２ｍｌ培地（Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ）を予熱する
ＤＮＡ混合物を含むチューブを調製する（内毒素不含ｍａｘｉｐｒｅｐ　ＤＮＡを使用する）：
５．２ｕｇ　目的ベクターのプラスミド
８．７ｕｇ　ＡＡＶ血清型１プラスミド
１０．４ｕｇ　ＤＦ６プラスミド（アデノウイルスヘルパー遺伝子）
ボルテックスして混合する
４３４ｕＬ　ＤＭＥＭを添加する（無血清！）１３０ｕｌ　ＰＥＩ溶液を添加する
５～１０秒間ボルテックスする
ＤＮＡ／ＤＭＥＭ／ＰＥＩ混合物を予熱した培地に添加する
短時間ボルテックスして混合する
１５ｃｍディッシュ中の培地をＤＮＡ／ＤＭＥＭ／ＰＥＩ混合物に交換する
３７℃インキュベーターに戻す
４８時間インキュベートした後回収する（有利には、培地が過度に酸性にならないよう監

視する）
【１１１２】
ウイルス回収：
１５ｃｍディッシュから上清を取り出す
０．４５ｕｍフィルター（低タンパク質結合）でろ過し、アリコートに分け、－８０℃で凍結する
形質導入（２４ウェルフォーマット、５ＤＩＶでの初代ニューロン培養）
形質導入されるニューロンの各ウェル内の完全ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地を新鮮なｎｅｕｒｏｂａｓａｌに交換する（通常、ウェルにつき５００ｕｌ中４００ｕｌが交換される）
３７℃のウォーターバスでＡＡＶ上清を解凍する
インキュベーターで３０分間平衡化させる
各ウェルに２５０ｕｌ　ＡＡＶ上清を添加する
３７℃で２４時間インキュベートする
培地／上清を取り出し、新鮮な完全ｎｅｕｒｏｂａｓａｌに交換する
４８時間後に発現が目に見え始め、感染後約６～７日で飽和する
ＧＯＩ（目的の遺伝子）を含むｐＡＡＶプラスミド用の構築物は、両方のＩＴＲＳを含めて４．８ｋｂを超えてはならない。
【１１１３】
ヒトコドン最適化配列（すなわちヒトでの発現に最適化されている）配列の例：ＳａＣａｓ９を以下に提供する：（配列番号＿＿＿）

【化２９】

ACCGGTGCCACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGC
TTCGCCGAAGAAAAAGCGCAAGGTCGAAGCGTCCATGAAAAGGAACTACATTCT
GGGGCTGGACATCGGGATTACAAGCGTGGGGTATGGGATTATTGACTATGAAAC
AAGGGACGTGATCGACGCAGGCGTCAGACTGTTCAAGGAGGCCAACGTGGAAAA
CAATGAGGGACGGAGAAGCAAGAGGGGAGCCAGGCGCCTGAAACGACGGAGAA
GGCACAGAATCCAGAGGGTGAAGAAACTGCTGTTCGATTACAACCTGCTGACCG
ACCATTCTGAGCTGAGTGGAATTAATCCTTATGAAGCCAGGGTGAAAGGCCTGA
GTCAGAAGCTGTCAGAGGAAGAGTTTTCCGCAGCTCTGCTGCACCTGGCTAAGC
GCCGAGGAGTGCATAACGTCAATGAGGTGGAAGAGGACACCGGCAACGAGCTG
TCTACAAAGGAACAGATCTCACGCAATAGCAAAGCTCTGGAAGAGAAGTATGTC
GCAGAGCTGCAGCTGGAACGGCTGAAGAAAGATGGCGAGGTGAGAGGGTCAATT
AATAGGTTCAAGACAAGCGACTACGTCAAAGAAGCCAAGCAGCTGCTGAAAGTG
CAGAAGGCTTACCACCAGCTGGATCAGAGCTTCATCGATACTTATATCGACCTGC
TGGAGACTCGGAGAACCTACTATGAGGGACCAGGAGAAGGGAGCCCCTTCGGAT
GGAAAGACATCAAGGAATGGTACGAGATGCTGATGGGACATTGCACCTATTTTCC
AGAAGAGCTGAGAAGCGTCAAGTACGCTTATAACGCAGATCTGTACAACGCCCT
GAATGACCTGAACAACCTGGTCATCACCAGGGATGAAAACGAGAAACTGGAATA
CTATGAGAAGTTCCAGATCATCGAAAACGTGTTTAAGCAGAAGAAAAAGCCTAC
ACTGAAACAGATTGCTAAGGAGATCCTGGTCAACGAAGAGGACATCAAGGGCTA
CCGGGTGACAAGCACTGGAAAACCAGAGTTCACCAATCTGAAAGTGTATCACGA
TATTAAGGACATCACAGCACGGAAAGAAATCATTGAGAACGCCGAACTGCTGGA
TCAGATTGCTAAGATCCTGACTATCTACCAGAGCTCCGAGGACATCCAGGAAGAG
CTGACTAACCTGAACAGCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAACAGATTAGTAAT
CTGAAGGGGTACACCGGAACACACAACCTGTCCCTGAAAGCTATCAATCTGATTC
TGGATGAGCTGTGGCATACAAACGACAATCAGATTGCAATCTTTAACCGGCTGAA
GCTGGTCCCAAAAAAGGTGGACCTGAGTCAGCAGAAAGAGATCCCAACCACACT

【化３０】

GGTGGACGATTTCATTCTGTCACCCGTGGTCAAGCGGAGCTTCATCCAGAGCATCAA
AGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTGCCCAATGATATCATTATCGAGCT
GGCTAGGGAGAAGAACAGCAAGGACGCACAGAAGATGATCAATGAGATGCAGAAA
CGAAACCGGCAGACCAATGAACGCATTGAAGAGATTATCCGAACTACCGGGAAAGA
GAACGCAAAGTACCTGATTGAAAAAATCAAGCTGCACGATATGCAGGAGGGAAAGT
GTCTGTATTCTCTGGAGGCCATCCCCCTGGAGGACCTGCTGAACAATCCATTCAACT
ACGAGGTCGATCATATTATCCCCAGAAGCGTGTCCTTCGACAATTCCTTTAACAACA
AGGTGCTGGTCAAGCAGGAAGAGAACTCTAAAAAGGGCAATAGGACTCCTTTCCAG
TACCTGTCTAGTTCAGATTCCAAGATCTCTTACGAAACCTTTAAAAAGCACATTCTG
AATCTGGCCAAAGGAAAGGGCCGCATCAGCAAGACCAAAAAGGAGTACCTGCTGG
AAGAGCGGGACATCAACAGATTCTCCGTCCAGAAGGATTTTATTAACCGGAATCTG
GTGGACACAAGATACGCTACTCGCGGCCTGATGAATCTGCTGCGATCCTATTTCCGG
GTGAACAATCTGGATGTGAAAGTCAAGTCCATCAACGGCGGGTTCACATCTTTTCTG
AGGCGCAAATGGAAGTTTAAAAAGGAGCGCAACAAAGGGTACAAGCACCATGCCG
AAGATGCTCTGATTATCGCAAATGCCGACTTCATCTTTAAGGAGTGGAAAAAGCTGG
ACAAAGCCAAGAAAGTGATGGAGAACCAGATGTTCGAAGAGAAGCAGGCCGAATC
TATGCCCGAAATCGAGACAGAACAGGAGTACAAGGAGATTTTCATCACTCCTCACC
AGATCAAGCATATCAAGGATTTCAAGGACTACAAGTACTCTCACCGGGTGGATAAA
AAGCCCAACAGAGAGCTGATCAATGACACCCTGTATAGTACAAGAAAAGACGATAA
GGGGAATACCCTGATTGTGAACAATCTGAACGGACTGTACGACAAAGATAATGACA
AGCTGAAAAAGCTGATCAACAAAAGTCCCGAGAAGCTGCTGATGTACCACCATGAT
CCTCAGACATATCAGAAACTGAAGCTGATTATGGAGCAGTACGGCGACGAGAAGAA
CCCACTGTATAAGTACTATGAAGAGACTGGGAACTACCTGACCAAGTATAGCAAAA
AGGATAATGGCCCCGTGATCAAGAAGATCAAGTACTATGGGAACAAGCTGAATGCC
CATCTGGACATCACAGACGATTACCCTAACAGTCGCAACAAGGTGGTCAAGCTGTC
ACTGAAGCCATACAGATTCGATGTCTATCTGGACAACGGCGTGTATAAATTTGTGAC
TGTCAAGAATCTGGATGTCATCAAAAAGGAGAACTACTATGAAGTGAATAGCAAGT
GCTACGAAGAGGCTAAAAAGCTGAAAAAGATTAGCAACCAGGCAGAGTTCATCGCC
TCCTTTTACAACAACGACCTGATTAAGATCAATGGCGAACTGTATAGGGTCATCGGG
GTGAACAATGATCTGCTGAACCGCATTGAAGTGAATATGATTGACATCACTTACCGA
GAGTATCTGGAAAACATGAATGATAAGCGCCCCCCTCGAATTATCAAAACAATTGC

【化３１】

CTCTAAGACTCAGAGTATCAAAAAGTACTCAACCGACATTCTGGGAAACCTGTATGA
GGTGAAGAGCAAAAAGCACCCTCAGATTATCAAAAAGGGCTAAGAATTC

【１１１４】

実施例３５：Ｃａｓ９ニッカーゼおよび２つのガイドＲＮＡを使用したオフターゲット開裂の最小化

Ｃａｓ９は、ＲＮＡにガイドされるＤＮＡヌクレアーゼであり、２０ｂｐ　ＲＮＡガイドの助けによりゲノムにおける特定の位置にターゲティングされ得る。しかしながら、ガイド配列はガイド配列とＤＮＡ標的配列との間のいくらかのミスマッチを許容し得る。ガイドＲＮＡによってＣａｓ９が、ガイド配列と数塩基の違いを有するオフターゲット配列をターゲティングするき、オフターゲット開裂が起こる可能性があるため、この柔軟性は望ましくない。全ての実験的応用（遺伝子ターゲティング、作物エンジニアリング、治療適用等）について、Ｃａｓ９媒介性遺伝子ターゲティングの特異性を向上させ、かつＣａｓ９によるオフターゲット改変の可能性を低下させることが重要である。

【１１１５】

本出願人らは、Ｃａｓ９ニッカーゼ突然変異体を２つのガイドＲＮＡと組み合わせて使用して、オフターゲット改変なしにゲノム中の標的二本鎖切断を促進する方法を開発した。Ｃａｓ９ニッカーゼ突然変異体は、Ｃａｓ９ヌクレアーゼから、その開裂活性を無効にすることにより作成され、従ってＤＮＡ二重鎖の両鎖が開裂される代わりに一方の鎖のみが開裂される。Ｃａｓ９ニッカーゼは、Ｃａｓ９ヌクレアーゼの１つ以上のドメイン、例えばＲｕｖｃ１またはＨＮＨに突然変異を誘発することにより作成されてもよい。これらの突然変異には、限定はされないが、Ｃａｓ９触媒ドメインの突然変異が含まれてもよく、例えばＳｐＣａｓ９では、これらの突然変異はＤ１０位またはＨ８４０位にあり得る。これらの突然変異には、限定はされないが、ＳｐＣａｓ９におけるＤ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡまたはＤ９８６Ａが含まれ得るが、ニッカーゼは、他のＣＲＩＳＰＲ酵素またはＣａｓ９オルソログにおける対応する位置に突然変異を誘発することにより作成されてもよい。本発明の最も好ましい実施形態において、Ｃａｓ９ニッカーゼ突然変異体は、Ｄ１０Ａ突然変異を有するＳｐＣａｓ９ニッカーゼである。

【１１１６】

これの機能の仕方は、Ｃａｓ９ニッカーゼと組み合わせた各ガイドＲＮＡが二重鎖ＤＮＡ標的の標的一本鎖切断を誘導し得ることである。各ガイドＲＮＡが１つの鎖にニックを入れるため、正味の結果は二本鎖切断となる。この方法でオフターゲット突然変異がなくなる理由は、両方のガイド配列に高度な類似性を有するオフターゲット部位を有する可能性が極めて低いためである（各ガイドにつき２０ｂｐ＋２ｂｐ（ＰＡＭ）＝２２ｂｐの特異性、および２つのガイドは、任意のオフターゲット部位が４４ｂｐ近くの相同配列を有しなければならないことを意味する）。個々のガイドがオフターゲットを有し得る可能性はなおあるが、それらのオフターゲットはニッキングされるに過ぎず、それが突然変異誘発性のＮＨＥＪプロセスによって修復される可能性は低い。従ってＤＮＡ二本鎖ニッキングの多重化は、オフターゲットの突然変異誘発効果なしに標的ＤＮＡ二本鎖切断を導入する強力な方法を提供する。

【１１１７】

本出願人らは、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞と、Ｃａｓ９（Ｄ１０Ａ）ニッカーゼならびに１つ以上のガイド用のＤＮＡ発現カセットをコードするプラスミドとの同時形質移入を含む実験を実施した。本出願人らは、リポフェクタミン２０００を使用して細胞を形質移入し、形質移入後４８時間または７２時間で形質移入細胞を回収した。二重ニッキングにより誘導されるＮＨＥＪを、本明細書において先述したとおりＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイを使用して検出した（図５１、図５２および図５３）。

【１１１８】

本出願人らはさらに、２つのガイドＲＮＡと組み合わせたときのＣａｓ９ニッカーゼ突然変異体による効率的な開裂に関係するパラメータを特定しており、それらのパラメータには、限定はされないが、５’オーバーハングの長さが含まれる。少なくとも２６塩基対の５’オーバーハングについて効率的な開裂が報告される。本発明の好ましい実施形態において、５’オーバーハングは少なくとも３０塩基対およびより好ましくは少なくとも３４塩基対である。最大２００塩基対のオーバーハングが開裂に許容され得るが、１００塩

基対未満の５’オーバーハングが好ましく、および５０塩基対未満の５’オーバーハングが最も好ましい（図５４および図５５）。

【１１１９】

実施例３６：Ｃａｓ９を使用した哺乳類脳における遺伝子機能のインビボ研究

インビボで脳内のニューロンのゲノムを正確に操作可能であることによって、正常および疾患に関連する脳のプロセスにおける遺伝子機能の迅速な分析が可能となる。本出願者らは、微生物エンドヌクレアーゼＣａｓ９および単一ガイドＲＮＡを成体マウス脳の特定の細胞型にＡＡＶの媒介で送達することにより、単一のおよび多重化した遺伝子ノックアウトが促進されたことを示す。２週間以内にメチルＣｐＧ結合タンパク質（ＭｅＣＰ２）のＣａｓ９媒介性ノックアウトが標的ニューロンの形態学的変化を誘導し、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼタンパク質ファミリー（Ｄｎｍｔ１、Ｄｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ３ｂ）の多重ノックアウトが文脈恐怖条件付けにおけるマウスの行動を変化させた。総合すると、本出願者らの結果は、脳内の遺伝子機能の迅速な逆遺伝学的研究を促進し、かつ時間のかかるトランスジェニック動物モデルの使用に代わる魅力的な選択肢を提供するＣａｓ９の可能性を実証している。

【１１２０】

疾患関連突然変異を有するトランスジェニック動物モデルは、神経精神疾患の研究に極めて有用であり、疾患の遺伝的および病態生理学的機構を解明する助けとなる。しかしながら、一部の精神神経障害は単一遺伝子欠損に関連することが知られているものの、統合失調症、自閉症および鬱病を含め、認知障害および精神障害の大部分は、複数の遺伝的変異に関連する。複数の遺伝子改変を同時に有する動物モデルの作成は特に労力を要し、何世代にもわたる時間のかかる育種が必要である。化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼＣａｓ９（ＳｐＣａｓ９）は、複製真核細胞において単一および複数の遺伝子の正確かつ効率的なゲノム開裂を媒介することが示されている。Ｃａｓ９ヌクレアーゼを、特定のゲノム遺伝子座を開裂するように指図して標的二本鎖切断を誘導することができ、それによりフレームシフト挿入／欠失（インデル）突然変異が生じる（図５９Ａ）。本出願者らは、Ｃａｓ９を使用して脳のプロセスにおける個々のまたは集団での遺伝子の機能を研究し、ならびに単一遺伝子および多遺伝子障害をインビボでモデル化する可能性を探索した。

【１１２１】

アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）は、マウス脳への組換え遺伝子の送達によく用いられている。本出願者らは、デュアルベクターＡＡＶベースのＣａｓ９およびｓｇＲＮＡ送達系を設計した（図５６Ａ）。このＡＡＶ系の主な制約は、導入遺伝子カセットのパッケージングサイズ（ＩＴＲを除き約４．５ｋｂ）である。ＳｐＣａｓ９のサイズは約４．２ｋｂであるため、効率的かつ細胞型特異的な遺伝子発現に必要な他の遺伝エレメントに残されるのは０．３ｋｂ未満となる。本出願者らは、トランケート型のマウスＭｅｃｐ２プロモーター（２３５ｂｐ、ｓＭｅｃｐ２）およびショートポリアデニル化シグナル（４８ｂｐ、ｓｐＡ）が培養マウス皮質ニューロンにおけるＣａｓ９のロバストな発現をドライブするのに十分であることを特定した（図５６Ｂ；図５９Ｂ～図５９Ｄ）。ニューロンにおけるｓｇＲＮＡの発現をドライブするため、本出願者らは第２のｓｇＲＮＡコードベクターを使用した。加えて、本出願者らは、ｓｇＲＮＡ送達を標的細胞核の同時蛍光標識と組み合わせた。緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をＫＡＳＨ核膜貫通ドメインと融合すると、ＧＦＰが核外膜に仕向けられ、ＡＡＶ形質導入細胞を容易に可視化することが可能となる（図５６Ｂ）。

【１１２２】

本出願者らは、初めに、初代マウス皮質ニューロンを使用してインビトロでのこのデュアルベクターＣａｓ９送達系の送達有効性を試験し、８０％より高い同時形質導入効率を観察した（図５６Ｃ）。重要なことには、Ｃａｓ９の発現は、形質導入されたニューロンの形態および生存率に悪影響を及ぼさなかった（図５９Ｄ、図５９Ｅ）。マウス初代ニューロンにおいてＣａｓ９媒介性ゲノム編集を試験するため、本出願者らは、レット症候群

で主要な役割を果たすＭｅｃｐ２遺伝子をターゲティングした。ＭｅＣＰ２欠乏は、ニューロンの樹状突起樹異常および棘形態形成障害に関連することが示されており、両方の形態学的表現型とも、レット症候群の患者で観察される神経症状に寄与すると考えられている。

【１１２３】

Ｍｅｃｐ２の効率的なターゲティングを達成するため、本出願者らは初めにいくつかのｓｇＲＮＡを作成してマウスＭｅｃｐ２遺伝子座のエクソン３内の複数の部位をターゲティングし（図Ｓ２Ａ、図Ｓ２Ｂ）、Ｎｅｕｒｏ－２ａ細胞からのＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）ヌクレアーゼアッセイ結果に基づき最も効率的なｓｇＲＮＡを選択した（図５６Ｄ、図６０）。本出願者らのデュアルベクター系のインビトロでのニューロンにおける編集効率を評価するため、本出願者らは、インビトロ７日目（７ＤＩＶ）に初代マウス皮質ニューロンを形質導入し、形質導入の７日後にＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）ヌクレアーゼアッセイを用いてインデル率を測定した（図５６Ｅ）。注目すべきことに、Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡを同時形質導入したニューロン培養物は、Ｃａｓ９単独を形質導入したニューロンと比較してＭｅＣＰ２タンパク質レベルの約８０％の低下を示した（図５６Ｆ；図６１）。さらに、Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡの同時形質導入ニューロンはまた、Ｃａｓ９のみのニューロン集団と比較したとき樹状突起樹形態（図５６Ｇ～図５６Ｉ）および棘密度（図６９Ｊ、図６９Ｋ）の変化も呈した。

【１１２４】

本出願者らは、次に、Ｃａｓ９が生体マウスの脳内の特定の一部の細胞において安定したゲノム改変を媒介し得たかという問いを立てた。ＡＡＶ形質導入細胞を特異的に分析するため、本出願者らは、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を用いてＧＦＰ－ＫＡＳＨ標識核を精製する方法を開発した（図５７Ａ、図６２）。培養下の初代ニューロンと同様に、本出願者らは、Ｃａｓ９およびＭｅｃｐ２ターゲティングｓｇＲＮＡを有する高力価ＡＡＶ１／２の混合物（１：１比）を成体マウスの歯状回に同時送達した（図５７Ｂ）。本出願者らは、ウイルス送達後４週間で海馬顆粒細胞における両方のベクターの高い同時形質導入効率を観察した（図５７Ｃ）。インビボでのＭｅｃｐ２遺伝子座におけるゲノム改変効率を試験するため、本出願者らはＧＦＰ－ＫＡＳＨ標識核を精製し、選別された核集団において最大３４％のインデル頻度を検出した（図５７Ｄ）。Ｍｅｃｐ２遺伝子座のＣａｓ９媒介性切断によって、ＭｅＣＰ２ノックアウトマウスで観察される効果と同程度に標的ニューロン集団におけるＭｅＣＰ２タンパク質レベルが効率的に低下し（図５７Ｅ～図５７Ｇ）、棘密度が減少した（図５７Ｈ、図５７Ｉ）。これらの結果は、インビボで哺乳類の脳における標的遺伝子ノックアウトを促進するためのＣａｓ９の多用途性を実証している。

【１１２５】

Ｃａｓ９系の一つの主要な利点は、多重ゲノム編集を促進するその能力である。生きている動物の脳において複数の遺伝子の安定したノックアウトを導入することは、生理学的および神経病理学的病態における複遺伝子機構の原因調査など、潜在的に広範囲に及ぶ適用性を有し得る。脳における多重ゲノム編集の可能性を試験するため、本出願者らは、タンデムになった３つのｓｇＲＮＡからなる多重ｓｇＲＮＡ発現ベクターを、核標識用のＧＦＰ－ＫＡＳＨと共に設計した（図５８Ａ）。本出願者らは、Ｄｎｍｔ１、Ｄｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ３ｂからなるＤＮＡメチルトランスフェラーゼ遺伝子ファミリー（ＤＮＭＴ）をターゲティングするｓｇＲＮＡを選択した。Ｄｎｍｔ１および３ａは成熟脳で発現するのに対し、Ｄｎｍｔ３ｂは主に神経発生の間に発現する。以前、ＤＮＭＴ活性が脳内のＤＮＡメチル化を変化させること、ならびにＤｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１がシナプス可塑性ならびに学習および記憶形成に必要であることが示された。本出願者らは、高い改変効率の個々のｓｇＲＮＡを選択し、３つ全ての標的遺伝子について高率の同時的なＤＮＡ開裂となるようにガイドの組み合わせを最適化した（図５８Ｂ；図６３）。

【１１２６】

インビボでの多重ゲノム編集の有効性を試験するため、本出願者らは、高力価Ｃａｓ９

発現およびｓｇＲＮＡ発現ＡＡＶ混合物を成体マウスの背側および腹側歯状回に定位的に送達した。４週間後、海馬を解剖し、ＦＡＣＳで標的細胞核を選別した。ディープシーケンシングを用いて、本出願者らは、３つ全ての標的遺伝子座で約２０～７０％の範囲の高度なインデル形成を観察した（図５８Ｃ、図６４）。いずれも成熟脳で高度に発現するＤｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１は、ウイルス送達の約１２週間後に解剖した歯状回組織においてタンパク質レベルの大幅な低下を示す（図５８Ｄ）。Ｄｎｍｔ３ｂは成熟脳で発現が低いため、本出願者らはこの分析ではＤｎｍｔ３ｂタンパク質を検出することができなかった。

【１１２７】

Ｃａｓ９による先行研究は、ｓｇＲＮＡと部分的にマッチするゲノム遺伝子座がオフターゲットインデル形成をもたらし得ることを示している。上位の予測オフターゲット遺伝子座のインデル解析から、０～１．６％のインデル形成率が明らかとなり、Ｃａｓ９改変が極めて特異的であることが実証された（表２）。観察された低いオフターゲット率は、恐らくはｓＭｅｃｐ２プロモーターおよびショートポリＡシグナルがもたらす比較的弱いＣａｓ９発現レベルに起因するものと思われる。

【１１２８】

【表７２】

表2. DNMTターゲティングのオフターゲット解析

	遺伝子	GI	潜在的なオフターゲット配列	MLE (%)	SEM	(配列番号__)
Dnmt1__	*Abca1*	NM_013454	GGAGCTGGAGCTGTTCACGTTGG	0.0000	0.00	
	Mctp1	NM_030174	CGGGCAGCAGATGTTCGCGTAGG	0.0806	0.08	

【１１２９】

【表７３】

	遺伝子	GI	潜在的なオフターゲット配列	MLE (%)	SEM	(配列番号__)
Dnmt3a	*Exd2*	NM_133798	AGGGCTTGAGATGTTCGGGCTGG	0.0612	0.06	
	Pik3r6	NM_001004435	CCGGCTGGGGCTGTCCTCGCTAG	0.0000	0.00	
	Sobp	NM_175407	CGGGGTGCAGCTGCTCACGCCAG	0.0000	0.00	
	Vac14	NM_146216	CTGGCGGGAGCTGGTCGCGTGAG	0.0083	0.00	
Dnmt3b	*Efemp2*	NM_021474	TGAGCATGGGCCGCTGGCGGTGG	0.0050	0.01	
	Bmpr1b	NM_001277217	ATGGCATAGGCCGCTGACAGAGG	0.0117	0.01	
	Syce1	NM_001143765	TTGGCATGGTGAGCTGGCGGGGG	0.0067	0.00	
	Atp8b3	NM_026094	TGGGCAGGGGTCTCTGAGGGCAG	0.0067	0.01	
	Rdh11	NM_021557	TTGGCATGGGTCTCTTACCAAGG	0.0017	0.00	
Dnmt3b	*Hecw2*	NM_001001883	ACATGGTTCCAGTGGGTATGTAG	0.0000	0.00	
	Plekhg3	NM_153804	GGAGGTGGGCAGCGGGTATGTAG	0.0954	0.01	
	Cdc25b	NM_001111075	AGAAGGTCCCCGCGGGCATGGAG	0.2421	0.12	
	Top1mt	NM_028404	GGAGGGAACCAGCCGGTATGGGG	0.0167	0.01	
	Sesn2	NM_144907	AGAGAGTGGCAGTGGGTAAGCAG	0.0000	0.00	

【１１３０】

【表７４】

遺伝子	GI	潜在的なオフターゲット配列	MLE (%)	SEM	(配列番号__)
Ncan	NM_007789	AGAGGTGGCCAGCGGGCAGGAAG	0.0017	0.00	
Nacad	NM_001081652	TGAGGGGGCCAGCTGGGATGCAG	1.6254	0.76	

【１１３１】

先行研究において、Ｄｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１のノックダウンが海馬依存性の記憶形成に影響を与え得ることが示唆されている。従って、本出願者らは文脈的恐怖条件付け行動試験を実施し、Ｃａｓ９媒介性三重ノックアウト（Ｄｎｍｔ３ａ、Ｄｎｍｔ１およびＤｎｍｔ３ｂ）が記憶形成の獲得および固定に及ぼす効果を調べた。本出願者らは記憶獲得段階において対照と三重ノックアウトマウスとの間に差がないことを観察したが、ノックアウトマウスは、訓練文脈条件下で試験したとき記憶固定障害を示した（図５８Ｅ、図５８Ｆ）。この効果は、変化した文脈でマウスを試験したとき消失し、本出願者らのマウスモデルで文脈学習が障害されたことが実証された。本出願者らの結果は、歯状回ニューロンのＤＮＭＴファミリーメンバーのＣＲＩＰＳＲ－Ｃａｓ９媒介性ノックアウトが行動課題において遺伝子の機能を探索するのに十分であることを実証している。

【１１３２】

まとめると、本出願者らの結果は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系のインビボ送達が、多重ゲノム編集によって疾患モデルを作成し、およびマウス行動を操作するための正確で柔軟かつ極めて効率的な技術に相当することを実証している。ここで示されるＣａｓ９系のインビボ適用は、基礎科学、ならびにバイオテクノロジーおよび医学において幅広い適用を有し得る。

【１１３３】

ＤＮＡ構築物：Ｃａｓ９標的の選択および単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）の作成のため、５’－ＮＧＧ　ＰＡＭ配列に先行するように２０ｎｔ標的配列を選択した。オフターゲット効果を最小限に抑えるため、ＣＲＩＰＳＲ設計ツールを使用した（ウェブサイトｔｏｏｌｓ．ｇｅｎｏｍｅ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．ｏｒｇで利用可能）。Ｕ６プロモーターをテンプレートとして使用して、フォワードプライマー：５’－ＣＧＣＡＣＧＣＧＴＡＡＴＴＣＧＡＡＣＧＣＴＧＡＣＧＴＣＡＴＣ－３’および２０ｎｔ　ＤＮＡ標的部位を有するｓｇＲＮＡ（太字斜体）を含むリバースプライマー：

【化３２】

5’-

CACACGCGTAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAG

CCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC***NNNNNNNNNNNNNNNNNNNC***GGT

GTTTCGTCCTTTCCAC-3’ (配列番号__)

でｓｇＲＮＡをＰＣＲ増幅した。コーディングカセットをＡＡＶ骨格にヒトシナプシンプロモーター（ｈＳｙｎ）下にクローニングするため、ＥＧＦＰ－ＫＡＳＨ構築物をＰＣＲテンプレートとして使用した。次に、ＭｌｕＩ部位を使用してＵ６－Ｍｅｃｐ２＿ｓｇＲＮＡコード配列を導入した。多重遺伝子ターゲティング戦略のため、個々のｓｇＲＮＡを上記に記載したとおりＰＣＲ増幅した。３つ全てのｓｇＲＮＡを、Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅクローニング戦略を用いることにより、ＰＣＲ増幅したｈＳｙｎ－ＧＦＰ－ＫＡＳＨ－ｂＧＨｐＡカセット（図５８Ａを参照）とライゲートした。ＰＣＲ増幅後、３つのｓｇＲ

ＮＡおよびｈＳｙｎ－ＧＦＰ－ＫＡＳＨ－ｂＧＨ　ｐＡを含むＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅライゲーション産物をＡＡＶ骨格にクローニングした。得られた全ての構築物をシーケンシングして確認した。ニューロンにおいてＣａｓ９発現をドライブするのに最適なプロモーター配列を見付けるため、本出願者らは以下を試験した：ｈＳｙｎ１、マウストランケートＭｅｃｐ２（ｓＭｅｃｐ２）、およびトランケートラットＭａｐ１ｂ（ｒＭａｐ１ｂ）プロモーター配列（図５９Ｂを参照）。以下のプライマーを使用してプロモーター領域を増幅した：

【化３３】

hSyn_F: 5’-GTGTCTAGACTGCAGAGGGCCCTG-3’ (配列番号__); hSyn_R: 5’-GTGTCGTGCCTGAGAGCGCAGTCGAGAA-3’ (配列番号__); mMecp2_F 5’-GAGAAGCTTAGCTGAATGGGGTCCGCCTC-3’ (配列番号__); mMecp2_R 5’-CTCACCGGTGCGCGCAACCGATGCCGGGACC-3’ (配列番号__); rMap1b-283/-58_F 5’-GAGAAGCTTGGCGAAATGATTTGCTGCAGATG-3’ (配列番号__); rMap1b-283/-58_R 5’-CTCACCGGTGCGCGCGTCGCCTCCCCCTCCGC-3’ (配列番号__).

ラットｍａｐ１ｂプロモーターの別のトランケーションを以下のオリゴでアセンブルした：

【化３４】

5’-AGCTTCGCGCCGGGAGGAGGGGGGACGCAGTGGGCGGAGCGGAGACAGCACCTTCGGAGATAATCCTTTCTCCTGCCGCAGAGCAGAGGAGCGGCGGGAGAGGAACACTTCTCCCAGGCTTTAGCAGAGCCGGA-3’ (配列番号__) および 5’-CCGGTCCGGCTCTGCTAAAGCCTGGGAGAAGTGTTCCTCTCCCGCCGCTCCTCTGCTCTGCGGCAGGAGAAAGGATTATCTCCGAAGGTGCTGTCTCCGCTCCGCCCACTGCGTCCCCCCTCCTCCCGGCGCGA-3’ (配列番号__).

ショート合成ポリアデニル化シグナル（ｓｐＡ）（３）を、以下のオリゴを使用してアセンブルした：

【化３５】

5’-AATTCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTG TGTGC-3’ (配列番号__) および 5’- GGCCGCACACAA AAAACCAACACACAGATCTAATGAAAATAAAGATCTTTTATTG-3’ (配列番号__).

ＥＦ１αプロモーターの制御下にある赤色蛍光タンパク質（ｍＣｈｅｒｒｙ）をコードするプラスミドを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によるニューロンの形質移入に使用した。

【１１３４】

細胞系培養および形質移入：５％ウシ胎仔血清（ＢＳＡ）を含有するＤＭＥＭ中でＮｅｕｒｏ－２ａ（Ｎ２ａ）細胞を成長させた。ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞については、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を含有するＤＭＥＭを使用した。細胞を５％CO_2雰囲気中３７℃で維持した。細胞を、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００またはポリエチ

レンイミン（ＰＥＩ）「ＭＡＸ」試薬（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、製造者のプロトコルに従い形質移入した。

【１１３５】

濃縮ＡＡＶベクターの作製：高力価ＡＡＶ１／２粒子を、等比のＡＡＶ１およびＡＡＶ２血清型プラスミドならびにｐＤＦ６ヘルパープラスミドを使用して作製し、ヘパリンアフィニティーカラムで精製した。ウイルス粒子の力価測定をｑＰＣＲによって行った。高力価ＡＡＶ１粒子はＵＮＣ Ｖｅｃｔｏｒ Ｃｏｒｅ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｎｏｒｔｈ Ｃａｒｏｌｉｎａ ａｔ Ｃｈａｐｅｌ Ｈｉｌｌ）によって作製された。ＤＭＥＭ中の低力価ＡＡＶ１粒子を、Ｓ．Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｏｐｔｉｃａｌ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ ｓｔａｔｅｓ．Ｎａｔｕｒｅ ５００，４７２（Ａｕｇ ２２，２０１３）に以前記載されたとおり作製した。簡潔に言えば、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に、ＰＥＩ「ＭＡＸ」を使用して導入遺伝子プラスミド、ｐＡＡＶ１血清型プラスミドおよびｐＤＦ６ヘルパープラスミドを形質移入した。４８時間後に培養培地を収集し、０．４５μｍ ＰＶＤＦフィルタ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）でろ過した。

【１１３６】

初代皮質ニューロン培養：組織培養用のニューロンを得るために用いられる動物を、ＭＩＴ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｎ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ（ＭＩＴ ＣＡＣ）の承認を受けたプロトコルに従い犠牲にした。１６日目の胚性マウス脳から、Ｇ．Ｂａｎｋｅｒ，Ｋ．Ｇｏｓｌｉｎ，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ ｎｅｕｒｏｎａｌ ｃｅｌｌ ｃｕｌｔｕｒｅ．Ｎａｔｕｒｅ ３３６，１８５（Ｎｏｖ １０，１９８８）に記載されるとおり初期培養物を調製した。両性の胚を使用した。細胞をポリ－Ｄ－リジン（ＰＤＬ）コート２４ウェルプレート（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）またはラミニン／ＰＤＬコートカバースリップ（ＶＷＲ）上にプレーティングした。培養物を、Ｂ２７、Ｇｌｕｔａｍａｘ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）およびペニシリン／ストレプトマイシン混合物を補足したＮｅｕｒｏｂａｓａｌ培地中において３７℃および５％CO_2で成長させた。

【１１３７】

ＡＡＶ形質導入のため、５００μｌ Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培養培地中の皮質ニューロンを７ ＤＩＶでＨＥＫ２９３ＦＴ細胞からの３００μｌ（１：１比の二重感染）のＡＡＶ１含有馴化培地とインキュベートした。形質導入の１週間後、下流処理のためニューロンを回収するか、または免疫蛍光染色もしくは形態分析のため４％パラホルムアルデヒドに固定した。

【１１３８】

神経形態を可視化するため、Ｌ．Ｓｗｉｅｃｈ ｅｔ ａｌ．，ＣＬＩＰ－１７０ ａｎｄ ＩＱＧＡＰ１ ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅｌｙ ｒｅｇｕｌａｔｅ ｄｅｎｄｒｉｔｅ ｍｏｒｐｈｏｌｏｇｙ．Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ：ｔｈｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅの公式ジャーナル ３１，４５５５（Ｍａｒ ２３，２０１１）に以前記載されたとおり、１週間にわたりＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してＤＩＶ７の細胞にＥＦ１α－ｍＣｈｅｒｒｙ発現ベクターを形質移入した。総樹状突起長さを測定するため、ＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用して個々のニューロンの全ての樹状突起をトレースした。４０倍対物レンズの蛍光顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ ＡｘｉｏＣａｍ Ａｘ１０顕微鏡、Ａｘｉｏｃａｍ ＭＲｍカメラ）で取得した画像に関して、一次樹状突起、樹状突起先端の数の定量化およびＳｈｏｌｌ解析を実施した。樹状突起の数は、１０μｍより長い全ての非軸索突起の端部をカウントした。Ｓｈｏｌｌ解析については、Ｓｈｏｌｌプラグインを備えたＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用して細胞体の周りに直径５μｍ刻みの同心円を自動で描き、各円を横切る樹状突起の数をカウントした。

【１１３９】

マウス脳へのＡＡＶ１／２の定位注入：本明細書に記載する全ての動物手順がＭＩＴＣＡＣによって承認された。成体（１２～１６週齢）雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｎマウスを１００ｍｇ／ｋｇケタミンおよび１０ｍｇ／ｋｇキシラジンの腹腔内（ｉ．ｐ．）注射で麻酔した。先制鎮痛を投与した（Ｂｕｐｒｅｎｅｘ、１ｍｇ／ｋｇ、ｉ．ｐ．）。承認された手順に従い開頭術を実施し、１μｌの１：１ＡＡＶ混合物（1×10^{13} Ｖｇ／ｍｌのｓＭｅｃｐ２－ＳｐＣａｓ９；6×10^{12} Ｖｇ／ｍｌのＤＮＭＴ　３×ｓｇＲＮＡ；３～５×10^{12} Ｖｇ／ｍｌ（ｈＳｙｎ－ＧＦＰ－ＫＡＳＨ）を背側歯状回（前側／後側：－１．７；中外側：０．６；背側／腹側：－２．１５）および／または腹側歯状回（前側／後側：－３．５２；中外側：２．６５；背側／腹側：－３）に注入した。切開を縫合し、術後３日間にわたり適切な術後鎮痛薬（メロキシカム、１～２ｍｇ／ｋｇ）を投与した。

【１１４０】

脳組織からの細胞核の精製：海馬または歯状回全体を氷冷ＤＰＢＳ（Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）中で速やかに解剖し、ドライアイスでショック凍結した。組織を２ｍｌの氷冷ホモジナイズ緩衝液（ＨＢ）（３２０ｍＭ　スクロース、５ｍＭ　ＣａＣｌ、３ｍＭ　$Mg(Ac)_2$、１０ｍＭ　トリス　ｐＨ７．８、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％ＮＰ４０、０．１ｍＭ　ＰＭＳＦ、１ｍＭ　β－メルカプトエタノール）中に、２ｍｌダウンス型ホモジナイザー（Ｓｉｇｍａ）を使用して；ペッスルＡで２５回、続いてペッスルＢで２５回、穏やかにホモジナイズした。次に、合計５ｍｌになるまで３ｍｌのＨＢを添加し、氷上に５分間置いておいた。勾配遠心のため、５ｍＭ　ＣａＣｌ、３ｍＭ　$Mg(Ac)_2$、１０ｍＭ　トリス　ｐＨ７．８、０．１ｍＭ　ＰＭＳＦ、１ｍＭ　β－メルカプトエタノールを含有する５ｍｌの５０％ＯｐｔｉＰｒｅｐ（商標）密度勾配媒体（Ｓｉｇｍａ）を添加して混合した。この溶解物を、コニカル３０ｍｌ遠心管（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ、ＳＷ２８ロータ）の中の１０ｍｌ　２９％等浸透圧ＯｐｔｉＰｒｅｐ（商標）溶液の上に穏やかに入れた。試料を１０，１００×ｇ（７，５００ｒｐｍ）、４℃で３０分間遠心した。上清を取り除き、核ペレットを、６５ｍＭ　β－グリセロリン酸（ｐＨ７．０）、２ｍＭ　$MgCl_2$、２５ｍＭ　ＫＣｌ、３４０ｍＭ　スクロースおよび５％グリセロール中に穏やかに再懸濁した。精製した核の数および質を、明視野顕微鏡法を用いて検査した。

【１１４１】

細胞核選別：精製したＧＦＰ陽性（GFP^+）および陰性（GFP^-）のインタクトな核をＶｙｂｒａｎｔ（登録商標）ＤｙｅＣｙｃｌｅ（商標）Ｒｕｂｙ染色（１：５００、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で同時標識し、ＢＤ　ＦＡＣＳＡｒｉａ　ＩＩＩ（Ｋｏｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　Ｃｏｒｅ，ＭＩＴ）を使用して選別した。GFP^+核およびGFP^-核を、１％ＢＳＡでコーティングされた、かつ４００μｌの再懸濁緩衝液（６５ｍＭ　β－グリセロリン酸　ｐＨ７．０、２ｍＭ　$MgCl_2$、２５ｍＭ　ＫＣｌ、３４０ｍＭ　スクロースおよび５％グリセロール）が入った１．５ｍｌエッペンドルフ試験管に収集した。選別後、全ての試料を氷上に保ち、１０，０００×ｇ、４℃で２０分間遠心した。核ペレットを－８０℃で保存し、下流処理に直接使用した。

【１１４２】

ゲノムＤＮＡ抽出およびＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）アッセイ：ｓｇＲＮＡの機能試験のため、５０～７０％コンフルエントのＮ２ａ細胞に、単一のＰＣＲ増幅したｓｇＲＮＡおよびＣａｓ９ベクターを同時形質移入した。Ｃａｓ９のみを形質移入した細胞を陰性対照として供した。形質移入後４８時間で細胞を回収し、ＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　＆　Ｔｉｓｓｕｅキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して製造者のプロトコルに従いＤＮＡを抽出した。ＡＡＶ１形質導入初代ニューロンからゲノムＤＮＡを単離するため、ＡＡＶ形質導入の７日後にＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　＆　Ｔｉｓｓｕｅキットを製造者の指示に従い使用した。

【１１４３】

選別した核または解剖した組織を、溶解緩衝液（１０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０、１０

ｍＭ ＮａＣｌ、１０ｍＭ ＥＤＴＡ、０．５ｍＭ ＳＤＳ、プロテイナーゼＫ（ＰＫ、１ｍｇ／ｍｌ）およびＲＮアーゼＡ）中に５５℃で３０分間溶解させた。次に、クロロホルム－フェノール抽出を実施し、続いてエタノールによるＤＮＡ沈殿を、標準的手順に従い実施した。最後にＤＮＡをＴＥ緩衝液（１０ｍＭ トリス ｐＨ８．０、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ）中に再懸濁し、下流分析に使用した。個々のｓｇＲＮＡの機能試験を、表３に掲載するＰＣＲプライマーを使用してＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）ヌクレアーゼアッセイ（Ｔｒａｎｓｇｅｎｏｍｉｃｓ）によって実施した。バンド強度の定量化を、Ｆ．Ａ．Ｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｓｙｓｔｅｍ．Ｎａｔｕｒｅ ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ８，２２８１（Ｎｏｖ，２０１３）に以前記載されたとおり実施した。

【１１４４】

【表７５】

表3. SURVEYOR™アッセイに使用したPCRプライマー

標的	フォワードプライマー配列 (5'-3')	(配列番号__)	リバースプライマー配列 (5'-3')	(配列番号__)
Mecp2	GGTCTCATGTGTGGCACTCA		TGTCCAACCTTCAGGCAAGG	
Dnmt3a	ATCCCTCCTCAGAGGGTCAGC		TACCTCATGCACAGCTAGCACC	
Dnmt1	TTCGGGCATAGCATGGTCTTCC		GTTCTATTTCAGAGGGCTGATCCC	
Dnmt3b	GTTCTGAGCCGCACAGTTTGG		GGATAAGAAGGGACAATACAGG	

【１１４５】

免疫蛍光染色：

細胞培養：初代ニューロンの免疫蛍光染色のため、細胞をウイルス送達の７日後に４％パラホルムアルデヒド（ｐａｒａｆｏｒｍａｌｄｅｈｙｄ）（ＰＦＡ）によって室温で２０分間固定した。ＰＢＳで３回洗浄した後、細胞をＰＢＳ中５％正常ヤギ血清（ＮＧＳ）（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、５％ロバ血清（ＤＳ）（Ｓｉｇｍａ）および０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００（Ｓｉｇｍａ）によって室温で３０分間ブロックした。細胞を一次抗体と共に２．５％ＮＧＳ、２．５％ＤＳおよび０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００中室温で１時間または４℃で一晩インキュベートした。ＰＢＳＴで３回洗浄した後、細胞を二次抗体と共に室温で１時間インキュベートした。最後に、ＤＡＰＩ含有ＶＥＣＴＡＳＨＩＥＬＤ ＨａｒｄＳｅｔ封入剤（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用してカバーガラスをマウントし、Ｚｅｉｓｓ ＡｘｉｏＣａｍ Ａｘ１０顕微鏡およびＡｘｉｏｃａｍ ＭＲｍカメラを使用して撮像した。画像をＺｅｎ ２０１２ソフトウェア（Ｚｅｉｓｓ）を使用して処理した。ＩｍａｇｅＪソフトウェア１．４８ｈおよびニューロン検出器プラグインを使用することにより定量化を実施した。

【１１４６】

ウイルス送達の４～８週間後に致死量のケタミン／キシラジンによってマウスを犠牲にし、ＰＢＳ、続いてＰＦＡで経心的に灌流した。固定した組織を、ビブラトーム（Ｌｅｉｃａ、ＶＴ１０００Ｓ）を使用して切片化した。次に、３０μｍ切片をクエン酸ナトリウム緩衝液（１０ｍＭクエン酸三ナトリウム脱水物、０．０５％ Ｔｗｅｅｎ２０、ｐＨ６．０）中で２分間煮沸し、室温で２０分間冷却した。切片をＴＢＳＴ（１３７ｍＭ ＮａＣｌ、２０ｍＭ トリス ｐＨ７．６、０．２％Ｔｗｅｅｎ－２０）中の４％正常ヤギ血

清（ＮＧＳ）で１時間ブロックした。パラフィン切片をミクロトーム（Ｌｅｉｃａ ＲＭ２１２５ ＲＴＳ）を使用して８μｍに切り、Ａ．Ｖ．Ｔｚｉｎｇｏｕｎｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ ＫＣＮＱ５ ｐｏｔａｓｓｉｕｍ ｃｈａｎｎｅｌ ｍｅｄｉａｔｅｓ ａ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ ｏｆ ｔｈｅ ａｆｔｅｒｈｙｐｅｒｐｏｌａｒｉｚａｔｉｏｎ ｃｕｒｒｅｎｔ ｉｎ ｍｏｕｓｅ ｈｉｐｐｏｃａｍｐｕｓ．Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ １０７，１０２３２（Ｊｕｎ １，２０１０）に以前記載されたとおり染色した。

【１１４７】

切片を、４％ＮＧＳを含むＴＢＳＴ中に希釈した一次抗体と共に４℃で一晩インキュベートした。ＴＢＳＴ中で３回洗浄した後、試料を二次抗体と共にインキュベートした。ＴＢＳＴで３回洗浄した後、切片をＤＡＰＩ含有ＶＥＣＴＡＳＨＩＥＬＤ ＨａｒｄＳｅｔ封入剤を使用してマウントし、共焦点顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ ＬＳＭ ７１０、Ａｘ１０ ＩｍａｇｅｒＺ２、Ｚｅｎ ２０１２ソフトウェア）で視覚化した。

【１１４８】

以下の一次抗体を使用した：ウサギ抗Ｄｎｍｔ３ａ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ、１：１００）；ウサギ抗ＭｅＣＰ２（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、１：２００）；マウス抗ＮｅｕＮ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、１：５０～１：４００）；ニワトリ抗ＧＦＡＰ（Ａｂｃａｍ、１：４００）；マウス抗Ｍａｐ２（Ｓｉｇｍａ、１：５００）；ニワトリ抗ＧＦＰ（Ａｖｅｓ ｌａｂｓ、１：２００～１：４００）；マウス抗ＨＡ（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、１：１００）。二次抗体：ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）４８８、５６８または６３３（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、１：５００～１：１，０００）。

【１１４９】

ゴルジ－Ｃｏｘ染色：ＦＤ Ｒａｐｉｄ ＧｏｌｇｉＳｔａｉｎキット（ＦＤ ＮｅｕｒｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してゴルジ－Ｃｏｘ染色を実施した。Ｍｅｃｐ２遺伝子座をターゲティングするＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９の注入後１～４週間の成体雄マウスを、ＭＩＴ ＣＡＣプロトコルに従い頸椎脱臼によって犠牲にした。解剖後直ちに脳を製造者のプロトコルに従い処理した。細胞の形態を、１００倍対物レンズ下の光学顕微鏡を使用して（電動高精度焦点制御を備えるＺｅｉｓｓ Ａｘｉｏｐｌａｎ ２、ＯｃｒａＥＲデジタルカメラ）、歯状回の１００μｍ厚の凍結切片に関して分析した。棘密度を、ＭｅｔａＭｏｒｐｈ４ソフトウェアを使用して手動でカウントした。

【１１５０】

ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）アッセイの定量化：ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）アッセイ（Ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を製造者の指示に従い使用して、対照および形質導入初代ニューロンを染色した。ＧＦＰ－ＫＡＳＨ発現からのＧＦＰシグナルへの干渉を回避するため、ＤＥＡＤ（エチジウムホモ二量体）およびＤＡＰＩ（全ての細胞）のみについて細胞を染色した。染色した細胞を蛍光顕微鏡法を用いて撮像し、ＩｍａｇｅＪ １．４８ｈソフトウェアおよびニューロン検出器プラグインを使用してＤＥＡＤ、ＧＦＰおよびＤＡＰＩ陽性細胞をカウントした。

【１１５１】

ウエスタンブロット分析：形質導入初代皮質ニューロン（ウイルス送達後７日）および形質導入組織試料（ウイルス送達後４週間）を、０．１％ＳＤＳおよびプロテアーゼ阻害薬（Ｒｏｃｈｅ、Ｓｉｇｍａ）を含有する５０μＬの氷冷ＲＩＰＡ緩衝液（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）中に溶解した。細胞溶解物をＢｉｏｒｕｐｔｏｒソニケーター（Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ）で５分間超音波処理し、ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．）を使用してタンパク質濃度を決定した。タンパク質溶解物（ｌｙｓａｔｓ）をＳＤＳ－ＰＡＧＥ試料緩衝液中に溶解し、還元条件下４～１５％トリス－ＨＣｌゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）上で分離し、一次抗体：ウサギ抗Ｄｎｍｔ３ａ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ、１：５００）、マウス抗Ｄｎｍｔ１（Ｎｏｖｕｓ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、１：８００）、ウサギ抗Ｍｅｃｐ２（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、１：

４００）、ウサギ抗チューブリン（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、１：１０，０００）、続いて二次抗マウスおよび抗ウサギ（ｒａｂｂｉｔ）ＨＲＰ抗体（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、１：１０，０００）を使用したウエスタンブロッティングによって分析した。ＧＡＰＤＨはウサギＨＲＰ共役抗ＧＡＰＤＨ抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、１：１０，０００）で直接可視化した。チューブリンまたはＧＡＰＤＨをローディング対照として供した。ＩｍａｇｅＬａｂ　４．１ソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）を備えるＣｈｅｍｉＤｏｃ（商標）ＭＰシステムでブロットを画像化し、ＩｍａｇｅＪソフトウェア１．４８ｈを使用して定量化した。

【１１５２】

遅延文脈的恐怖条件付け（ＤＣＦＣ）：１２週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｎ雄マウスの背側および腹側歯状回への両側性Ｃａｓ９／ＤＮＭＴ　３ｘｓｇＲＮＡ送達の８週間後、動物を実験者および行動実験室に７日間馴化させた。Ｃａｓ９／ＧＦＰ－ＫＡＳＨを注入した同腹仔を対照として供した。ＤＣＦＣの１日目、隔離された控え室にマウスケージを置き、試験前および試験後にマウスに聴覚キューが入ることを防いだ。個々のマウスをＦＣチャンバ（Ｍｅｄ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　Ｉｎｃ．）に置き、１２分間の馴化期間を実施した。馴化後、マウスをそのホームケージに戻した。翌日（訓練日）、個々のマウスをチャンバに入れ、４分間馴化させた。さらに２０秒間の（トーン前）間隔後、トーン（聴覚キュー）を８５ｄＢ、２．８ｋＨｚのレベルで２０秒間提示し、続いて１８秒間の遅延間隔を置いた後、フットショックを提示した（０．５ｍＡ、２秒間）。フットショック後、４０秒間の間隔（トーン／ショック後）を続けた後、次の同じ試行を２０秒間のトーン前期間から開始した。この訓練試行を６回繰り返してからマウスをそのホームケージに戻した。３日目（試験日）、マウスを初めに条件付け文脈チャンバに３分間置いた。次に、マウスは、２０秒間の間隔と、続く２０秒間のトーンおよび６０秒間のトーン後間隔から始まる４×１００秒間の試験試行を受けた。最後に、マウスを文脈を変えた条件付けチャンバ（フラットフロア対グリッド、四分割対七分割チャンバ、バニリン芳香）に入れ、試験試行を繰り返した。フリージング行動を記録し、オフラインで手動で分析し、Ｎｏｌｄｕｓ　ＥｔｈｏＶｉｓｉｏｎ　ＸＴソフトウェア（Ｎｏｌｄｕｓ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）で確認した。

【１１５３】

ディープシーケンシング解析およびインデル検出：ＣＲＩＳＰＲ設計ツール（ウェブサイトｃｒｉｓｐｒ．ｍｉｔ．ｅｄｕ／で利用可能）を使用して、脳においてＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９によりターゲティングされるＤＮＭＴファミリー遺伝子の潜在的なオフターゲットを見付けた。ウイルス送達の１２週間後に歯状回の標的細胞核をＦＡＣＳ選別し、ゲノムＤＮＡを上記に記載したとおり精製した。目的の遺伝子毎に、ＣＲＩＳＰＲ標的部位に隣接するゲノム領域をフュージョンＰＣＲ方法によって増幅し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｐ５アダプターならびにユニークな試料特異的バーコードを標的アンプリコンに取り付けた（オンターゲットおよびオフターゲットプライマーについては表４を参照のこと）。バーコードを付加して精製したＤＮＡ試料をＱｕｂｉｔ　２．０蛍光光度計（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によって定量化し、等モル比でプールした。次にシーケンシングライブラリをＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ　Ｐｅｒｓｏｎａｌシーケンサー（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によってリード長さ３００ｂｐでシーケンシングした。

【１１５４】

【表７６】

表4. オンターゲットおよびオフターゲットゲノム遺伝子座の増幅に使用したプライマー

遺伝子座	フォワードプライマー配列 (5'-3')	(配列番号__)	リバースプライマー配列 (5'-3')	(配列番号__)
Dnmt1	GCCGGGGTCTCGTTCAGAGCT		CTACCGCCTGCGGACATGGT	
Dnmt3a	CCTGTCTCTCTGTCCTAGGGCTCC		CCGTTTGCTGATGTAGTAGGGGTCC	
Dnmt3b	CCCACAGGAAACAATGAAGGGAGAC		CATCCTTCGTGTCTGAGGACTGGTC	
Abca1	CCCTGACACCAGCTGTTCAGCAC		CTCTGGGTGACCACACACGATGC	
Mctp1	GAGCAGGCAGAGCCGAGCAAG		GGAGAGCGTCCGCCAGGAG	
Exd2	GGGTCTTGTTGTGAGTAGGGTGTG		GAAGCTCTCTTAACTACTGTTC	
Pik3r6	CCTGGAATACTATTTCCACGCCG		CAGGCCCTAGCAGCGAGCAG	
Sobp	GCAGCACACTCCACCCTCACAT		GGAAGGGGCTTTCCTCCGAGC	
Vac14	CGGCGTCACGTGACCTGAGTAAC		GCTCCGACCCTGCTCTCCCA	
Efemp2	GTGTCTGCCTCGCTCTGCTGC		CCTGTTCATCAGGCTCGTAGCCC	
Bmpr1b	CTATCTGAAATCCACCACCTTAGACGC		CGATTGCTGGCTTGCCTTGAG	
Syce1	GCCTGAGGGGGCCAGAGGT		GGTTCGCGTCCGCCCGCGTGAT	
Atp8b3	GGGACTCCCCGGGTGGTG		GAGAGGTGGTCCTGTCGCCTATG	
Rdh11	GACCCTGTGTTTCAAGTCTCTCTG		CCCAGCAGGTCACAGCTGACATC	

【１１５５】

【表７７】

遺伝子座	フォワードプライマー配列 (5'-3')	(配列番号__)	リバースプライマー配列 (5'-3')	(配列番号__)
Hecw2	GGCCATCCAGTACATTCAATACG		AGCACAGTATGTATTCTATAAAATAATACGAC	
Plekhg3	GCAGAAGCCGTGACTCACAGCA		GTGGGAGGGGACAGAGACCATG	
Cdc25b	CTTGTGCTTGTGATTCTGTCCTTACTGC		CCTTACCTGTTCCTCTTCCTTATCCAGC	
Top1mt	CGAGAAGTCGATGCAGACACTTCAA		ATACCCAGTCCACATCCCTGCC	
Sesn2	GCTGAAGACTGGCGAGCACAGCT		CCTCTGCATCTCCCTCAGGAAGTATT	
Ncan	GACCTGAATGTTGTGGCTGAGAGTCC		GCCTCCTGTCCCCAGGTCCC	
Nacad	CCCTCACGTTCCTGTCCAGCAA		CACTAGGCTTGGGCTGCCCTCT	

【１１５６】

ＭｉＳｅｑリードを先に記載のとおり解析した。簡潔に言えば、リードをＰｈｒｅｄクオリティ（Ｑスコア）によってフィルタリングし、スミスーウォーターマンアルゴリズムを用いて標的部位の５０ヌクレオチド上流および下流のゲノム領域とアラインメントした。標的部位の５ヌクレオチド上流から５ヌクレオチド下流まで（合計３０ｂｐ）のアラインメントした領域におけるインデルを推定した。各試料の陰性対照を使用して、インデルが含まれるか、または含まれないかを推定切断イベントとして推定した。本発明者らは、真のインデルを含む標的領域を有するリードの割合について、陰性対照試料のデータからの標的領域毎リード毎のエラー率を使用して最尤推定量（ＭＬＥ）を計算した。各標的のＭＬＥスコアおよび切断率を表２に掲載する。

【１１５７】

統計的分析：全ての実験は、最小２つの独立した生物学的レプリケートで行った。統計は、Ｐｒｉｓｍ６（ＧｒａｐｈＰａｄ）でスチューデント両側ｔ検定を用いて実施した。

【１１５８】

脳におけるＣＲＩＳＰＲをさらに特徴付けるため、本出願者らはアポトーシス細胞のＴＵＮＥＬ染色および標準的な組織学（例えばヘマトキシリン染色）を用いて毒性効果を試験する。複数の遺伝子座の改変効率をさらに詳細に試験するため、次に本出願者らはＧＦＰ陽性単一細胞を選別し、次世代シーケンシングを用いて細胞毎の改変効率を分析する。

【１１５９】

本出願者らは、二光子顕微鏡下でインビボパッチクランプを用いて脳におけるＭｅｃｐ２ノックダウンの効果を皮質の標的細胞の生理学的表現型によって特徴付ける。成熟脳におけるＭｅｃｐ２ノックダウンの効果を理解するため、本出願者らはインビボで標的細胞のトランスクリプトームを解析する。フォローアップ研究用に興味深い候補遺伝子が選択されることになる。

【１１６０】

系の両方の成分（Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡ）でターゲティングされる細胞を有効に精製／可視化するため、本出願者らは、分割型のＧＦＰと組み合わせた分割型のＣａｓ９を

構築し、これは両方のＡＡＶが同じ細胞内にある場合にのみ再構成する。最後に、本出願者らは、本明細書に記載されるとおり実験を実施し、分裂終了ニューロンにおいてインビトロおよびインビボで相同組換えを達成する。

【１１６１】

実施例３７：ＡＡＶベクターおよび肝臓特異的Ｃａｓ９プロモーターを使用してガイドおよびＳａＣａｓ９を肝臓に静脈内送達することでインビボで見られるＡｐｏＢ遺伝子型および表現型の変化

この例では、とりわけ：

・　ＡＡＶ２／８は肝臓標的アデノウイルスベクターである；

・　ＴＢＧは肝臓特異的プロモーターであり、ここではこれを用いてＳａＣａｓ９の発現を駆動する；

・　ここではＵ６を用いてｓｇＲＮＡ（ガイド）の発現を駆動する；

・　ＡｐｏＢは脂質代謝遺伝子である。これは肝臓送達の「ゴールドスタンダード」と言われることもあり、肥満症マウスモデルで広く用いられている

・　「標的１～標的４」は、ＡｐｏＢ内の４つの標的が選択されたことを意味し、そのうち標的１および標的３（Ｔ１およびＴ３）が最も有用であった；

・　ここで見られるとおりのウイルスベクターからの発現を介した送達は、送達方法としてＡｎｄｅｒｓｏｎ／Ｙｉｎ（ＮＢＴ　２８８４）による流体力学的送達の使用の改良であり、なぜなら流体力学的送達は数ｍｌの流体を注入する必要があり、これがマウスの体に負担をかけ、致死的となり得るためである。流体力学的送達はプラスミド（ネイキッド）ＤＮＡの送達に良く適しているが、本出願者らは、ガイド配列およびＣａｓ９配列をウイルス送達ベクター内にパッケージングすることが、効率を大幅に高める点で好ましいことを示している。実際、比較的少量を導入するだけでよく、これは静脈内（ｉ．ｖ．）的に行うことができ、治療上はるかに良好に容認される可能性が高い。

・　特に有望であったのは、ＡｐｏＢなどの肝臓の「ゴールドスタンダード」遺伝子に遺伝子型の変化が見られたのみならず、表現型の変化もまた記録されたことであった。ＰＣＳＫ９での先行研究は遺伝子型の変化を示しているが、表現型の変化は示しておらず、従ってＡｐｏＢで見られた表現型の変化は、肝臓へのＣＲＩＳＰＲ送達、および肝臓で表現型の変化を生じさせるその能力の妥当性を立証している。これは、より治療的に容認される送達手段（流体力学的送達と比較したｉ．ｖ．）と組み合わされる。従って、ＣＲＩＳＰＲ（ガイドおよびＣａｓ９）の、特に静脈内的なウイルス送達が好ましい）。

・　標的としては、以下が挙げられる：ＰＣＳＫ９、ＨＭＧＣＲ、ＡＰＯＢ、ＬＤＬＲ、ＡＮＧＰＴＬ３、Ｆ８、Ｆ９／ＦＩＸ、ＡＡＴ、ＦＡＨ、ＨＰＤ、ＴＡＴ、ＡＴＰ７Ｂ、ＵＧＴ１Ａ１、ＯＴＣ、ＡＲＨ

【１１６２】

材料および方法

ウイルスおよび注射パラメータ

使用した構築物：

－ＡＡＶ２／８－ＴＢＧ－ＳａＣａｓ９－Ｕ６－ｓｇＲＮＡ（Ａｐｏｂ－標的１～標的４）。

インビトロ試験：全てがＨｅｐａ細胞において１０％～１５％の効率でＡｐｏｂ遺伝子座の開裂を誘導した。

インビボ結果：マウス－８週、Ｃ５７ＢＬ／６（各時点２匹の動物および生理食塩水を注射した野生型対照として１匹の動物）

【１１６３】

尾静脈注射：

注入量：１００ｕｌの０．８Ｅ１２ｖｐ／ｍｌ（ｖｐ＝ウイルス粒子）

送達ウイルス粒子：０．８Ｅ１１総ｖｐ／動物

【１１６４】

組織処理およびデータ収集

組織処理およびデータ収集は以下のとおり行った：
第１の時間点約１週間（８日）。第２の時間点約４週間。
生理食塩水灌流と、続く肝組織の急性解離。
（Ａ）肝臓の半分をＳｕｒｖｅｙｏｒおよびｑＰＣＲおよびウエスタンブロットタンパク質解析用に－８０℃の貯蔵庫に入れた（×１２チューブ／動物）。
（Ｂ）肝臓の半分をクリオスタット処理用に抗凍結剤中に入れ、急速凍結した。クリオスタット切片をＨ＆Ｅおよびオイルレッド染色に供した。
各動物につき２片の肝臓からＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔおよびＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイを使用してインデルを検出および定量化した。

【１１６５】

結果

インビボインデル評価

図は、ＡｐｏＢガイド（標的）の経時的な（注入後４週間までの）インビボインデル評価を示す。図５６Ａは、ガイド（標的）１がＡｐｏＢにおいて最も高い割合のインデルを誘導したことを示す。標的２および４はインデル形成を全くまたは極めて不十分にしか生じさせないという意味で、ほとんどないし全く効果がないことを示した一方、標的３はいくらかの活性を示した。図５６Ｂは、注入後４週間のインデル形成効率に関するＳｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼゲルアッセイの結果を示す。

【１１６６】

標的１は約９％のインデル形成であることが分かり、これは標的遺伝子座の許容できるレベルに相当する。

【１１６７】

ターゲティングするように設計された４個のガイド中２個で示された表現型の変化

ＡＡＶ－Ｃａｓ９－ｓｇＲＮＡ送達後のインビボでの肝臓脂質蓄積表現型を検出するオイルレッド染色を示す図６６に見られるとおり、使用した３個のガイド中２個（標的１および３）で表現型の変化が見られた。左側の図６６、標的１および３に溜まって示される赤色のオイル斑点が、ＡｐｏＢが破壊されていることを示し、右下の対照と比較される。Ａｐｏｂ遺伝子は、Ｃａｓ９の誘導による標的ゲノム開裂の結果として破壊されており、この生理学的／表現型の変化が生じた。標的２は対照と比べて顕著な差異は示さなかったとともに、標的４は図示しない。このオイルレッドＯ染色は、肝臓における脂肪を組織学的染色によって可視化するアッセイである。この染色は、肝臓中の脂肪量を評価するために研究で多く用いられる。実際の臨床では、オイルレッドＯ染色は主に、肝移植および他の手技において肝臓中の脂肪量を評価するため、肝臓生検標本の凍結切片に対して指示される。実施例のこの態様に関するプロトコルおよび情報については、以下が挙げられる：Ｍｅｈｌｅｍ ｅｔ ａｌ，「健康および疾患における代謝状態を分析するためのオイルレッドＯによる中性脂質のイメージング（Ｉｍａｇｉｎｇ ｏｆ ｎｅｕｔｒａｌ ｌｉｐｉｄｓ ｂｙ ｏｉｌ ｒｅｄ Ｏ ｆｏｒ ａｎａｌｙｚｉｎｇ ｔｈｅ ｍｅｔａｂｏｌｉｃ ｓｔａｔｕｓ ｉｎ ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ ｄｉｓｅａｓｅ）」，Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ８，１１４９－１１５４（２０１３）；Ｍａｃｚｕｇａ ｅｔ ａｌ．，「アポリポタンパク質Ｂ１００をターゲティングするヘアピンの治療的発現は、マウス肝臓において表現型およびトランスクリプトームの変化を誘導する（Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｈａｉｒｐｉｎｓ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｂ１００ ｉｎｄｕｃｅｓ ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃ ａｎｄ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅ ｃｈａｎｇｅｓ ｉｎ ｍｕｒｉｎｅ ｌｉｖｅｒ）」，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ（２０１４）２１，６０－７０；Ｋｏｏｒｎｎｅｅｆ ｅｔ ａｌ，「ＡＡＶで送達したｓｈＲＮＡによるアポリポタンパク質Ｂノックダウンはマウスにおいて血漿コレステロールを低下させる（Ａｐｏｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ Ｂ Ｋｎｏｃｋｄｏｗｎ ｂｙ ＡＡＶ－ｄｅｌｉｖｅｒｅｄ ｓｈＲＮＡ Ｌｏｗｅｒｓ Ｐｌａｓｍａ Ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ ｉｎ Ｍｉｃｅ）」，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ（２０１１）１９ ４，７３１－７４０；Ｔａｄｉｎ－Ｓｔｒａｐｐｓ

ｅｔ ａｌ．，「ｓｉＲＮＡ誘導肝臓ＡｐｏＢノックダウンはヒト様血清脂質を有するマウスモデルにおいて血清ＬＤＬコレステロールを低下させる（ｓｉＲＮＡ－ｉｎｄｕｃｅｄ ｌｉｖｅｒ ＡｐｏＢ ｋｎｏｃｋｄｏｗｎ ｌｏｗｅｒｓ ｓｅｒｕｍ ＬＤＬ－ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ ｉｎ ａ ｍｏｕｓｅ ｍｏｄｅｌ ｗｉｔｈ ｈｕｍａｎ－ｌｉｋｅ ｓｅｒｕｍ ｌｉｐｉｄｓ）」，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｖｏｌｕｍｅ ５２，１０８４－１０９７（２０１１）。図６６中のスケールバーは２０ミクロンを表す。

【１１６８】

実施例３８：ＳａＣａｓ９最適化実験

以下を調べた：ガイド長さ最適化；イントロン試験；Ｈ１プロモーター；Ｄ１０Ａ二重ニッカーゼ試験；追加的な長さ／ＤＮ試験。

【１１６９】

ＳａＣａｓ９ガイド長さ試験：ｓｇＲＮＡガイド長さ、すなわち２０対２１対２２ｂｐ、さらにガイドの始端（５’末端）における「Ｇ」の効果を決定するため。この実験では、

標的部位：

Ａ１：ＡＡＶＳ１

Ｅ１：ＥＭＸ１

Ｔ１、Ｔ２、…：標的部位の付番

ＴＧＣ、ＧＴＣ、…：ＰＡＭの５’末端からの位置２３、２２、２１ｎｔにおける塩基組成

【１１７０】

この実施例の実験は以下によって実施する：１．２つの目的の遺伝子ＡＡＶＳ１およびＥＭＸ１の中でＮＮＧＲＲをＰＡＭとして使用して標的を選択する。２．標的に対応する、しかしｓｇＲＮＡ内のガイド配列部分の長さは２０から２１、２２まで様々なオリゴを合成する。３．このオリゴを使用してｓｇＲＮＡ発現カセットを作成し、ＳａＣａｓ９タンパク質を発現するプラスミドと共にＨＥＫ ２９３ＦＴ細胞系に同時形質移入する。４．形質移入の７２時間後、細胞を回収し、次にＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイによって分析してインデルを検出した。５．次に、Ｃａｓ９によって誘導されたインデル形成頻度を計算し、本明細書に添付する図に要約した。

【１１７１】

図６７は、種々の標的間および２つの異なる遺伝子（ＡＡＶＳ１およびＥＭＸ１）の範囲内では、灰色のバーで表される２１ｎｔ／塩基対（ｂｐ）が、少なくとも２０または２２塩基対（それぞれ黒色および白色のバーで表される）と比較して最適なスペーサー長さであることを示す。標的および遺伝子は重要でなく、単に代表例と考えられる。従って、特にＳａＣａｓ９では、またはＳａＣａｓ９に関しては、２１ｎｔまたは塩基対が良好な長さに最適であるように見える。図６７はまた、ガイド／標的配列の５’末端にあるＧｎｔが、例えばＵ６プロモーターにとって有利となり得ることも示す。最適なガイド長さは各Ｃａｓ９タンパク質に特異的であり得る。例えば、ＳｐＣａｓ９については、最適なガイド長さは１９～２０ｎｔであり得る。ひいては、この例は、どのように最適なガイド長さを決定および使用することができるかを実証する。

【１１７２】

イントロン試験

この実験は、ガイド配列をＣａｓ９イントロン配列に挿入することができたかどうかを試験しようと試みた。

【１１７３】

以下の構築物を使用した。ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）はイントロン内（Ｃａｓ９ Ｎ’およびＣ’末端エクソン間）に存在することに留意されたい。

ＣＭＶ－ＳａＣａｓ９（Ｎ末端）－イントロン（ｓｇＲＮＡ）－ＳａＣａｓ９（Ｃ末端）

【１１７４】
構築物はＨｅｐａ細胞で発現させた。
【１１７５】
各イントロンを２つの異なるガイド：Ｐｃｓｋ９およびＨｍｇｃｒ　ｓｇＲＮＡで試験した。
【１１７６】
示される合計９個の構築物：３個のＥＢＶ１、３個のＥＢＶ２および３個のＡＤＶ：
－　レーン１～３：ＥＢＶ１－１５２（ＥＢＶベース、ＥＢＶゲノム由来の１５２ｂｐイントロン１）を示す
－　レーン４～６：ＥＢＶ２（ＥＢＶベース、ＥＢＶゲノムのＷリピート由来のイントロン）を示す
－　レーン７～９：ＡＤＶ（アデノウイルスベースのイントロン、Ｋｉａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，「哺乳類細胞におけるＣＲＩＳＰＲ転写抑制デバイスおよび層状回路（ＣＲＩＳＰＲ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ　ｒｅｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｄｅｖｉｃｅｓ　ａｎｄ　ｌａｙｅｒｅｄ　ｃｉｒｃｕｉｔｓ　ｉｎ　ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｃｅｌｌｓ）」，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｍｅｔｈ．２９６９　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ　ｏｎｌｉｎｅ　５　Ｍａｙ　２０１４およびＮｉｓｓｉｍ　ｅｔ　ａｌ，「ヒト細胞における統合ＲＮＡおよびＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓツールキットによる遺伝子ネットワークの多重化したプログラム可能な調節（Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ　ａｎｄ　Ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ　Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｇｅｎｅ　Ｎｅｔｗｏｒｋｓ　ｗｉｔｈ　ａｎ　Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＲＮＡ　ａｎｄ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　Ｔｏｏｌｋｉｔ　ｉｎ　Ｈｕｍａｎ　Ｃｅｌｌｓ）」，Ｖｏｌｕｍｅ　５４，Ｉｓｓｕｅ　４，ｐ６９８－７１０，２２　Ｍａｙ　２０１４；ＤＯＩ：ｈｔｔｐ：／／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ｍｏｌｃｅｌ．２０１４．０４．０２２と同様の起源）を示す。
【１１７７】
各設計群内で、イントロン内におけるｓｇＲＮＡの３つの異なる挿入部位に対応する３つの構築物。
【１１７８】
ＡＤＶ設計３
結果を図６８に示す。これらの結果は、ＳａＣａｓ９イントロンへのガイド配列のパッケージングを成功させることの原理証明が確かに可能であることを提供する。ガイド配列を有するｓｇＲＮＡを、アデノウイルスに由来する合成イントロン内に挿入し、次にこのイントロン－ｓｇＲＮＡカセット全体をＳａＣａｓ９遺伝子に挿入する。イントロンは、ＳａＣａｓ９タンパク質の正常な発現を著しく妨げることなしにＳａＣａｓ９遺伝子内のどこにでも挿入することができる。ｓｇＲＮＡを有する複数のイントロンを、ＳａＣａｓ９遺伝子内の種々の位置に挿入することができる。位置決めは柔軟であり、この広範な手法は以下の２つの形で有利である：
【１１７９】
サイズ最小化によって、構築物中のｂｐまたはｎｔの総数を減らすことができる。
【１１８０】
「スペース」がここでも常に課題であるため、多重化によってより高度な多重化（複数のガイドの同様送達）が可能である。ガイドは必ずしも特異的プロモーターを必要としないため、同様に１つ以上のガイドを、ある／当該のＣａｓ９イントロンにパッケージングすることができる。
【１１８１】
上記で考察したとおり、複数の合成イントロンをＣａｓ９に導入することができるため、前述の文章では「ある／当該の」を使用する。ｓｇＲＮＡを、イントロンの５’末端に近いが、そこから少なくとも５～１５ｂｐの、またイントロンの分岐点より前の位置に挿入することが有利であり得る。５’スプライス供与部位とイントロンの中央の分岐点との

間のイントロンスペーサー配列の一部は、当業者がそうすること望む場合には欠失させてもよい。ＳａとＳｐとの間でｓｇＲＮＡ構造は異なるという理由を含め、Ｃａｓ９、特にＳａＣａｓ９でこれが達成されたことは意外とも言える。

【１１８２】

現在のところＡＤＶが好ましいが、この手法は様々なウイルスおよびＣａｓ９（Ｓａ、Ｓｐ等）にわたり幅広い適用性を有する。

【１１８３】

Ｈ１プロモーター試験

この実験は、Ｕ６プロモーターの代替となるプロモーターを調べようと試みた。

【１１８４】

Ａ）完全長Ｈ１

以下の構築物を作製した：

元のＨ１プロモーターが１つのｓｇＲＮＡ（Ｐｃｓｋ９－Ｔａｒｇｅｔ２０１またはＨｍｇｃｒ－ＮｅｗＴａｒｇｅｔ５のいずれか）を駆動するＣＭＶ－ＳａＣａｓ９

【１１８５】

図６９を見ると分かるように、試験した各標的についてＵ６が高いインデル形成割合を示すとおり、完全長Ｈ１プロモーター（灰色のバー）はなおもＵ６プロモーター（黒色のバー）より弱い。

【１１８６】

Ｂ）二重Ｈ１プロモーター試験（短鎖Ｈ１）

以下の構築物を作製した：

２つの短鎖Ｈ１プロモーターが２つのｓｇＲＮＡ（Ｐｃｓｋ９－Ｔａｒｇｅｔ２０１およびＨｍｇｃｒ－ＮｅｗＴａｒｇｅｔ５）を同時に駆動する、二重短鎖Ｈ１プロモーターを同じ向きおよび逆の向きで使用したＴＢＧ－ＳａＣａｓ９。

【１１８７】

図７０を見ると分かるとおり、短鎖Ｈ１プロモーターは完全長Ｈ１より弱い。

【１１８８】

ＳａＣａｓ９ニッカーゼ試験（Ｄ１０Ａ突然変異体を使用）

この実験は、構築物中の２つのガイド配列の５’末端間の距離を調べ、次にそれを、Ｄ１０Ａ　ＳａＣＡｓ９二重ニッカーゼの開裂効率に関して測定した。標的はヒトＡＡＴ１遺伝子であった。これらの試験はプラスミドにクローニングした２０ｂｐ＋Ｇガイドで行った。

【１１８９】

－５～＋１ｂｐ（５’から５’）の間で最適な結果が示された（図７１を参照のこと）。

【１１９０】

実施例３９：ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９を使用した哺乳類の脳における遺伝子機能のインビボ研究

この研究は以下の要点を提示する：

・インビボでのＡＡＶ媒介性Ｃａｓ９送達の成功ならびに分裂終了ニューロンにおける効率的なゲノム改変の初めての実証；

・Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡ発現細胞からの神経核の容易な単離を可能にする核タグ標識技法の開発；

・ニューロントランスクリプトームのＲＮＡｓｅｑ解析に向けた適用の実証；・電気生理学的研究とＣａｓ９媒介性ゲノム摂動との統合；および

・および、多重ターゲティングおよびＣａｓ９媒介性ゲノム編集を用いてげっ歯類行動に関する遺伝子機能を調べる能力の実証。

【１１９１】

疾患関連突然変異を有するトランスジェニック動物モデルは、神経障害の研究に極めて有用であり、疾患の遺伝的および病態生理学的機構を解明する助けとなる[1]。しかしなが

ら、単一または複数の遺伝子修飾を有する動物モデルの作成は特に労力がかかり、何世代にもわたる時間のかかる繁殖が必要である。従って、正常および疾患関連脳プロセスにおける遺伝子機能の迅速な分析を促進するためには、インビボでニューロンのゲノムを正確かつ効率的に操作する能力が必要となる。化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼＣａｓ９（ＳｐＣａｓ９）は、真核細胞の複製において単一および複数の遺伝子の正確かつ効率的なゲノム開裂を媒介し、フレームシフト挿入／欠失（インデル）突然変異をもたらすことが示されている[2、3]。ここで、本発明者らは、Ｃａｓ９媒介性ゲノム摂動を生化学的、シーケンシングの、電気生理学的、および行動学的リードアウトと統合して、神経プロセスにおける個々のおよび一群の遺伝子の機能ならびに脳障害でのその役割をインビボで研究する。

【１１９２】

考察

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターは、マウス脳への組換え遺伝子の送達に一般的に用いられている[4]。ＡＡＶ系の主な限界は、上限がＩＴＲなしに約４．５ｋｂという[5]、その小さいパッケージングサイズであり、これにより単一のベクター中にパッケージングし得る遺伝物質の量が制限される。ＳｐＣａｓ９[6]のサイズが既に４．２ｋｂあるため、単一のＡＡＶベクター内で他の遺伝子エレメントに残されているのは０．３ｋｂ未満であり、本発明者らは、２つの別個のウイルスベクター上にＳｐＣａｓ９（ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９）およびｓｇＲＮＡ発現カセット（ＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅ）をパッケージングするデュアルベクター系を設計した（図７２）。ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９ベクターを設計する間、本発明者らは、ＳｐＣａｓ９発現を最適化するため様々な短いニューロン特異的プロモーターならびにポリアデニル化シグナルを比較した。本発明者らは、その最終的な設計について、培養初代マウス皮質ニューロンで十分なレベルのＳｐＣａｓ９発現を達成する能力に基づきマウスＭｅｃｐ２プロモーター（２３５ｂｐ、ｐＭｅｃｐ２）[7]および最小ポリアデニル化シグナル（４８ｂｐ、ｓｐＡ）[8]を選択した（図７６－ｃ）。ＳｐＣａｓ９を発現するニューロンの免疫蛍光法による同定を促進するため、本発明者らはＳｐＣａｓ９をＨＡ－エピトープタグでタグ標識した。ＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅベクターについては、本発明者らは、Ｕ６－ｓｇＲＮＡ発現カセットならびにヒトシナプシンＩプロモーターによって駆動されるＫＡＳＨ核膜貫通ドメイン[9]と融合した緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をパッケージングした（図７２ａ）。ＧＦＰ－ＫＡＳＨ融合タンパク質はＧＦＰを核外膜に指向させ（図７６ｃ、図７６ｄ）、ＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅによって形質導入されたインタクトな神経核の蛍光に基づく同定および精製を可能にする。

【１１９３】

本発明者らのデュアルベクター送達系の送達有効性を試験するため、本発明者らは初めにインビトロで培養初代マウス皮質ニューロンを形質導入し、ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９およびＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅによるロバストな発現を観察したところ（図７６ｃ）、８０％を超える同時形質導入効率であった（図７６ｅ）。重要なことには、非形質導入ニューロンと比較すると、ＳｐＣａｓ９の発現は形質導入ニューロンの形態および生存率に悪影響を及ぼさなかった（図７６ｃ、図７６ｆ）。

【１１９４】

効率的な送達系が確立されたことで、本発明者らは次に、マウス初代ニューロンにおけるＳｐＣａｓ９媒介性ゲノム編集を試験しようとした。種々の分裂細胞型でＳｐＣａｓ９を使用して効率的なゲノム改変が達成されているが、ＳｐＣａｓ９を分裂終了ニューロンにおけるゲノム編集の効率的な達成に使用し得るかどうかは不明である。本発明者らの初期試験では、自閉症スペクトラム障害の一種であるレット症候群[10]で主要な役割を果たすＭｅｃｐ２遺伝子をターゲティングした。ＭｅＣＰ２タンパク質は、脳の至る所にあるニューロンで遍在的に発現するが、グリア細胞ではほとんど発現がなく[11、12]、その欠損はニューロンの重大な形態学的および電気生理的表現型に関連することが示されており、両方ともに、レット症候群の患者で観察される神経学的症状に寄与すると考えられている[13～16]。Ｍｅｃｐ２をターゲティングするため、本発明者らは初めに、マウスＭ

ｅｃｐ２遺伝子のエクソン３をターゲティングするいくつかのｓｇＲＮＡを設計し（図７７ａ）、Ｎｅｕｒｏ－２ａ細胞を使用してそれらの有効性を評価した。最も効率の高いｓｇＲＮＡを、ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイを用いて同定した（図７７ｂ）。本発明者らは、続くインビトロおよびインビボＭｅｃｐ２ターゲティング実験用に、最も有効なｓｇＲＮＡ（Ｍｅｃｐ２標的５）を選択した。

【１１９５】

ニューロンにおける本発明者らのデュアルベクター系の編集効率を評価するため、本発明者らは初代マウス皮質ニューロンをインビトロ培養７日目に形質導入し（７ＤＩＶ、図７８ａ）、形質導入の７日後にＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイを用いてインデル率を計測した（図７８ｂ）。顕著なことに、ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９とＭｅｃｐ２をターゲティングするＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅとを同時形質導入したニューロン培養物は、対照ニューロンと比較してＭｅＣＰ２タンパク質レベルの最大８０％の低下を示した（図７８ｃ、図７８ｄ）。比較的低いインデル頻度（約１４％）とロバストなタンパク質欠乏（約８０％）との間の観察された不一致に関する１つの可能性のある説明は、単に標的部位におけるＳｐＣａｓ９の結合が転写を妨げ得るというものであり、これは大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）で示されている[17、18]。本発明者らは、ＲｕｖＣおよびＨＮＨ触媒ドメインの両方を不活性化した[19、20]ＳｐＣａｓ９の突然変異体（Ｄ１０ＡおよびＨ８４０Ａ、ｄＳｐＣａｓ９）を使用してこの可能性を調べた。ｄＳｐＣａｓ９およびＭｅｃｐ２ターゲティングｓｇＲＮＡの同時発現はＭｅＣＰ２タンパク質レベルを低下させなかった（図７８ａ、図７８ｄ）ことから、活性ＳｐＣａｓ９の存在下で観察されたＭｅＣＰ２レベルの低下が、Ｍｅｃｐ２遺伝子座の改変の存在に起因することが示唆される。検出されたインデルの低いレベルとタンパク質欠乏の高いレベルとの間の不一致に関する別の可能性のある説明は、ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイによる真のインデル率の過小評価に起因し得る－ＳＵＲＶＥＹＯＲの検出精度はインデル配列組成に感受性が高いことが以前示されている[21]。

【１１９６】

ＭｅＣＰ２機能喪失は、ニューロンにおける樹状突起樹の異常および棘形態形成障害に関連することが以前示されている[14、16]。ＭｅＣＰ２欠乏のこれらの表現型はまた、ＭｅＣＰ－ＫＯ　ｉＰＳ細胞から分化したニューロンでも再現されている[15]。従って、本発明者らは、ニューロンにおけるＳｐＣａｓ９媒介性ＭｅＣＰ２欠乏が同様にレット症候群の形態学的表現型を再現するかどうかを調べた。実際、ＳｐＣａｓ９とＭｅｃｐ２をターゲティングするｓｇＲＮＡとを同時発現するニューロンは、対照ニューロンと比較したとき樹状突起樹形態および棘密度の変化を呈した（図７９）。これらの結果は、ＳｐＣａｓ９を使用して分裂終了ニューロンにおける標的ノックアウトを可能にすることにより、細胞アッセイにおける遺伝子機能の研究を促進し得ることを実証している。

【１１９７】

不均一な細胞型の入り組んだ回路網で構成される神経系の複雑さを所与とすれば、ニューロンのゲノムをインビボで効率的に編集可能であることにより、自然文脈に組み込まれた関連細胞型における遺伝子機能の直接的な試験が可能となる。従って、本発明者らは、成体マウスにおいて高力価ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９とＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅとの混合物（１：１比）を海馬歯状回に定位注入した。本発明者らは、ウイルス注入後４週間で海馬顆粒細胞において両方のベクターの同時形質導入効率が高く（８０％を超える）（図７２ｂ、図７２ｃ）、Ｍｅｃｐ２遺伝子座のゲノム修飾がもたらされた（図７２ｄ）ことを観察した。ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイを用いて、本発明者らは、注入した脳領域から採取した脳パンチで約１３％のインデル頻度を検出した（図７２ｅ）。本発明者らの培養初代ニューロンにおける知見と同様に、Ｍｅｃｐ２遺伝子座のＳｐＣａｓ９媒介性切断は、ＭｅＣＰ２タンパク質レベルを６０％超効率的に低下させた。（図７２ｆ）加えて、歯状回中のＭｅＣＰ２陽性核の数が、ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９およびＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅを注入したとき、ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９単独と比較して７５％超減少した（図７２ｇ～図７２ｈ）。これらの結果は、ＳｐＣａｓ９を使用してインタクトな生物学的コンテク

ストの範囲内で特異的遺伝子に直接摂動を与え得ることを示唆している。

【１１９８】

ターゲティングしたゲノム摂動を定量的リードアウトと組み合わせて、特定のゲノムエレメントの生物学的機能に関する洞察を提供することができる。ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９およびＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅを形質導入した細胞の分析を促進するため、本発明者らは、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を用いてＧＦＰ－ＫＡＳＨ標識核を精製する方法を開発した（図７３ａ）。選別した核を直接使用して、下流の生化学的分析または配列解析用に核ＤＮＡおよびＲＮＡを精製することができる。本発明者らはサンガーシーケンシングを用いて、１４個中１３個の単一ＧＦＰ陽性核がｓｇＲＮＡ標的部位にインデル突然変異を含有したことを見出した。

【１１９９】

ゲノムＤＮＡシーケンシングに加え、精製ＧＦＰ陽性核をまたＲＮＡｓｅｑ解析に使用して、ＭｅＣＰ２欠乏の転写結果を研究することもできる（図７３ｂおよび図８０）。歯状回のニューロンの転写に対するＭｅｃｐ２ノックアウトの効果を試験するため、本発明者らは、ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９、ならびに細菌ｌａｃＺ遺伝子をターゲティングし、かつマウスゲノムはターゲティングしないように設計されている対照ｓｇＲＮＡか、またはＭｅｃｐ２をターゲティングするｓｇＲＮＡかのいずれかの投与を受ける動物のＦＡＣＳ精製ＧＦＰ$^{+}$核を使用して、ＲＮＡｓｅｑライブラリを調製した。全てのｓｇＲＮＡが、そのオフターゲットスコアが最小となるように最適化されている（ＣＲＩＳＰＲ設計ツール：ｈｔｔｐ：／／ｔｏｏｌｓ．ｇｅｎｏｍｅ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．ｏｒｇ）[2]。本発明者らは、対照とＭｅｃｐ２　ｓｇＲＮＡ発現核との間に差次的発現遺伝子（図７０ｂ）を見出すことができた（ｐ＜０．０１）。本発明者らは、Ｍｅｃｐ２　ｓｇＲＮＡ発現核で下方制御された遺伝子の中にいくつかの興味深い候補を同定した：Ｈｐｃａ、Ｏｌｆｍ１、およびＮｃｄｎ（これらは学習行動において重要な役割を果たすことが以前報告されているものである[２２～２４]）；およびＣｐｌｘ２（これはシナプス小胞放出に関与し、かつニューロン発火率に関係することが示されている[２５、２６]）。これらの結果は、ＳｐＣａｓ９媒介性ゲノム摂動と集団レベルのＲＮＡｓｅｑ解析との組み合わせが、ニューロンにおける転写調節を特徴付け、かつ特定のニューロン機能または疾患過程に重要であり得る遺伝子を示唆する方法をもたらすことを実証している。

【１２００】

脳におけるＳｐＣａｓ９媒介性インビボゲノム編集はまた、電気生理学的記録法と組み合わせることにより、特定の細胞型または回路成分に対するゲノム摂動の効果を研究することができる。神経生理学に対するＭｅＣＰ２欠乏の機能的効果を研究するため、本発明者らは、ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９とＭｅｃｐ２をターゲティングするＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅとを雄マウスの一次視覚野（Ｖ１）の表層に定位的に同時送達した。Ｖ１を選択したのは、二光子イメージングおよび二光子誘導標的化記録法にとって表層皮質興奮性ニューロンは到達性が高いためである。ＳｐＣａｓ９送達の２週間後、マウスを二光子誘導傍細胞記録法に供し（図７４）、マウスＶ１の第２／３層におけるＫＡＳＨ－ＧＦＰ$^{+}$ニューロンとＧＦＰ$^{-}$隣接ニューロンとの電気生理学的反応を比較した（図７２ａ～図７２ｃ）。本発明者らは、２０度インクリメントの１８枚のドリフトグレーティングに対するニューロン応答を測定し、細胞の誘発された発火率（ＦＲ）および方位選択性指数（ｏｒｉｅｎｔａｔｉｏｎ　ｓｅｌｅｃｔｉｖｉｔｙ　ｉｎｄｅｘ：ＯＳＩ）を、応答のベクトル平均を取ることにより計算した。ＦＲおよびＯＳＩの両方とも、興奮性ＧＦＰ$^{+}$、ＭｅＣＰ２ノックアウトニューロンについて隣接ＧＦＰ$^{-}$興奮性ニューロンと比較して有意に低下した（図７３ｄ～図７３ｅ）。比較すると、ＳｐＣａｓ９と併せた対照ｓｇＲＮＡ発現は、隣接する非感染ニューロンと比較したときＦＲおよびＯＳＩに対していかなる効果も有しなかった（図７３ｄ～図７３ｅ）。これらの結果は、成熟Ｖ１皮質ニューロンにおけるＳｐＣａｓ９媒介性のＭｅＣＰ２欠乏がインビボで２週間以内に興奮性ニューロンの視覚反応特性を変化させることを示しており、さらに、遺伝子機能の研究および神経回路の分析のための、インビボで哺乳類の脳における標的遺伝子ノックアウトを促進することにおけ

るＳｐＣａｓ９の多用途性を実証している。

【１２０１】

ＳｐＣａｓ９系の一つの重要な利点は、多重ゲノム編集を促進するその能力である[2]。生きている動物の脳に複数の遺伝子の安定したノックアウトを導入することには、生理学的および神経病理学的病態における多遺伝子機構の因果関係研究など、潜在的に広範囲に及ぶ適用性があるものと思われる。脳における多重ゲノム編集の可能性を試験するため、本発明者らは、核標識用のＧＦＰ－ＫＡＳＨを伴うタンデムの３つのｓｇＲＮＡからなる多重ｓｇＲＮＡ発現ベクターを設計した（図７４ａ）。本発明者らは、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ遺伝子ファミリー（ＤＮＭＴ）（Ｄｎｍｔ１、Ｄｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ３ｂからなる）をターゲティングするｓｇＲＮＡを選択した。Ｄｎｍｔ１および３ａは成熟脳で高発現であり、以前、ＤＮＭＴ活性がＤＮＡメチル化を変化させ、かつシナプス可塑性ならびに学習および記憶形成にＤｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１の両方が必要であることが示された[27]。本発明者らは、高い改変効率でＤｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１に対する個々のｓｇＲＮＡを設計した。Ｄｎｍｔ３ｂによるいかなる潜在的な代償効果も回避するため、本発明者らはまた、この遺伝子を、それが主として神経発生中に発現するにしても[27]、さらにターゲティングすることに決めた。最後に本発明者らは、３つ全ての標的遺伝子について高度に同時性のＤＮＡ開裂用に個々のｓｇＲＮＡを選択した（図７５ｂおよび図８１）。

【１２０２】

インビボでの多重ゲノム編集の有効性を試験するため、本発明者らは、高力価ＡＡＶ－ＳｐＣａｓ９とＡＡＶ－ＳｐＧｕｉｄｅとの混合物を雄成体マウスの背側および腹側歯状回に定位的に送達した。４週間後、海馬を解剖し、ＦＡＣＳで標的細胞核を選別した。本発明者らは、選別した核集団においてＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ（図７５ｃ）およびシーケンシング（図８２）を用いて約１９％（Ｄｎｍｔ３ａ）、１８％（Ｄｎｍｔ１）および４％（Ｄｎｍｔ３ｂ）のインデル頻度を検出した。複数の遺伝子座のターゲティングは、個々の細胞における有効な複数ノックアウト率に関して疑問を起こさせる。単一の核選別を標的シーケンシングと組み合わせて使用することにより、本発明者らは、個々の神経核における複数のＤＮＭＴ遺伝子座の同時ターゲティングを定量化した（図７５ｄ）。少なくとも１つのＤｎｍｔ遺伝子座に改変を有する神経核のうち、７０％を上回る核がＤｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１の両方にインデルを含んだ（約４０％が３つ全ての遺伝子座に、および約３０％がＤｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１遺伝子座の両方にインデルを含んだ）。これらの結果は、歯状回におけるＤｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１タンパク質欠乏レベルと一致する（図７５ｅ）。成熟脳におけるＤｎｍｔ３ｂの低い発現に起因して、本発明者らはＤｎｍｔ３ｂタンパク質を検出することができなかった。

【１２０３】

最近のＳｐＣａｓ９研究は、２０ｎｔ　ｓｇＲＮＡ配列内の各塩基が全体的な特異性に寄与するが、ｓｇＲＮＡに部分的に一致するゲノム遺伝子座が、オフターゲット二本鎖切断およびインデル形成をもたらし得ることを示している[28、29]。オフターゲット改変率を評価するため、本発明者らは、高度に類似したゲノム標的部位のリストを計算的に同定し[2]、標的ディープシーケンシングを用いて改変率を定量化した。上位の予測オフターゲット遺伝子座のインデル解析から、０～１．６％のインデル形成率が明らかとなり、ＳｐＣａｓ９改変が特異的であることが実証された。（捕表１）インビボでのＳｐＣａｓ９媒介性ゲノム編集の特異性を高めるため、さらなる研究では、二重ニッキング[30、31]およびトランケートｓｇＲＮＡ[28]などのオフターゲット最小化戦略を用い得る。

【１２０４】

Ｄｎｍｔ３ａおよびＤｎｍｔ１のノックダウンは、海馬依存性の記憶形成に影響を与えることが以前示されている[27]。従って、本発明者らは、文脈的恐怖条件付け行動試験を実施して、ＳｐＣａｓ９媒介性三重ノックアウト（Ｄｎｍｔ３ａ、Ｄｎｍｔ１およびＤｎｍｔ３ｂ）が記憶の獲得および固定に及ぼす効果を調べた。記憶獲得段階では対照マウスと三重ノックアウトマウスとの間にいかなる違いも観察されなかったが、訓練文脈条件下

で試験したとき、ノックアウトマウスは記憶固定の障害を示した（図７５ｆ）。マウスを変化した文脈で試験したときには、この効果は消失した。本発明者らの結果は、歯状回ニューロンにおけるＤＮＭＴファミリーメンバーのＣＲＩＰＳＲ－Ｃａｓ９媒介性ノックアウトが、行動課題における遺伝子の機能を探索するのに十分であることを実証している。

【１２０５】

まとめると、本発明者らの結果は、ＳｐＣａｓ９およびｓｇＲＮＡのＡＡＶ媒介性インビボ送達が、インタクトな神経回路内で正確なゲノム摂動を達成するための迅速かつ強力な技術を提供することを実証している。ＳｐＣａｓ９は分裂細胞のエンジニアリングに広く用いられているが、本発明者らは、ＳｐＣａｓ９はまた、分裂終了ニューロンのゲノムをＮＨＥＪ媒介性インデル生成によって高効率でエンジニアリングするためにも使用し得ることを実証している。ＳｐＣａｓ９媒介性ゲノム摂動を、生化学的、シーケンシングの、電気生理学的、および行動学的解析と組み合わせて、標的ゲノムエレメントの機能を研究することができる。本発明者らは、単一または複数の遺伝子のＳｐＣａｓ９媒介性ターゲティングが、古典的な、より時間のかかる遺伝的マウスモデルを使用して観察される形態学的、電気生理学的、および行動学的表現型を再現し得ることを実証している。現在の研究は、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９を用いたが、これは２つのＡＡＶベクターの使用を必要とするのみならず、細胞型特異的ターゲティングを達成するために用い得るプロモーターエレメントのサイズもまた制限する。ＳｐＣａｓ９と比べて実質的に短いものもある[2、32、33]Ｃａｓ９オルソログの多様性を所与とすれば、本明細書に記載されるとおりの、Ｃａｓ９とｓｇＲＮＡとの両方を発現する単一のＡＡＶベクターをエンジニアリングすることが可能なはずである。

【１２０６】

参考文献

1. Ｎｅｓｔｌｅｒ, Ｅ. Ｊ. & Ｈｙｍａｎ, Ｓ. Ｅ. Ａｎｉｍａｌ ｍｏｄｅｌｓ ｏｆ ｎｅｕｒｏｐｓｙｃｈｉａｔｒｉｃ ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ. Ｎａｔ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ １３, １１６１－１１６９（２０１０）.
2. Ｃｏｎｇ, Ｌ. ｅｔ ａｌ. Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ. Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３９, ８１９－８２３（２０１３）.
3. Ｍａｌｉ, Ｐ. ｅｔ ａｌ. ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｈｕｍａｎ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｖｉａ Ｃａｓ９. Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３９, ８２３－８２６（２０１３）.
4. Ｂｕｒｇｅｒ, Ｃ., Ｎａｓｈ, Ｋ. & Ｍａｎｄｅｌ, Ｒ. Ｊ. Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒｓ ｉｎ ｔｈｅ ｎｅｒｖｏｕｓ ｓｙｓｔｅｍ. Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １６, ７８１－７９１（２００５）.
5. Ｗｕ, Ｚ., Ｙａｎｇ, Ｈ. & Ｃｏｌｏｓｉ, Ｐ. Ｅｆｆｅｃｔ ｏｆ ｇｅｎｏｍｅ ｓｉｚｅ ｏｎ ＡＡＶ ｖｅｃｔｏｒ ｐａｃｋａｇｉｎｇ. Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ １８, ８０－８６（２０１０）.
6. Ｄｅｌｔｃｈｅｖａ, Ｅ. ｅｔ ａｌ. ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ ｂｙ ｔｒａｎｓ－ｅｎｃｏｄｅｄ ｓｍａｌｌ ＲＮＡ ａｎｄ ｈｏｓｔ ｆａｃｔｏｒ ＲＮａｓｅ ＩＩＩ. Ｎａｔｕｒｅ ４７１, ６０２－６０７（２０１１）.
7. Ｇｒａｙ, Ｓ. Ｊ. ｅｔ ａｌ. Ｏｐｔｉｍｉｚｉｎｇ ｐｒｏｍｏｔｅｒｓ ｆｏｒ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ ａｎｄ ｃｅｎｔｒａｌ ｎｅｒｖｏｕｓ ｓｙｓｔｅｍ ｕｓｉｎｇ ｓｅｌｆ－ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ ｖｅｃｔｏｒｓ. Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２２, １１４３－１１５３（２０１１）.
8. Ｌｅｖｉｔｔ, Ｎ., Ｂｒｉｇｇｓ, Ｄ., Ｇｉｌ, Ａ. & Ｐｒｏｕｄｆｏｏｔ

, N. J. Definition of an efficient synthetic poly(A) site. Genes Dev 3, 1019-1025 (1989).
9. Ostlund, C. et al. Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins. J Cell Sci 122, 4099-4108 (2009).
10. Chahrour, M. & Zoghbi, H. Y. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. Neuron 56, 422-437 (2007).
11. Kishi, N. & Macklis, J. D. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. Molecular and cellular neurosciences 27, 306-321 (2004).
12. Skene, P. J. et al. Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state. Molecular cell 37, 457-468 (2010).
13. Chen, R. Z., Akbarian, S., Tudor, M. & Jaenisch, R. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. Nat Genet 27, 327-331 (2001).
14. Zhou, Z. et al. Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. Neuron 52, 255-269 (2006).
15. Li, Y. et al. Global transcriptional and translational repression in human-embryonic-stem-cell-derived Rett syndrome neurons. Cell Stem Cell 13, 446-458 (2013).
16. Nguyen, M. V. et al. MeCP2 is critical for maintaining mature neuronal networks and global brain anatomy during late stages of postnatal brain development and in the mature adult brain. J Neurosci 32, 10021-10034 (2012).
17. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature biotechnology 31, 233-239 (2013).
18. Qi, L. S. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell 152, 1173-1183 (2013).
19. Sapranauskas, R. et al. The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provid

es immunity in Escherichia coli. Nucleic acids research 39, 9275-9282 (2011).
20. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337, 816-821 (2012).
21. Qiu, P. et al. Mutation detection using Surveyor nuclease. BioTechniques 36, 702-707 (2004).
22. Kobayashi, M. et al. Hippocalcin-deficient mice display a defect in cAMP response element-binding protein activation associated with impaired spatial and associative memory. Neuroscience 133, 471-484 (2005).
23. Dateki, M. et al. Neurochondrin negatively regulates CaMKII phosphorylation, and nervous system-specific gene disruption results in epileptic seizure. The Journal of biological chemistry 280, 20503-20508 (2005).
24. Nakaya, N. et al. Deletion in the N-terminal half of olfactomedin 1 modifies its interaction with synaptic proteins and causes brain dystrophy and abnormal behavior in mice. Experimental neurology 250, 205-218 (2013).
25. Reim, K. et al. Complexins regulate a late step in Ca2+-dependent neurotransmitter release. Cell 104, 71-81 (2001).
26. Edwardson, J. M. et al. Expression of mutant huntingtin blocks exocytosis in PC12 cells by depletion of complexin II. The Journal of biological chemistry 278, 30849-30853 (2003).
27. Feng, J. et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. Nat Neurosci 13, 423-430 (2010).
28. Fu, Y. et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nature biotechnology 31, 822-826 (2013).
29. Hsu, P. D. et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature biotechnology 31, 827-832 (2013).
30. Ran, F. A. et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell 154, 1380-1389 (2013).

31. Mali, P. et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nature biotechnology 31, 833－838（2013）.
32. Esvelt, K. M. & Wang, H. H. Genome－scale engineering for systems and synthetic biology. Molecular systems biology 9, 641（2013）.
33. Li, W., Teng, F., Li, T. & Zhou, Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR－Cas systems. Nat Biotechnol 31, 684－686（2013）.

【1207】

方法

DNA構築物

SpCas9標的選択および単一ガイドRNA（sgRNA）の生成のため、5’－NGG PAM配列に先行するように20nt標的配列を選択した。オフターゲット効果を最小限に抑えるため、CRIPSR設計ツールを使用した（http：／／tools.genome－engineering.org）。U6プロモーターをテンプレートとして使用して、フォワードプライマー：5’－CGCACGCGTAATTCGAACGCTGACGTCATC－3’および20ntDNA標的部位（太字斜体）を有するsgRNAを含むリバースプライマー：

【化36】

5’- CACACGCGTAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACG GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC*NNNNNNNNNNNNNNNNNN**NC*GGTGTTTCGTCCTTTCCAC-3’. **(配列番号)**

でsgRNAをPCR増幅した。

【1208】

対照sgRNA配列は、大腸菌（E. coli）由来のlacZ遺伝子をターゲティングするように設計した：標的配列：TGCGAATACGCCCACGCGATGGG（配列番号 ）EGFP－KASH[1]構築物はWorman教授（コロンビア大学（Columbia University），NYC）から供与されたもので、コードカセットをヒトシナプシンプロモーター（hSyn）下でAAV骨格にクローニングするためのPCRテンプレートとして使用した。次に、MluI部位を使用してU6－Mecp2 sgRNAコード配列を導入した。多重遺伝子ターゲティング戦略に向けて個々のsgRNAを上記に記載したとおりPCR増幅した。3つ全てのsgRNAを、Golden Gateクローニング戦略を用いて、PCR増幅したhSyn－GFP－KASH－bGHpAカセットとライゲートした。（図4Aを参照のこと）PCR増幅後、3つのsgRNAおよびhSyn－GFP－KASH－bGH pAを含むGolden Gateライゲーション産物をAAV骨格にクローニングした。得られた全ての構築物をシーケンシングして確認した。ニューロンにおけるSpCas9発現の駆動に最適なプロモーター配列を見付けるため、本発明者らは以下を試験した：hSyn1、マウストランケートMecp2（pMecp2）、およびトランケートラットMap1b（pMap1b）プロモーター配列[2]。（捕表1Aを参照のこと）以下のプライマーを使用してプロモーター領域を増幅した：

【化３７】

hSyn_F: 5’-GTGTCTAGACTGCAGAGGGCCCTG-3’; (配列番号)

hSyn_R: 5’-GTGTCGTGCCTGAGAGCGCAGTCGAGAA-3’; (配列番号)

Mecp2_F 5’-GAGAAGCTTAGCTGAATGGGGTCCGCCTC-3’; (配列番号)

Mecp2_R 5’-CTCACCGGTGCGCGCAACCGATGCCGGGACC-3’; (配列番号)

Map1b-283/-58_F 5’-GAGAAGCTTGGCGAAATGATTTGCTGCAGATG-3’; (配列番号)

Map1b-283/-58_R 5’-CTCACCGGTGCGCGCGTCGCCTCCCCCTCCGC-3’. (配列番号)

【１２０９】

ラットｍａｐ１ｂプロモーターの別のトランケーションを、以下のオリゴでアセンブルした：

【化３８】

5’-AGCTTCGCGCCGGGAGGAGGGGGGACGCAGTGGGCGGAGCGGAGACAGC
ACCTTCGGAGATAATCCTTTCTCCTGCCGCAGAGCAGAGGAGCGGCGGGAGAGGAA
CACTTCTCCCAGGCTTTAGCAGAGCCGGA-3’ および

5’-CCGGTCCGGCTCTGCTAAAGCCTGGGAGAAGTGTTCCTCTCCCGCCGCTC
CTCTGCTCTGCGGCAGGAGAAAGGATTATCTCCGAAGGTGCTGTCTCCGCTCCGCCC
ACTGCGTCCCCCCTCCTCCCGGCGCGA-3’. (配列番号)

【１２１０】

短鎖合成ポリアデニル化シグナル（ｓｐＡ）[3]を、以下のオリゴを使用してアセンブルした：

【化３９】

5’-
AATTCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTG TGTGC-3’ (配列番号) および

5’-
GGCCGCACACAAAAAACCAACACACAGATCTAATGAAAATAAAGAT CTTTTATTG-3’. (配列番号)

【１２１１】

ＳｐＣａｓ９およびそのＤ１０Ａ突然変異体型（ｄＳｐＣａｓ９）は以前記載された[4]、[5]。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によるニューロン形質移入には、ＥＦ１αプロモーターの制御下にある赤色蛍光タンパク質（ｍＣｈｅｒｒｙ）をコードするプラスミドを使用した。

【１２１２】

細胞系培養および形質移入

Ｎｅｕｒｏ－２ａ（Ｎ２ａ）細胞を、５％ウシ胎仔血清（ＢＳＡ）を含有するＤＭＥＭ中で成長させた。ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞には、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を含有するＤＭＥＭを使用した。細胞は５％CO_2雰囲気中３７℃で維持した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００またはポリエチレンイミン（ＰＥＩ）「ＭＡＸ」試薬（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）を製造者のプロトコルに従い使用して細胞を形質移入した。

【１２１３】

濃縮ＡＡＶベクターの作製

等比のＡＡＶ１およびＡＡＶ２血清型プラスミドならびにｐＤＦ６ヘルパープラスミドを使用して高力価ＡＡＶ１／２粒子を作製し、ヘパリンアフィニティーカラムで精製した[6]。ｑＰＣＲによってウイルス粒子の力価測定を行った。高力価ＡＡＶ１粒子はＵＮＣ Ｖｅｃｔｏｒ Ｃｏｒｅ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ（ノースカロライナ大学チャペルヒル校（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｎｏｒｔｈ Ｃａｒｏｌｉｎａ ａｔ Ｃｈａｐｅｌ Ｈｉｌｌ））によって作製された。ＤＭＥＭ中の低力価ＡＡＶ１粒子は、以前記載があるとおり作製した[7]。簡潔に言えば、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に、ＰＥＩ「ＭＡＸ」を使用して導入遺伝子プラスミド、ｐＡＡＶ１血清型プラスミドおよびｐＤＦ６ヘルパープラスミドを形質移入した。４８時間後に培養培地を回収し、０．４５μｍ ＰＶＤＦフィルタ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）でろ過した。

【１２１４】

初代皮質ニューロン培養

組織培養用のニューロンを得るために使用した動物を、ＭＩＴ動物管理委員会（ＭＩＴ ＣＡＣ：Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｎ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ）によって承認されたプロトコルに従い犠牲にした。胚性１６日目のマウス脳から初代培養物を調製した[8]。男女両性の胚を使用した。細胞を、ポリ－Ｄ－リジン（ＰＤＬ）でコートした２４ウェルプレート（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）またはラミニン／ＰＤＬでコートしたカバーガラス（ＶＷＲ）に播いた。培養物は、Ｂ２７、Ｇｌｕｔａｍａｘ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）およびペニシリン／ストレプトマイシン混合物を補足したＮｅｕｒｏｂａｓａｌ培地において３７℃および５％CO_2で成長させた。

【１２１５】

ＡＡＶ形質導入は、５００μｌのＮｅｕｒｏｂａｓａｌ培養培地中の皮質ニューロンを、７ＤＩＶでＨＥＫ２９３ＦＴ細胞からの３００μｌ（１：１比での二重感染）ＡＡＶ１含有馴化培地によってインキュベートした[7]。形質導入後１週間でニューロンを下流処理用に回収し、または免疫蛍光染色もしくは形態分析用に４％パラホルムアルデヒド中に固定した。

【１２１６】

ニューロン形態を可視化するため、先述のとおりＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を１週間使用してＤＩＶ７の細胞にＥＦ１α－ｍＣｈｅｒｒｙ発現ベクターを形質移入した[9]。総樹状突起長さを計測するため、ＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用して個々のニューロンの全ての樹状突起をトレースした。蛍光顕微鏡によって４０倍対物レンズ（Ｚｅｉｓｓ ＡｘｉｏＣａｍ Ａｘ１０顕微鏡、Ａｘｉｏｃａｍ ＭＲｍカメラ）で取得した画像に関し、一次樹状突起、樹状突起先端の数の定量化およびＳｈｏｌｌ解析[10]を実施した。樹状突起の数は、１０μｍより長い全ての非軸索突起の端部をカウントした。Ｓｈｏｌｌ解析については、Ｓｈｏｌｌプラグインを備えたＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用して細胞体の周りに直径５μｍ刻みの同心円を自動で描き、各円を横切る樹状突起の数をカウントした。

【１２１７】

マウス脳へのＡＡＶ１／２の定位注入

本明細書に記載する全ての動物手順がＭＩＴ ＣＡＣによって承認された。成体（１２～１６週齢）雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｎマウスを１００ｍｇ／ｋｇケタミンおよび１０ｍｇ／ｋｇキシラジンの腹腔内（ｉ．ｐ．）注射で麻酔した。先制鎮痛を投与した（Ｂｕｐｒｅｎｅｘ、１ｍｇ／ｋｇ、ｉ．ｐ．）。承認された手順に従い開頭術を実施し、１μｌの１：１ＡＡＶ混合物（1×10^{13} Ｖｇ／ｍｌのｓＭｅｃｐ２－ＳｐＣａｓ９；6×10^{12} Ｖｇ／ｍｌのＤＮＭＴ ３×ｓｇＲＮＡ；$3\sim5\times10^{12}$ Ｖｇ／ｍｌのｈＳｙｎ－ＧＦＰ－ＫＡＳＨ）を背側歯状回（前側／後側：－１．７；中外側：０．６；背側／腹側：－２．１５）および／または腹側歯状回（前側／後側：－３．５２；中外側：２．６５；背側／腹側：－３）に注入した。インビボ電気生理学記録実験（図７４）については、ウイルス注入座標は３ｍｍ外側（ブレグマから）および後側縫合線から１ｍｍ前側であった。時折生理食塩水で冷却しながらｄｒｅｍｅｌドリルを使用して頭蓋を薄くし、残りの硬

膜を、鉱油中に懸濁したウイルスを充填したガラス製マイクロピペットを使用して穿刺した。隣接部位に２００～２５０μｍの深さで数回の注入（３～４回）を行った。１５０～２００ｎｌの容積のウイルス混合物を各部位につき７５ｎｌ／分の速度で注入した。各注入後、ピペットをその場に３～５分間保持してから引き込み、それにより漏れを防いだ。切開を縫合し、術後３日間にわたり適切な術後鎮痛薬（メロキシカム、１～２ｍｇ／ｋｇ）を投与した。

【１２１８】

インビボ二光子誘導標的ルースパッチ記録法

ウイルス注入の２週間後、マウスを電気生理学的実験に使用した。マウスを２％イソフルランで麻酔し、０．８％イソフルランを使用して維持した。皮膚を切除し、ｓｕｇｉで洗浄し、接着剤および歯科用アクリルを使用して頭蓋に金属ヘッドプレートを取り付け、一次視覚野（Ｖ１）上で２ｍｍ×２ｍｍ開頭術を実施した。次に露出した領域を人工脳脊髄液（ａＣＳＦ；１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＫＣｌ、２ｍＭ　ＣａＣｌ２、１ｍＭ　ＭｇＣｌ２、０．０１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１０ｍＭ　グルコース；ｐＨ７．４）中の１．５％アガロースの薄層で覆った。実験中、動物の体温は加熱ブランケットで３７．５℃に維持した。

【１２１９】

ホウケイ酸ガラスピペット（ＷＰＩ）を、Ｓｕｔｔｅｒ　Ｐ－２０００レーザープラー（Ｓｕｔｔｅｒ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用して引いた。先端径は約１μｍであった一方、抵抗は３～５ＭΩであった。記録は、ＭｕｌｔｉＣｌａｍｐ　７００Ｂ増幅器（Ａｘｏｎ）を制御して、Ｍａｔｌａｂ（ＭａｔｈＷｏｒｋｓ）で書かれたカスタムソフトウェア（Ｎｅｔｗｏｒｋ　Ｐｒｉｓｍ、Ｓｕｒ　ｌａｂ）を使用して行った。ガラスピペット電極を２０～３５°の角度で脳に挿入し、Ａｇ／ＡｇＣｌ接地電極ペレット（Ｗａｒｎｅｒ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を脳および対物レンズと同じ溶液中に位置決めした。蛍光による可視化のため、ピペットにＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５９４（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）を充填した。初めに１０倍レンズを使用してピペットを注入部位にターゲティングし、次に２５倍レンズを使用して、７７０ｎｍの同時二光子イメージングで個々のＧＦＰ＋細胞にターゲティングした。急激に時間変化する５ｍＶ指令電圧パルスの間に電圧固定で観察される抵抗の振れによって細胞近接性を検出した。抵抗が５～１０ＭΩ上昇したところで、増幅器を電流固定に切り換え、ゼロ注入電流、４ＫＨｚのベッセルフィルタおよび３００ＨｚのＡＣフィルタ下でスパイクを記録した。ウイルスを注入した脳は事後に灌流し、免疫組織化学を実施した。

【１２２０】

視覚刺激およびインビボ二光子誘導標的ルースパッチ記録法からのデータ解析

ゲノム編集されたニューロンの方位選択性およびチューニングを評価するため、本発明者らは、Ｍａｔｌａｂ　ＰｓｙｃｈＴｏｏｌｂｏｘ－３で書かれたカスタムソフトウェアを使用して定方位グレーティングを提示した。グレーティングは細胞応答性に対して最適化し、方位を０から３６０度まで２０度刻みで段階的に変えることにより提示し、各グレーティングの提示は４秒間「オフ」に先行し、その後４秒間「オン」が続き、合計提示時間を１４４秒とした。データはＭａｔｌａｂに直接取得し、．ｍａｔファイルとして保存した。スパイク検出は、手動で定義した閾値と、続いてさらなる妥当性確認のためスパイク形状テンプレートマッチングを使用した解析ルーチンによって実施した。全てのスパイクをタグ付けし、グラフィカルユーザインターフェースのスクリーンに表示して、偽陽性および偽陰性を実験者が手動で精査した。次に各刺激に応答したスパイク時間をその視覚刺激に対するタイミングに基づき「オン」期間または「オフ」期間に分類し、各刺激の「オン」スパイクを、同じ期間に観察された「オフ」スパイクの数だけデクリメントした。方位実験について、「オン」期間および「オフ」期間は同じ長さであったため、刺激当たりのスパイク数＝（「オン」スパイク数）－（「オフ」スパイク数）である。

【１２２１】

目的とするあらゆる細胞について、この方法を用いて各方位刺激（０～３６０度、２０

度刻み）に対する応答を収集した。次にこれらの応答を、試験毎に方位対応答の「チューニング曲線」に変えた。以下のとおりの式に従い好ましい方位のベクトル平均を取ることにより、方位選択性指数（ＯＳＩ）を計算した：

【数２】

【１２２２】

組織調製および細胞核の精製

海馬または歯状回全体を氷冷ＤＰＢＳ（Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）中で速やかに解剖し、ドライアイスで衝撃凍結した。細胞核精製のため、組織を２ｍｌの氷冷ホモジナイズ緩衝液（ＨＢ）（３２０ｍＭ　スクロース、５ｍＭ　ＣａＣｌ、３ｍＭ　Ｍｇ（Ａｃ）$_2$、１０ｍＭ　トリス　ｐＨ７．８、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％ＮＰ４０、０．１ｍＭ　ＰＭＳＦ、１ｍＭ　β－メルカプトエタノール）中に、２ｍｌダウンス型ホモジナイザー（Ｓｉｇｍａ）を使用して；ペッスルＡで２５回、続いてペッスルＢで２５回、穏やかにホモジナイズした。次に、合計５ｍｌになるまで３ｍｌのＨＢを添加し、氷上に５分間置いておいた。勾配遠心のため、５ｍＭ　ＣａＣｌ、３ｍＭ　Ｍｇ（Ａｃ）$_2$、１０ｍＭ　トリス　ｐＨ７．８、０．１ｍＭ　ＰＭＳＦ、１ｍＭ　β－メルカプトエタノールを含有する５ｍｌの５０％ＯｐｔｉＰｒｅｐ（商標）密度勾配媒体（Ｓｉｇｍａ）を添加して混合した。この溶解物を、コニカル３０ｍｌ遠心管（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ、ＳＷ２８ロータ）の中の１０ｍｌ　２９％等浸透圧ＯｐｔｉＰｒｅｐ（商標）溶液の上に穏やかに入れた。試料を１０，１００×ｇ（７，５００ｒｐｍ）、４℃で３０分間遠心した。上清を取り除き、核ペレットを、６５ｍＭ　β－グリセロリン酸（ｐＨ７．０）、２ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$、２５ｍＭ　ＫＣｌ、３４０ｍＭ　スクロースおよび５％グリセロール中に穏やかに再懸濁した。精製した核の数および質を、明視野顕微鏡法を用いて検査した。

【１２２３】

細胞核選別

精製したＧＦＰ陽性（ＧＦＰ$^+$）および陰性（ＧＦＰ$^-$）のインタクトな核をＶｙｂｒａｎｔ（登録商標）ＤｙｅＣｙｃｌｅ（商標）Ｒｕｂｙ染色（１：５００、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で同時標識し、ＢＤ　ＦＡＣＳＡｒｉａ　ＩＩＩ（Ｋｏｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　Ｃｏｒｅ，ＭＩＴ）を使用して選別した。ＧＦＰ$^+$核およびＧＦＰ$^-$核を、１％ＢＳＡでコーティングされた、かつ４００μｌの再懸濁緩衝液（６５ｍＭ　β－グリセロリン酸塩ｐＨ７．０、２ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$、２５ｍＭ　ＫＣｌ、３４０ｍＭ　スクロースおよび５％グリセロール）が入った１．５ｍｌエッペンドルフ試験管に収集した。選別後、全ての試料を氷上に保ち、１０，０００×ｇ、４℃で２０分間遠心した。核ペレットを－８０℃で保存し、下流処理に直接使用した。

【１２２４】

ゲノムＤＮＡ抽出およびＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）アッセイ

ｓｇＲＮＡの機能試験のため、５０～７０％コンフルエントのＮ２ａ細胞に、単一のＰＣＲ増幅したｓｇＲＮＡおよびＳｐＣａｓ９ベクターを同時形質移入した。ＳｐＣａｓ９のみを形質移入した細胞を陰性対照として供した。形質移入後４８時間で細胞を回収し、ＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　＆　Ｔｉｓｓｕｅキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、製造者のプロトコルに従いＤＮＡを抽出した。ＡＡＶ１形質導入初代ニューロンからゲノムＤＮＡを単離するため、ＡＡＶ形質導入の７日後にＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　＆　Ｔｉｓｓｕｅキットを製造者の指示に従い使用した。

【１２２５】

選別した核または解剖した組織を、溶解緩衝液（１０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０、１０

mM　ＮａＣｌ、１０mM　ＥＤＴＡ、０．５mM　ＳＤＳ、プロテイナーゼＫ（ＰＫ、１ｍｇ／ｍｌ）およびＲＮアーゼＡ）中に５５℃で３０分間溶解させた。次に、クロロホルム－フェノール抽出を実施し、続いてエタノールによるＤＮＡ沈殿を、標準的手順に従い実施した。最後にＤＮＡをＴＥ緩衝液（１０mM　トリス　ｐＨ８．０、０．１mM　ＥＤＴＡ）中に再懸濁し、下流分析に使用した。個々のｓｇＲＮＡの機能試験を、補表２に掲載するＰＣＲプライマーを使用してＳＵＲＶＥＹＯＲ（商標）ヌクレアーゼアッセイ（Ｔｒａｎｓｇｅｎｏｍｉｃｓ）によって実施した。以前記載されたとおり[11]、バンド強度の定量化を実施した。

【１２２６】

ＲＮＡライブラリ調製およびシーケンシング

Ｍｅｃｐ２をターゲティングするガイドを有するＳｐＣａｓ９（４匹の動物）またはｌａｃＺをターゲティングするｇＲＮＡを有するＳｐＣａｓ９（４匹の動物）の両側性ウイルス送達の２週間後、歯状回を氷冷ＤＰＢＳ（Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）中に速やかに解剖し、ＲＮＡ－ｌａｔｅｒ溶液（Ａｍｂｉｏｎ）に直ちに移した。４℃で２４時間の後、組織を－８０℃に移した。１００個の標的神経核の集団を、１％２－メルカプトエタノール（Ｑｉａｇｅｎ）を補足した１０μｌ　ＴＣＬ緩衝液中にＦＡＣＳ選別した。遠心後、試料を－８０℃で直ちに凍結した。ＲＮＡを、ＡＭＰｕｒｅ　ＲＮＡｃｌｅａｎＸＰ　ＳＰＲＩビーズ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）で製造者の指示に従い精製し、８０％エタノールで３回洗浄し、最終的な溶出は省いた。ＲＮＡを捕捉したビーズを風乾させて、ｃＤＮＡ合成用に直ちに処理した。核を含まない試料を陰性対照として使用した。ｃＤＮＡライブラリの調製においては、逆転写酵素を０．１ｕｌのＭａｘｉｍａ　Ｈ　Ｍｉｎｕｓ酵素（２００Ｕ／ｕｌ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に置き換え、かつＰＣＲ反応を２５ｕｌの容積にスケールダウンしたことを除きＳＭＡＲＴ－ｓｅｑ２プロトコル[12]に従い、各動物につき３個の集団試料、合計２４個の集団試料を使用した。Ｎｅｘｔｅｒａ　ＸＴ　ＤＮＡ試料調製キット（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）を以下の改変を伴い使用して、タグメンテーション反応および最終的なＰＣＲ増幅を行った。反応容積は全て４分の１にスケールダウンし、かつＰＣＲ増幅ステップ後に、各試料につき２．５ｕｌを取ることによりライブラリをプールした。プールしたライブラリを、２ラウンドの０．７容積のＡＭＰｕｒｅ　ＸＰ　ＳＰＲＩビーズクリーンアップ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）を使用してクリーニングし、サイズ選択した。試料を高感度ＤＮＡチップ（Ａｇｉｌｅｎｔ）にロードしてライブラリのクオリティを確かめ、一方、Ｑｕｂｉｔ高感度ＤＮＡキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で定量化を行った。プールしたライブラリを４ｎＭの終濃度および１２ｐｍｏｌとなるように希釈し、７５ｂｐペアエンドリードでＩｌｌｕｍｉｎａ　Ｍｉｓｅｑを使用してシーケンシングした。

【１２２７】

ＲＮＡライブラリデータ解析

マウスｍｍ９　ＵＣＳＣゲノムおよび既知の遺伝子トランスクリプトーム[13]に基づきＢｏｗｔｉｅ２インデックスを作成し、Ｂｏｗｔｉｅ２を使用してコマンドラインオプション－ｑ　－－ｐｈｒｅｄ３３－ｑｕａｌｓ　－ｎ　２　－ｅ　９９９９９９９９　－ｌ　２５　－Ｉ　１　－Ｘ　１０００　－ａ　－ｍ　２００　－ｐ　４　－－ｃｈｕｎｋｍｂｓ　５１２でペアエンドリードをこのインデックスと直接アラインメントした。次に、Ｂｏｗｔｉｅ２によって作成されたアラインメントに対してＲＳＥＭ　ｖ１．２７をデフォルトパラメータで実行し、発現レベルを推定した。各遺伝子についてＲＳＥＭ遺伝子レベル発現推定値（τ）に１，０００，０００を乗じて転写物百万分率（ＴＰＭ）推定値を求め、ｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）を取ることによりＴＰＭ推定値を対数空間に変換した。遺伝子は、それらの変換された発現レベルが２以上（ｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）目盛で）である場合に検出されたと見なした。８０００個未満の遺伝子が検出された場合にライブラリはフィルタリングで取り除いた。この基準に基づき４個のライブラリがフィルタリングされ、下流分析から除外された。対照動物とＭｅｃｐ２　ｓｇＲＮＡを発現する動物との間

の差次的発現遺伝子を見付けるため、２０回のランダムな順列ランでのスチューデントｔ検定（Ｍａｔｌａｂ　Ｖ２０１３ｂ）およびクロス確認を使用し、ここでは各ランにおいて各動物から１つのライブラリがランダムに選択され、除外された（これにより毎回ｔ検定で使用される合計１２個のライブラリがもたらされた）。各試料について平均発現レベルが０．９分位点より高い（通常約５ｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１））全ての遺伝子に対してｔ検定を実行した。次に、順列ランの３分の１より多くで有意であった（ｐ＜０．０１）遺伝子を選択した。全試料にわたるこれらの遺伝子のｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）発現レベルを、階層クラスタリング（Ｍａｔｌａｂ　Ｖ２０１３ｂ）を使用してクラスタリングした。

【１２２８】

免疫蛍光染色

細胞培養：初代ニューロンの免疫蛍光染色のため、細胞をウイルス送達７日後に４％パラホルムアルデヒド（ｐａｒａｆｏｒｍａｌｄｅｈｙｄ）（ＰＦＡ）によって室温で２０分間固定した。ＰＢＳで３回洗浄した後、細胞をＰＢＳ中５％正常ヤギ血清（ＮＧＳ）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、５％ロバ血清（ＤＳ）（Ｓｉｇｍａ）および０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００（Ｓｉｇｍａ）によって室温で３０分間ブロックした。細胞を一次抗体と共に２．５％ＮＧＳ、２．５％ＤＳおよび０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００中室温で１時間または４℃で一晩インキュベートした。ＰＢＳＴで３回洗浄した後、細胞を二次抗体と共に室温で１時間インキュベートした。最後に、ＤＡＰＩ含有ＶＥＣＴＡＳＨＩＥＬＤ　ＨａｒｄＳｅｔ封入剤（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用してカバーガラスをマウントし、Ｚｅｉｓｓ　ＡｘｉｏＣａｍ　Ａｘ１０顕微鏡およびＡｘｉｏｃａｍ　ＭＲｍカメラを使用してイメージングした。画像をＺｅｎ　２０１２ソフトウェア（Ｚｅｉｓｓ）を使用して処理した。ＩｍａｇｅＪソフトウェア１．４８ｈおよびニューロン検出器プラグインを使用することにより定量化を実施した。

【１２２９】

ウイルス送達の４週間後に、致死量のケタミン／キシラジンによってマウスを犠牲にし、ＰＢＳ、続いてＰＦＡで経心的に灌流した。固定した組織を、ビブラトーム（Ｌｅｉｃａ、ＶＴ１０００Ｓ）を使用して切片化した。次に、３０μｍ切片をクエン酸ナトリウム緩衝液（１０ｍＭクエン酸三ナトリウム脱水物、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０、ｐＨ６．０）中で２分間煮沸し、室温で２０分間冷却した。切片をＴＢＳＴ（１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス　ｐＨ７．６、０．２％Ｔｗｅｅｎ－２０）中の４％正常ヤギ血清（ＮＧＳ）で１時間ブロックした。パラフィン切片をミクロトーム（Ｌｅｉｃａ　ＲＭ２１２５　ＲＴＳ）を使用して８μｍに切り、先に記載のとおり染色した[14]。

【１２３０】

切片を、４％ＮＧＳを含むＴＢＳＴ中に希釈した一次抗体と共に４℃で一晩インキュベートした。ＴＢＳＴ中で３回洗浄した後、試料を二次抗体と共にインキュベートした。ＴＢＳＴで３回洗浄した後、ＤＡＰＩ含有ＶＥＣＴＡＳＨＩＥＬＤ　ＨａｒｄＳｅｔ封入剤を使用して切片をマウントし、共焦点顕微鏡（Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ　７１０、Ａｘ１０　ＩｍａｇｅｒＺ２、Ｚｅｎ　２０１２ソフトウェア）で可視化した。

【１２３１】

以下の一次抗体を使用した：ウサギ抗Ｄｎｍｔ３ａ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、１：１００）；ウサギ抗ＭｅＣＰ２（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、１：２００）；マウス抗ＮｅｕＮ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、１：５０～１：４００）；ニワトリ抗ＧＦＡＰ（Ａｂｃａｍ、１：４００）；マウス抗Ｍａｐ２（Ｓｉｇｍａ、１：５００）；ニワトリ抗ＧＦＰ（Ａｖｅｓ　ｌａｂｓ、１：２００～１：４００）；マウス抗ＨＡ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、１：１００）。二次抗体：ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）４８８、５６８または６３３（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、１：５００～１：１，０００）。

【１２３２】

ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）アッセイの定量化

ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）アッセイ（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を製造者の指示に従い使用して、対照および形質導入初代ニューロンを染色した。ＧＦＰ－

ＫＡＳＨ発現からのＧＦＰシグナルへの干渉を回避するため、ＤＥＡＤ（エチジウムホモ二量体）およびＤＡＰＩ（全ての細胞）のみについて細胞を染色した。染色した細胞を蛍光顕微鏡法を用いてイメージングし、ＩｍａｇｅＪ　１．４８ｈソフトウェアおよびニューロン検出器プラグインを使用してＤＥＡＤ、ＧＦＰおよびＤＡＰＩ陽性細胞をカウントした。

【１２３３】

ウエスタンブロット分析

形質導入初代皮質ニューロン（２４ウェル、ウイルス送達７日後）および形質導入組織試料（ウイルス送達４週間後）を、０．１％ＳＤＳおよびプロテアーゼ阻害薬（Ｒｏｃｈｅ、Ｓｉｇｍａ）を含有する５０μＬの氷冷ＲＩＰＡ緩衝液（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）中に溶解した。細胞溶解物をＢｉｏｒｕｐｔｏｒソニケーター（Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ）で5分間超音波処理し、ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．）を使用してタンパク質濃度を決定した。タンパク質溶解物（ｌｙｓａｔｓ）をＳＤＳ－ＰＡＧＥ試料緩衝液中に溶解し、還元条件下４～１５％トリス－ＨＣｌゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）上で分離し、一次抗体：ウサギ抗Ｄｎｍｔ３ａ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、１：５００）、マウス抗Ｄｎｍｔ１（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、１：８００）、ウサギ抗Ｍｅｃｐ２（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、１：４００）、ウサギ抗チューブリン（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、１：１０，０００）、続いて二次抗マウスおよび抗ウサギ（ｒａｂｂｂｉｔ）ＨＲＰ抗体（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、１：１０，０００）を使用したウエスタンブロッティングによって分析した。ＧＡＰＤＨはウサギＨＲＰ共役抗ＧＡＰＤＨ抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、１：１０，０００）で直接可視化した。チューブリンまたはＧＡＰＤＨをローディング対照として供した。ＩｍａｇｅＬａｂ　４．１ソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）を備えるＣｈｅｍｉＤｏｃ（商標）ＭＰシステムでブロットをイメージングし、ＩｍａｇｅＪソフトウェア１．４８ｈを使用して定量化した。

【１２３４】

遅延文脈的恐怖条件付け（ＤＣＦＣ）

１２週齢Ｃ５７ＢＬ／６Ｎ雄マウスの背側および腹側歯状回への両側性ＳｐＣａｓ９／ＤＮＭＴ　３ｘｓｇＲＮＡ送達の８週間後、動物を実験者および行動実験室に７日間馴化させた。ＳｐＣａｓ９／ＧＦＰ－ＫＡＳＨを注入した同腹仔を対照として供した。ＤＣＦＣの１日目、隔離された控え室にマウスケージを置き、試験前および試験後にマウスに聴覚キューが入ることを防いだ。個々のマウスをＦＣチャンバ（Ｍｅｄ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　Ｉｎｃ．）に置き、１２分間の馴化期間を実施した。馴化後、マウスをそのホームケージに戻した。翌日（訓練日）、個々のマウスをチャンバに入れ、４分間馴化させた。さらに２０秒間の（トーン前）間隔後、トーン（聴覚キュー）を８５ｄＢ、２．８ｋＨｚのレベルで２０秒間提示し、続いて１８秒間の遅延間隔を置いた後、フットショックを提示した（０．５ｍＡ、２秒間）。フットショック後、４０秒間の間隔（トーン／ショック後）を続けた後、次の同じ試行を２０秒間のトーン前期間から開始した。この訓練試行を６回繰り返してからマウスをそのホームケージに戻した。３日目（試験日）、マウスを初めに条件付け文脈チャンバに３分間置いた。次に、マウスは、２０秒間の間隔と、続く２０秒間のトーンおよび６０秒間のトーン後間隔から始まる４×１００秒間の試験試行を受けた。最後に、マウスを文脈を変えた条件付けチャンバ（フラットフロア対グリッド、四分割対七分割チャンバ、バニリン芳香）に入れ、試験試行を繰り返した。フリージング行動を記録し、分析を盲検的にオフラインで手動で実施し、Ｎｏｌｄｕｓ　ＥｔｈｏＶｉｓｉｏｎ　ＸＴソフトウェア（Ｎｏｌｄｕｓ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）で確認した。

【１２３５】

ディープシーケンシングおよびインデル検出

ＣＲＩＳＰＲ設計ツール（ｈｔｔｐ：／／ｃｒｉｓｐｒ．ｍｉｔ．ｅｄｕ／）を使用して、脳においてＣＲＩＳＰＲ－ＳｐＣａｓ９によりターゲティングされるＤＮＭＴファミ

リー遺伝子の潜在的なオフターゲットを見付けた。ウイルス送達の１２週間後に歯状回の標的細胞核をＦＡＣＳ選別し、ゲノムＤＮＡを上記に記載したとおり精製した。目的の遺伝子毎に、ＣＲＩＳＰＲ標的部位に隣接するゲノム領域を融合ＰＣＲ方法によって増幅し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｐ５アダプターならびにユニークな試料特異的バーコードを標的アンプリコンに取り付けた（オンターゲットおよびオフターゲットプライマーについては、補表３を参照のこと）[15]。バーコードを加え、かつ精製したＤＮＡ試料をＱｕｂｉｔ２．０蛍光光度計（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によって定量化し、等モル比でプールした。次にシーケンシングライブラリをＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ　Ｐｅｒｓｏｎａｌシーケンサー（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によってリード長さ３００ｂｐでシーケンシングした。

【１２３６】

ＭｉＳｅｑリードを先に記載のとおり解析した[15]。簡潔に言えば、リードをＰｈｒｅｄクオリティ（Ｑスコア）によってフィルタリングし、スミスーウォーターマンアルゴリズムを用いて標的部位の５０ヌクレオチド上流および下流のゲノム領域とアラインメントした。標的部位の５ヌクレオチド上流から５ヌクレオチド下流まで（合計３０ｂｐ）のアラインメントした領域におけるインデルを推定した。各試料の陰性対照を使用して、インデルが含まれるかまたは含まれないかを推定切断イベントとして推定した。本発明者らは、真のインデルを含む標的領域を有するリードの割合について、陰性対照試料のデータからの標的領域毎リード毎のエラー率を使用して最尤推定量（ＭＬＥ）を計算した。各標的のＭＬＥスコアおよび切断率を補表１に掲載する。

【１２３７】

統計的分析

全ての実験は、最小２つの独立した生物学的レプリケートで行った。統計は、Ｐｒｉｓｍ６（ＧｒａｐｈＰａｄ）でスチューデント両側ｔ検定を用いて実施した。

【１２３８】

【表７８】

補表1. DNMTターゲティングのオフターゲット解析

	遺伝子	GI	*潜在的オフターゲット配列*	MLE (%)	SEM	配列番号
Dnmt1	*Abca1*	NM_013454	GGAGCTGGAGCTGTTCACGTTGG	0.0000	0.00	
	Mctp1	NM_030174	CGGGCAGCAGATGTTCGCGTAGG	0.0806	0.08	
	Exd2	NM_133798	AGGGCTTGAGATGTTCGGGCTGG	0.0612	0.06	
	Pik3r6	NM_001004435	CCGGCTGGGGCTGTCCTCGCTAG	0.0000	0.00	
	Sobp	NM_175407	CGGGGTGCAGCTGCTCACGCCAG	0.0000	0.00	
	Vac14	NM_146216	CTGGCGGGAGCTGGTCGCGTGAG	0.0083	0.00	
Dnmt3a	*Efemp2*	NM_021474	TGAGCATGGGCCGCTGGCGGTGG	0.0050	0.01	
	Bmpr1b	NM_001277217	ATGGCATAGGCCGCTGACAGAGG	0.0117	0.01	
	Syce1	NM_001143765	TTGGCATGGTGAGCTGGCGGGGG	0.0067	0.00	
	Atp8b3	NM_026094	TGGGCAGGGGTCTCTGAGGGCAG	0.0067	0.01	
	Rdh11	NM_021557	TTGGCATGGGTCTCTTACCAAGG	0.0017	0.00	
Dnmt3b	*Hecw2*	NM_001001883	ACATGGTTCCAGTGGGTATGTAG	0.0000	0.00	
	Plekhg3	NM_153804	GGAGGTGGGCAGCGGGTATGTAG	0.0954	0.01	
	Cdc25b	NM_001111075	AGAAGGTCCCCGCGGGCATGGAG	0.2421	0.12	
	Top1mt	NM_028404	GGAGGGAACCAGCCGGTATGGGG	0.0167	0.01	
	Sesn2	NM_144907	AGAGAGTGGCAGTGGGTAAGCAG	0.0000	0.00	
	Ncan	NM_007789	AGAGGTGGCCAGCGGGCAGGAAG	0.0017	0.00	
	Nacad	NM_001081652	TGAGGGGGCCAGCTGGGATGCAG	1.6254	0.76	

【１２３９】

【表７９】

補表2. SURVEYORアッセイで使用したPCRプライマー

遺伝子	フォワードプライマー配列 (5'-3')	配列番号	リバースプライマー配列 (5'-3')	配列番号
Mecp2	GGTCTCATGTGTGGCACTCA		TGTCCAACCTTCAGGCAAGG	
Dnmt3a	ATCCCTCCTCAGAGGGTCAGC		TACCTCATGCACAGCTAGCACC	
Dnmt1	TTCGGGCATAGCATGGTCTTCC		GTTCTATTTCAGAGGGCTGATCCC	
Dnmt3b	GTTCTGAGCCGCACAGTTTGG		GGATAAGAAGGGACAATACAGG	

【１２４０】

【表８０】

補表3. オンターゲットおよびオフターゲットゲノム遺伝子座の増幅に使用したプライマー

遺伝子	フォワードプライマー 配列 (5'-3')	配列 番号	リバースプライマー 配列 (5'-3')	配列 番号
Dnmt1	GCCGGGGTCTC GTTCAGAGCT		CTACCGCCTGCGGA CATGGT	
Dnmt3a	CCTGTCTCTCTGT CCTAGGGCTCC		CCGTTTGCTGATGTAGT A GGGGTCC	
Dnmt3b	CCCACAGGAAA CAATGAAGGGAGAC		CATCCTTCGTGTCT GAGGACTGGTC	
Abca1	CCCTGACACCAGC TGTTCAGCAC		CTCTGGGTGAC CACACACGATGC	
Mctp1	GAGCAGGCAGA GCCGAGCAAG		GGAGAGCGTCC GCCAGGAG	
Exd2	GGGTCTTGTTGTG AGTAGGGTGTG		GAAGCTCTCTTAA CTACTGTTC	
Pik3r6	CCTGGAATACTAT TTCCACGCCG		CAGGCCCTAGCAGCG AGCAG	
Sobp	GCAGCACACTCCA CCCTCACAT		GGAAGGGGCTTTCC TCCGAGC	
Vac14	CGGCGTCACG TGACCTGAGTAAC		GCTCCGACCCTGCT CTCCCA	

【１２４１】

【表８１】

Efemp2	GTGTCTGCCTC GCTCTGCTGC		CCTGTTCATCAGGCTC GTAGCCC	
Bmpr1b	CTATCTGAAATCC ACCACCTTAGACGC		CGATTGCTGGCTTGC CTTGAG	
Syce1	GCCTGAGGGGG CCAGAGGT		GGTTCGCGTCCGCC CGCGTGAT	
Atp8b3	GGGACTCC CCGGGTGGTG		GAGAGGTGGTC CTGTCGCCTATG	
Rdh11	GACCCTGTGTTT CAAGTCTCTCTG		CCCAGCAGGTCACA GCTGACATC	
Hecw2	GGCCATCCAGTAC ATTCAATACG		AGCACAGTATGTATTC TATAAAATAATACGAC	
Plekhg3	GCAGAAGCCGT GACTCACAGCA		GTGGGAGGGGACAG AGACCATG	
Cdc25b	CTTGTGCTTG TGATTCTGTCCTTACT GC		CCTTACCTGTTCCTCT TCCTTATCCAGC	
Top1mt	CGAGAAGTC GATGCAGACACTTCA A		ATACCCAGTCCAC ATCCCTGCC	
Sesn2	GCTGAAGACTGGC GAGCACAGCT		CCTCTGCATCTCCCTCAGGA AGTATT	
Ncan	GACCTGAATGTTG TGGCTGAGAGTCC		GCCTCCTGTC CCCAGGTCCC	
Nacad	CCCTCACGTTCC TGTCCAGCAA		CACTAGGCTT GGGCTGCCCTCT	

【１２４２】

参考文献

1. Ostlund, C. et al. Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins. J Cell Sci 122, 4099-4108 (2009).
2. Gray, S. J. et al. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. Hum Gene Ther 22, 1143-1153 (2011).
3. Levitt, N., Briggs, D., Gil, A. & Proudfoot, N. J. Definition of an efficient synthetic poly(A) site. Genes Dev 3, 1019-1025 (1989

)．
4．Ｊｉｎｅｋ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ａ ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ ｄｕａｌ－ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ＤＮＡ ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ ｉｎ ａｄａｐｔｉｖｅ ｂａｃｔｅｒｉａｌ ｉｍｍｕｎｉｔｙ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３７，８１６－８２１（２０１２）．
5．Ｃｏｎｇ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３９，８１９－８２３（２０１３）．
6．ＭｃＣｌｕｒｅ，Ｃ．，Ｃｏｌｅ，Ｋ．Ｌ．，Ｗｕｌｆｆ，Ｐ．，Ｋｌｕｇｍａｎｎ，Ｍ．＆ Ｍｕｒｒａｙ，Ａ．Ｊ．Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｔｉｔｅｒｉｎｇ ｏｆ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒｓ．Ｊ Ｖｉｓ Ｅｘｐ，ｅ３３４８（２０１１）．
7．Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｏｐｔｉｃａｌ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ ｓｔａｔｅｓ．Ｎａｔｕｒｅ ５００，４７２－４７６（２０１３）．
8．Ｂａｎｋｅｒ，Ｇ．＆ Ｇｏｓｌｉｎ，Ｋ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ ｎｅｕｒｏｎａｌ ｃｅｌｌ ｃｕｌｔｕｒｅ．Ｎａｔｕｒｅ ３３６，１８５－１８６（１９８８）．
9．Ｓｗｉｅｃｈ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．ＣＬＩＰ－１７０ ａｎｄ ＩＱＧＡＰ１ ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅｌｙ ｒｅｇｕｌａｔｅ ｄｅｎｄｒｉｔｅ ｍｏｒｐｈｏｌｏｇｙ．Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ ３１，４５５５－４５６８（２０１１）．
10．Ｓｈｏｌｌ，Ｄ．Ａ．Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ ｎｅｕｒｏｎｓ ｏｆ ｔｈｅ ｖｉｓｕａｌ ａｎｄ ｍｏｔｏｒ ｃｏｒｔｉｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ ｃａｔ．Ｊ Ａｎａｔ ８７，３８７－４０６（１９５３）．
11．Ｒａｎ，Ｆ．Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｓｙｓｔｅｍ．Ｎａｔｕｒｅ ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ８，２２８１－２３０８（２０１３）．
12．Ｐｉｃｅｌｌｉ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｓｍａｒｔ－ｓｅｑ２ ｆｏｒ ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ ｆｕｌｌ－ｌｅｎｇｔｈ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ｉｎ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔｕｒｅ ｍｅｔｈｏｄｓ １０，１０９６－１０９８（２０１３）．
13．Ｆｕｊｉｔａ，Ｐ．Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ ＵＣＳＣ Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｒｏｗｓｅｒ ｄａｔａｂａｓｅ：ｕｐｄａｔｅ ２０１１．Ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄｓ ｒｅｓｅａｒｃｈ ３９，Ｄ８７６－８８２（２０１１）．
14．Ｔｚｉｎｇｏｕｎｉｓ，Ａ．Ｖ．ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ ＫＣＮＱ５ ｐｏｔａｓｓｉｕｍ ｃｈａｎｎｅｌ ｍｅｄｉａｔｅｓ ａ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ ｏｆ ｔｈｅ ａｆｔｅｒｈｙｐｅｒｐｏｌａｒｉｚａｔｉｏｎ ｃｕｒｒｅｎｔ ｉｎ ｍｏｕｓｅ ｈｉｐｐｏｃａｍｐｕｓ．Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ １０７，１０２３２－１０２３７（２０１０）．
15．Ｈｓｕ，Ｐ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．ＤＮＡ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｏｆ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ Ｃａｓ９ ｎｕｃｌｅａｓｅｓ．Ｎａｔｕｒｅ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３１，８２７－８３２（２０１３）．
16．Ｑｉｕ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．Ｍｕｔａｔｉｏｎ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ Ｓｕｒｖｅｙｏｒ ｎｕｃｌｅａｓｅ．ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ３６，７０２－７０７（２００４）．

【１２４３】

実施例４０：核タグ標識技法のさらなる研究

この実施例３８は、Ｃａｓ９のエピトープタグ標識に関する。端的には、本発明者らは

、三重エピトープタグ（具体的には３ｘＨＡ）が検出シグナルを改善することを見出した。

【１２４４】

材料および方法

細胞培養および形質移入

ヒト胎児腎臓（ＨＥＫ）細胞系２９３ＦＴ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）またはマウスＨｅｐａ１－６（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）細胞系を、１０％ウシ胎仔血清（ＨｙＣｌｏｎｅ）、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１００Ｕ／ｍＬペニシリン、および１００μｇ／ｍＬストレプトマイシンを補足したダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）に３７℃で５％CO_2インキュベーションによって維持した。

【１２４５】

細胞を２４ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）に１２０，０００細胞／ウェルの密度で播種し、２４時間後に形質移入した。細胞は、８０～９０％コンフルエンシーでＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して製造者の推奨プロトコルに従い形質移入した。合計５００ｎｇのＣａｓ９プラスミドおよび１００ｎｇのＵ６－ｓｇＲＮＡ　ＰＣＲ産物が形質移入された。

【１２４６】

ゲノム改変のためのＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ

２９３ＦＴおよびＨＵＥＳ６２細胞に、上記に記載したとおりのＤＮＡを形質移入した。細胞を形質移入後７２時間にわたり３７℃でインキュベートした後、ゲノムＤＮＡを抽出した。ゲノムＤＮＡはＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ　ＤＮＡ抽出溶液（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）を使用して、製造者のプロトコルに従い抽出した。簡潔に言えば、ペレット化した細胞をＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ溶液に再懸濁し、６５℃で１５分間、６８℃で１５分間、および９８℃で１０分間インキュベートした。

【１２４７】

各遺伝子についてＣＲＩＳＰＲ標的部位に隣接するゲノム領域をＰＣＲ増幅し、産物をＱｉａＱｕｉｃｋスピンカラム（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して製造者のプロトコルに従い精製した。合計４００ｎｇの精製ＰＣＲ産物を２マイクロリットルの１０×Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼＰＣＲ緩衝液（Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ）および超純水と混合して最終容積を２０マイクロリットルとし、リアニーリングプロセスに供してヘテロ二本鎖の形成を可能にした：９５℃で１０分、－２℃／秒で９５℃～８５℃のランピング、－０．２５℃／秒で８５℃～２５℃、および２５℃で１分間保持。リアニーリング後、産物をＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼおよびＳＵＲＶＥＹＯＲエンハンサーＳ（Ｔｒａｎｓｇｅｎｏｍｉｃｓ）で製造者の推奨するプロトコルに従い処理し、４～２０％Ｎｏｖｅｘ　ＴＢＥポリアクリルアミドゲル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）上で分析した。ゲルをＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ　ＤＮＡ染料（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で３０分間染色し、Ｇｅｌ　Ｄｏｃゲルイメージングシステム（Ｂｉｏ－ｒａｄ）で撮像した。定量化は相対バンド強度に基づいた。インデル率を、式$100\times(1-(1-(b+c)/(a+b+c))^{1/2})$（式中、ａは未消化ＰＣＲ産物の積分強度であり、ｂおよびｃは各開裂産物の積分強度である）によって決定した。

【１２４８】

ウエスタンブロット

ＨＥＫ　２９３ＦＴ細胞を形質移入し、プロテアーゼ阻害薬（Ｒｏｃｈｅ）を補足した１×ＲＩＰＡ緩衝液（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）中に溶解した。この溶解物をＢｏｌｔ　４－１２％ビス－トリスＰｌｕｓゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にロードし、ニトロセルロース膜に移した。膜を、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０および５％ブロッキング剤（Ｇ－Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を含有するトリス緩衝生理食塩水でブロックした。膜をウサギ抗ＦＬＡＧ（１：５，０００、Ａｂｃａｍ）、ＨＲＰ共役抗ＧＡＰＤＨ（１：５，０００　Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、およびＨＲＰ共役抗ウサ

ギ（１：１，０００）抗体でプローブし、Ｇｅｌ　Ｄｏｃ　ＸＲ＋システム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）で可視化した。

【１２４９】

参考文献

R. E. Amir et al., Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. Nature genetics 23, 185 (Oct, 1999).

Banker G, Goslin K. Developments in neuronal cell culture. Nature. 1988 Nov 10;336(6195):185-6.

Bedell, V. M. et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. Nature 491, 114-U133 (2012).

Bhaya, D., Davison, M. & Barrangou, R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. Annu Rev Genet 45, 273-297 (2011).

Bobis-Wozowicz, S., Osiak, A., Rahman, S. H. & Cathomen, T. Targeted genome editing in pluripotent stem cells using zinc-finger nucleases. Methods 53, 339-346 (2011).

Boch, J. et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science 326, 1509-1512 (2009).

Bogenhagen, D. F. & Brown, D. D. Nucleotide sequences in Xenopus 5S DNA required for transcription termination. Cell 24, 261-270 (1981).

Bultmann, S. et al. Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. Nucleic Acids Res 40, 5368-5377 (2012).

C. Burger, K. Nash, R. J. Mandel, Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system. Human gene therapy 16, 781 (Jul, 2005).

Carlson, D. F. et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 17382-17387 (2012).

M. Chahrour, H. Y. Zoghbi, The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. Neuron 56, 422 (Nov 8, 2007).

Chen, F. Q. et al. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. Nat Methods 8, 753-U796 (2011).

R. Z. Chen, S. Akbarian, M. Tudor, R. Jaenisch, D

eficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. Nature genetics 27, 327 (Mar, 2001).
Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M. & Kim, J. S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat Biotechnol 31, 230-232 (2013).
Christian, M. et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics 186, 757-761 (2010).
Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR-Cas systems. Science 339, 819-823 (2013).
Deltcheva, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature 471, 602-607 (2011).
Deveau, H., Garneau, J. E. & Moineau, S. CRISPR-Cas system and its role in phage-bacteria interactions. Annu Rev Microbiol 64, 475-493 (2010).
Ding, Q. et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. Cell Stem Cell 12, 238-251 (2013).
J. Feng et al., Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. Nature neuroscience 13, 423 (Apr, 2010).
Y. Fu et al., High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nature biotechnology 31, 822 (Sep, 2013).
Garneau, J. E. et al. The CRISPR-Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature 468, 67-71 (2010).
Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 109, E2579-2586 (2012).
Geurts, A. M. et al. Knockout Rats via Embryo Microinjection of Zinc-Finger Nucleases. Science 325, 433-433 (2009).
Gray SJ, Foti SB, Schwartz JW, Bachaboina L, Taylor-Blake B, Coleman J, Ehlers MD, Zylka MJ, McCown TJ, Samulski RJ. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system usi

ng self-complementary vectors. Hum Gene Ther. 2011 Sep;22(9):1143-53. doi:10.1089/hum.2010.245.
Guschin, D. Y. et al. A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. Methods Mol Biol 649, 247-256 (2010).
Hasty, P., Rivera-Perez, J. & Bradley, A. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. Mol Cell Biol 11, 5586-5591 (1991).
Horvath, P. & Barrangou, R. CRISPR-Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science 327, 167-170 (2010).
P. D. Hsu et al., DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature biotechnology 31, 827 (Sep, 2013).
Hsu, P. D. & Zhang, F. Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies. ACS Chem Neurosci 3, 603-610 (2012).
Hwang, W. Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol 31, 227-229 (2013).
Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nat Biotechnol 31, 233-239 (2013).
Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337, 816-821 (2012).
Jinek, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife 2, e00471 (2013).
Kaplitt, M. G., et al., Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. Lancet. 2007 Jun 23;369(9579):2097-105.
S. Konermann et al., Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. Nature 500, 472 (Aug 22, 2013).
Levitt N. Briggs D. Gil A. Proudfoot N. J. Definition of an efficient synthetic poly(A) site. Genes Dev. 1989;3:1019-1025.
Y. Li et al., Global transcriptional and translational repression in human-embryonic-stem-cell-derived Rett syndrome neurons. Cell stem cell 13, 446 (Oct 3, 2013).
Liu D, Fischer I. Two alternative promoter

s direct neuron-specific expression of the rat microtubule-associated protein 1B gene. J Neurosci. 1996 Aug 15;16(16):5026-36.
Lopes, V. S., etc al., Retinal gene therapy with a large MYO7A cDNA using adeno-associated virus. Gene Ther, 2013 Jan 24. doi:10.1038/gt 2013.3. [Epub ahead of print]
Mahfouz, M. M. et al. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 2623-2628 (2011).
Makarova, K. S. et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol 9, 467-477 (2011).
Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339, 823-826 (2013).
S. A. McCarroll, S. E. Hyman, Progress in the genetics of polygenic brain disorders: significant new challenges for neurobiology. Neuron 80, 578 (Oct 30, 2013).
McClure C, Cole KL, Wulff P, Klugmann M, Murray AJ. Production and titering of recombinant adeno-associated viral vectors. J Vis Exp. 2011 Nov 27;(57):e3348. doi:10.3791/3348.
Michaelis, L. M., Maud "Die kinetik der invertinwirkung. ". Biochem. z (1913).
Miller, J. C. et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. Nat Biotechnol 25, 778-785 (2007).
Miller, J. C. et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat Biotechnol 29, 143-148 (2011).
Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 326, 1501 (2009). Porteus, M. H. & Baltimore, D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. Science 300, 763 (2003).
Mussolino, C. et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. Nucleic acids research 39, 9283-9293 (2011).
Nathwani, A. C., et al., Adenovirus-associat

ed virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. N Engl J Med. 2011 Dec 22; 365(25):2357-65. doi:10.1056/NEJMoa1108046. Epub 2011 Dec 10.
M. V. Nguyen et al., MeCP2 is critical for maintaining mature neuronal networks and global brain anatomy during late stages of postnatal brain development and in the mature adult brain. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 32, 10021 (Jul 18, 2012).
Oliveira, T. Y. et al. Translocation capture sequencing: a method for high throughput mapping of chromosomal rearrangements. J Immunol Methods 375, 176-181 (2012).
C. Ostlund et al., Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins. Journal of cell science 122, 4099 (Nov 15, 2009).
Perez, E. E. et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4 (+) T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol 26, 808-816 (2008).
Qi, L. S. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell 152, 1173-1183 (2013).
F. A. Ran et al., Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature protocols 8, 2281 (Nov, 2013).
REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991)
Reyon, D. et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nat Biotechnol 30, 460-465 (2012).
Saleh-Gohari, N. & Helleday, T. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. Nucleic Acids Res 32, 3683-3688 (2004).
Sander, J. D. et al. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). Nat Methods 8, 67-69 (2011).
Sanjana, N. E. et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. Nat Protoc 7, 171-192 (2012).
Sapranauskas, R. et al. The Streptococcus t

hermophilus CRISPR-Cas system provides immunity in Escherichia coli. Nucleic Acids Res 39, 9275-9282 (2011).
M. Shahbazian et al., Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. Neuron 35, 243 (Jul 18, 2002).
Shen, B. et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. Cell Res 23, 720-723 (2013).
D. A. Sholl, Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. Journal of anatomy 87, 387 (Oct, 1953).
Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A. & Kucherlapati, R. S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. Nature 317, 230-234 (1985).
Soldner, F. et al. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. Cell 146, 318-331 (2011).
L. Swiech et al., CLIP-170 and IQGAP1 cooperatively regulate dendrite morphology. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 31, 4555 (Mar 23, 2011).
Takasu, Y. et al. Targeted mutagenesis in the silkworm Bombyx mori using zinc finger nuclease mRNA injection. Insect Biochem Molec 40, 759-765 (2010).
Tangri S, et al., Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity, J Immunol. 2005 Mar 15;174(6):3187-96.
Thomas, K. R., Folger, K. R. & Capecchi, M. R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. Cell 44, 419-428 (1986).
Tuschl, T. Expanding small RNA interference. Nat Biotechnol 20, 446-448 (2002).
A. V. Tzingounis et al., The KCNQ5 potassium channel mediates a component of the afterhyperpolarization current in mouse hippocampus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 10232 (Jun 1, 2010).
Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. & Gregory, P. D. Genome editing with en

gineered zinc finger nucleases. Nat Rev Genet 11, 636-646 (2010).
Valton, J. et al. Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. J Biol Chem 287, 38427-38432 (2012).
Wang, H. et al. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR-Cas-Mediated Genome Engineering. Cell 153, 910-918 (2013).
Watanabe, T. et al. Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. Nat Commun 3 (2012).
Wilson, E. B. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. J Am Stat Assoc 22, 209-212 (1927).
Wood, A. J. et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. Science 333, 307 (2011).
Wu, S., Ying, G. X., Wu, Q. & Capecchi, M. R. A protocol for constructing gene targeting vectors: generating knockout mice for the cadherin family and beyond. Nat Protoc 3, 1056-1076 (2008).
Z. Wu, H. Yang, P. Colosi, Effect of genome size on AAV vector packaging. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 18, 80 (Jan, 2010).
Zhang, F. et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. Nat Biotechnol 29, 149-153 (2011).
Z. Zhou et al., Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. Neuron 52, 255 (Oct 19, 2006).

【1250】

本発明の好ましい実施形態を本明細書に図示および記載したが、当業者には、かかる実施形態が単に例として提供されることは明らかであろう。ここで多数の変形例、変更例、および代替例が、当業者には本発明から逸脱することなく想起されるであろう。本明細書に記載される発明の実施形態の様々な代替例を本発明の実施に用い得ることが理解されなければならない。

【図１】

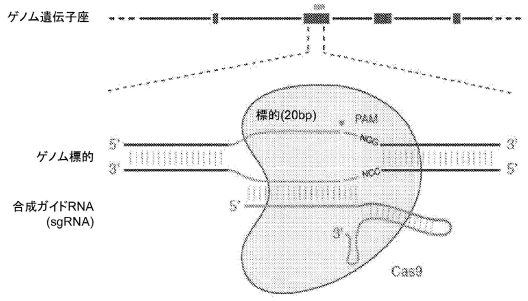


図1

【図２Ａ】

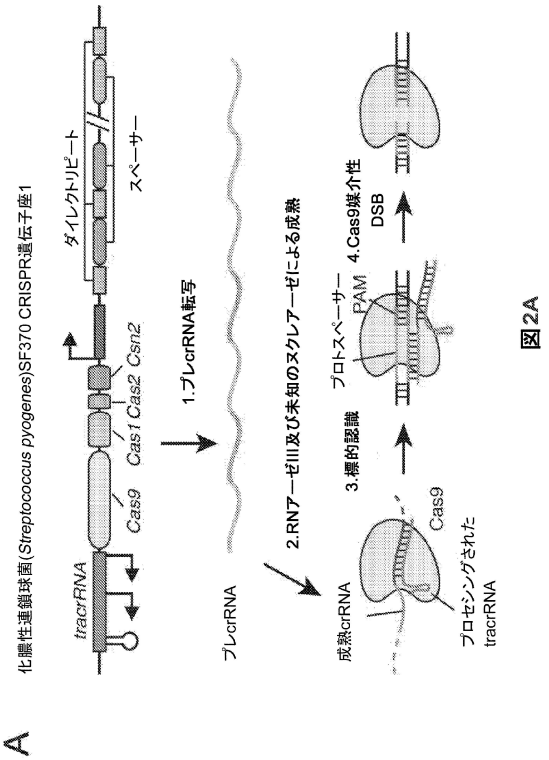


図2A

【図２Ｂ】

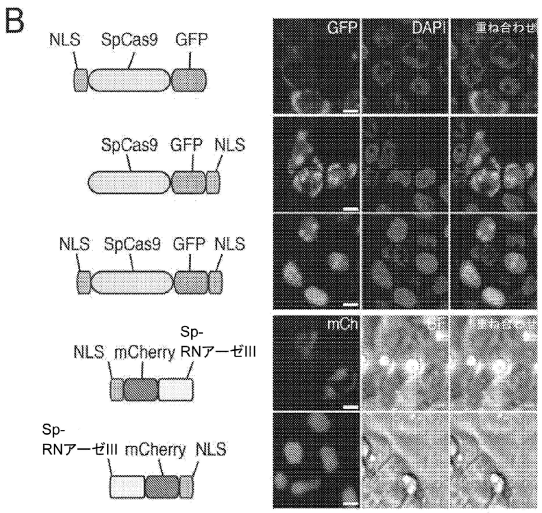


図2B

【図２Ｃ】

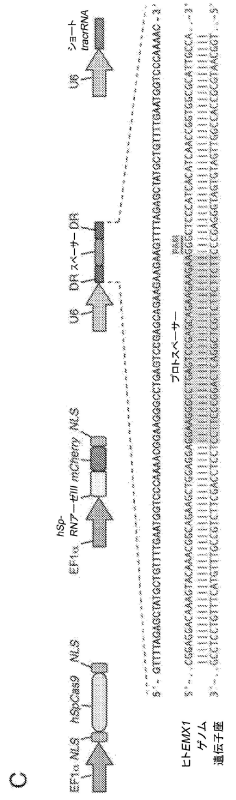


図2C

【図２Ｄ】

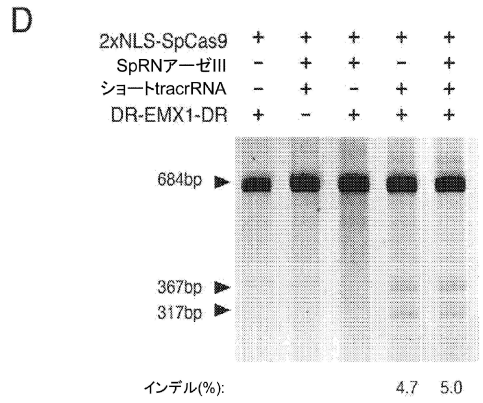


図2D

【図２Ｅ－Ｆ】

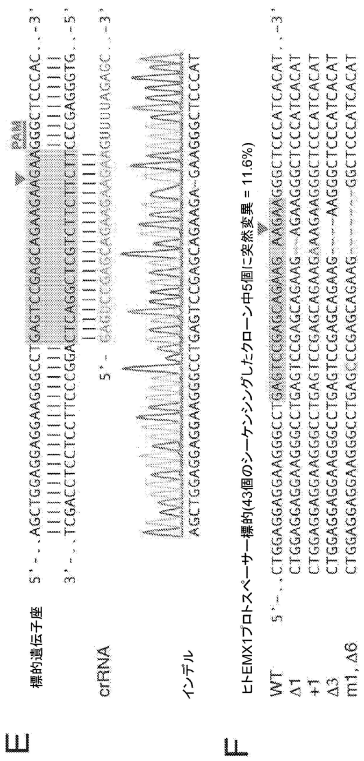


図2E-F

【図３Ａ－Ｃ】

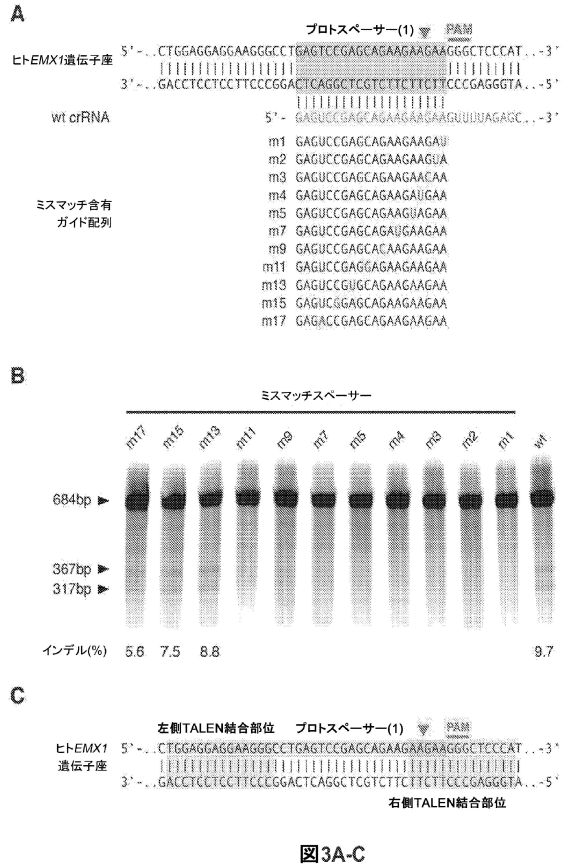


図3A-C

【図３Ｄ】

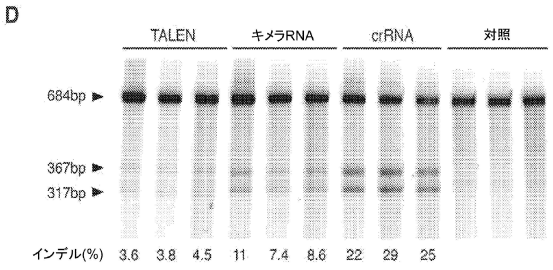


図3D

【図４Ａ－Ｂ】

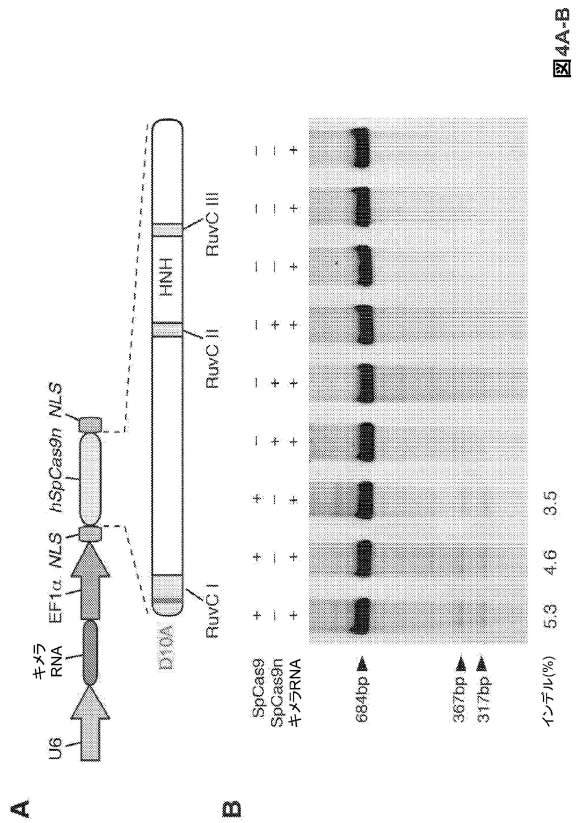


図4A-B

【図４Ｃ－Ｅ】

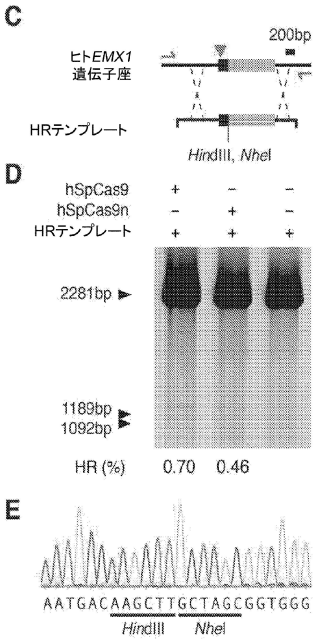


図4C-E

【図４Ｆ】

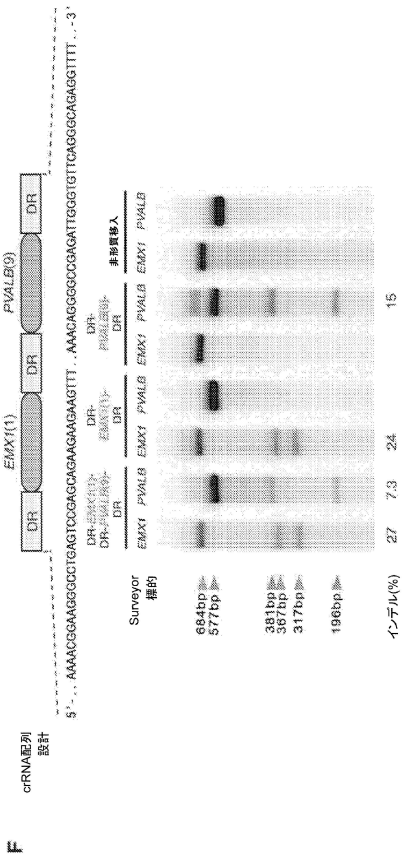


図4F

【図４Ｇ】

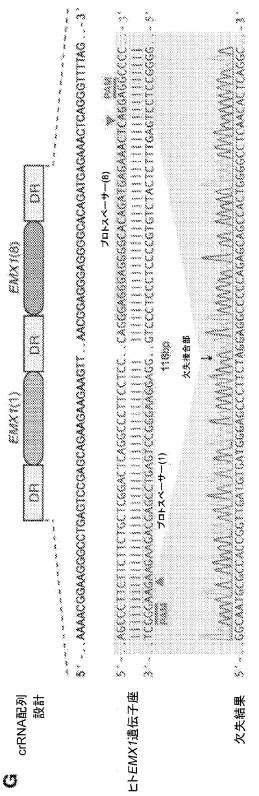


図4G

【図５】

Cas9	標的種	遺伝子	プロトスペーサーID	プロトスペーサー配列(5'から3')	PAM	鎖	被験細胞系	%インデル (プレcrRNA+tracrRNA)	%インデル (キメラRNA)
化膿性連鎖球菌 (*S.pyogenes*) SF370II型 CRISPR	ヒト(*Homo sapiens*)	*EMX1*	1	GGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GGG	+	293FT	20 ± 1.8	6.7 ± 0.82
		EMX1	2	CATTGGAGGTGACATCGATGTCCTCCCCAT	TGG	−	293FT	2.1 ± 0.31	N.D.
		EMX1	3	GGACATCGATGTCACCTCCAATGACTAGGG	TGG	+	293FT	14 ± 1.1	N.D.
		EMX1	4	CATCGATGTCACCTCCCATTGGCCTGCTTCG	TGG	−	293FT	11 ± 1.7	N.D.
		EMX1	5	TTCGTGGCAATGCGCCACCGGTTGATGTGA	TGG	−	293FT	4.3 ± 0.48	2.1 ± 0.51
		EMX1	6	TGTGTGGCAATGCGCCACCGGTTGATGTGAT	GGG	−	293FT	4.0 ± 0.88	0.41 ± 0.25
		EMX1	7	TCCAGCTTCTGCCGTTTGTACTTTGTCCTC	CGG	−	293FT	1.5 ± 0.12	N.D.
		EMX1	8	GGAGGGAGGGCACAGATGAGAAACTCAGG	AGG	−	293FT	7.8 ± 0.83	2.3 ± 1.2
	ヒト(*Homo sapiens*) CRISPR	*PVALB*	9	AGGGCCCAGAATTGGCTGTCAGGGCAGAG	AGG	+	293FT	21 ± 2.6	6.5 ± 0.32
		PVALB	10	ATGCAGGAGGGTGGCGAGAGGGGCCGAGAT	TGG	+	293FT	N.D.	N.D.
		PVALB	11	GGTGCCGAGAGGGCGCCGAGATTGGGTGTTC	AGG	+	293FT	N.D.	N.D.
	マウス (*Mus musculus*)	*Th*	12	CAAGCACTGAGTGCCATTAGCTAAATGCAT	AGG	−	Neuro2A	27 ± 4.3	4.1 ± 2.2
		Th	13	AATGCATAGGGTACCACCCACAGGTGCCAG	GGG	−	Neuro2A	4.8 ± 1.2	N.D.
		Th	14	ACACACATTGGGAAAGCCCTCTGGCCAGGAA	AGG	+	Neuro2A	11.3 ± 1.3	N.D.
S.サーモフィルス (*S.thermophilus*) LMD-9CRISPR1	ヒト(*Homo sapiens*)	*EMX1*	15	GCAGGAGGTAGTATACAGAAACACAGAGAA	GTAGAAT	−	293FT	14 ± 0.88	N.T.
		EMX1	16	AGAATGTAGAGGAGTCACAGAAACTCAGCA	CTAGAAA	−	293FT	7.8 ± 0.77	N.T.

図5

【図６Ａ－Ｂ】

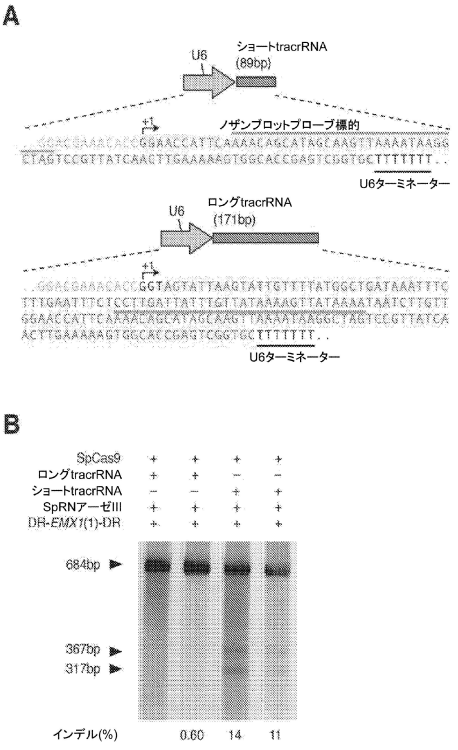


図6A-B

【図６Ｃ】

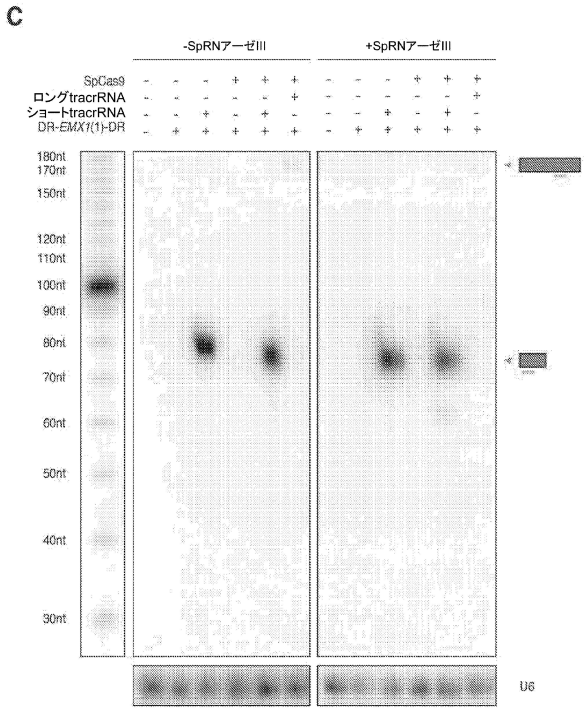


図6C

【図７】

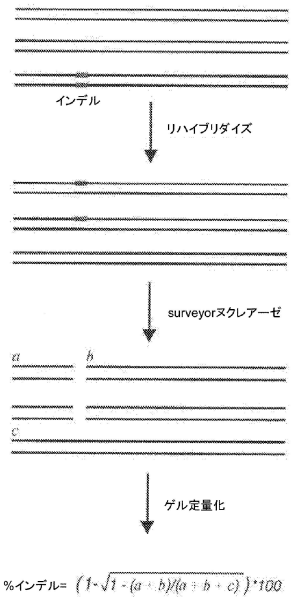


図7

【図８Ａ－Ｂ】

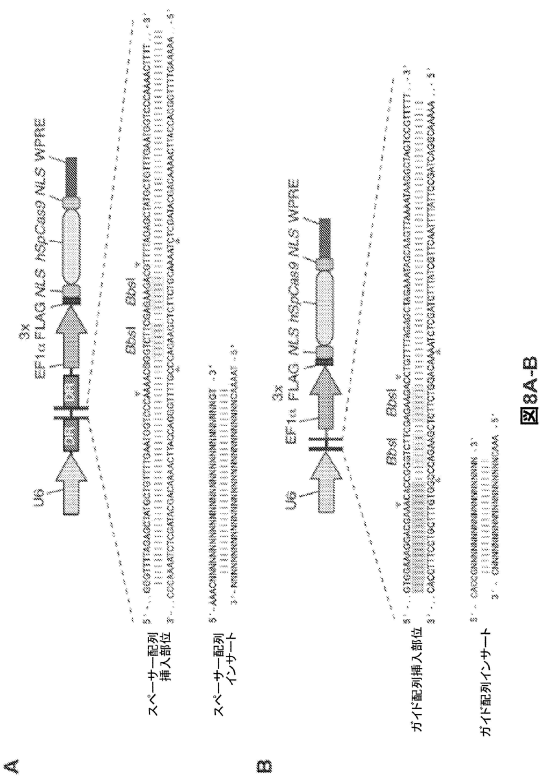


図8A-B

【図９Ａ－Ｃ】

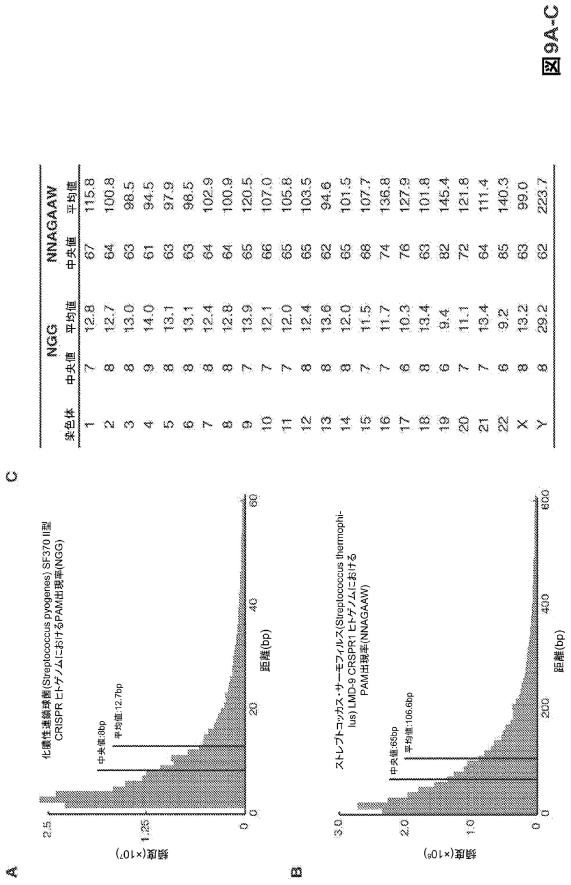


図9A-C

【図１０Ａ－Ｃ】

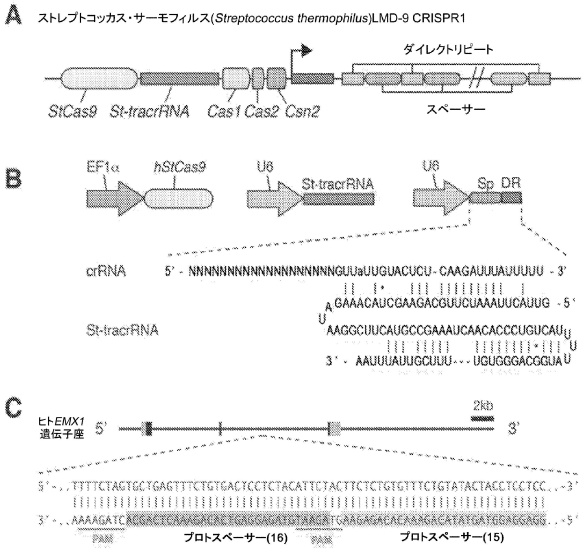


図10A-C

【図１０Ｄ】

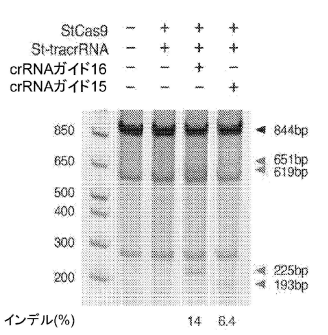


図10D

【図１１Ａ－Ｃ】

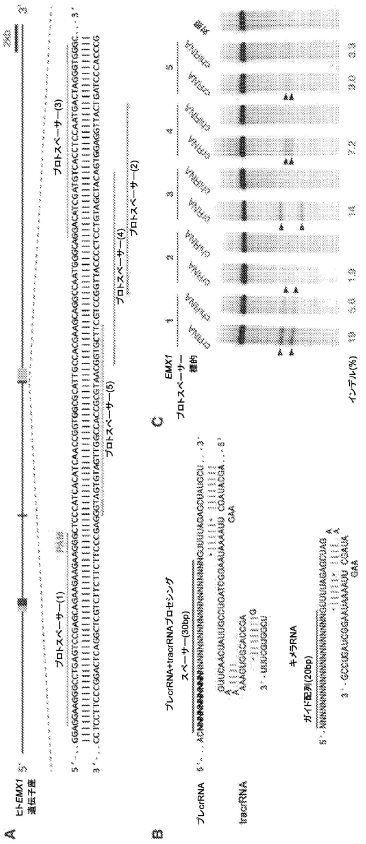


図11A-C

【図１２Ａ－Ｂ】

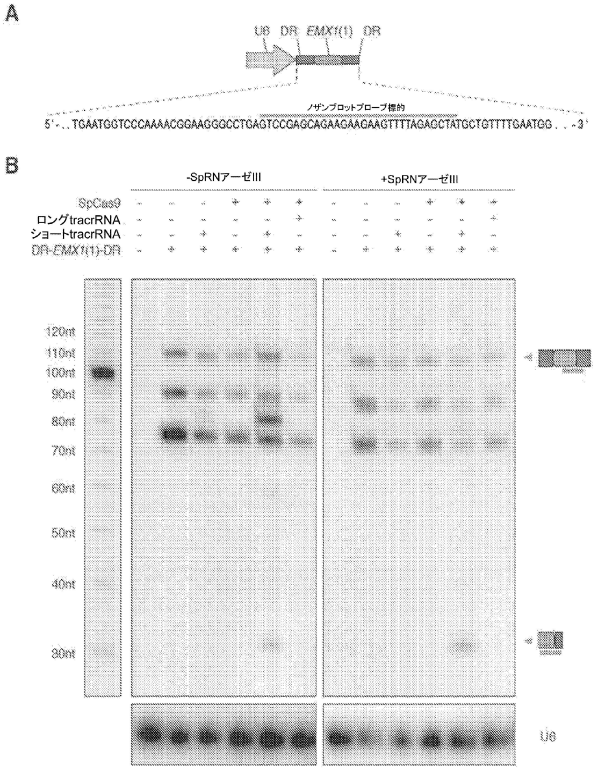


図12A-B

【図１３Ａ－Ｂ】

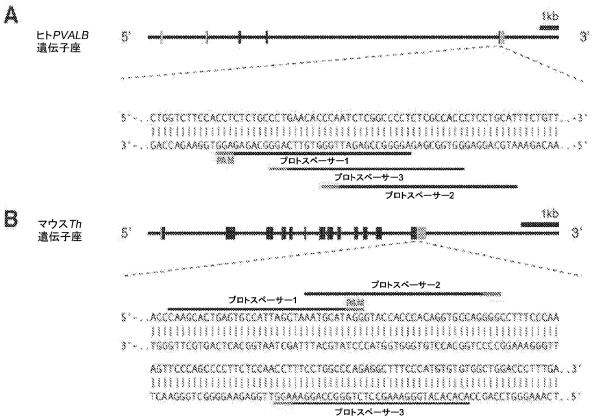


図13A-B

【図１４】

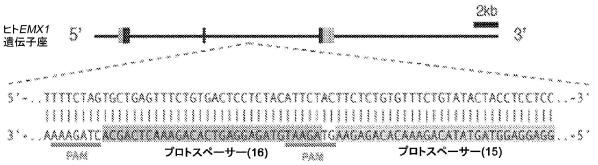


図14

【図１５】

プライマー名	アッセイ	ゲノム標的	プライマー配列
Sp-EMX1-F	SURVEYOR アッセイ、シーケンシング	*EMX1*	AAAACCACCCTTCTCTCTGGC
Sp-EMX1-R	SURVEYOR アッセイ、シーケンシング	*EMX1*	GGAGATTGGAGACACGGAGAG
Sp-PVALB-F	SURVEYOR アッセイ、シーケンシング	*PVALB*	CTGGAAAGCCAATGCCTGAC
Sp-PVALB-R	SURVEYOR アッセイ、シーケンシング	*PVALB*	GGCAGCAAACTCCTTGTCCT
Sp-Th-F	SURVEYOR アッセイ、シーケンシング	*Th*	GTGCTTTGCAGAGGCCTACC
Sp-Th-R	SURVEYOR アッセイ、シーケンシング	*Th*	CCTGGAGCGCATGCAGTAGT
St-EMX1-F	SURVEYOR アッセイ、シーケンシング	*EMX1*	ACCTTCTGTGTTTCCACCATTC
St-EMX1-R	SURVEYOR アッセイ、シーケンシング	*EMX1*	TTGGGGAGTGCACAGACTTC
Sp-EMX1-RFLP-F	RFLP, シーケンシング	*EMX1*	GGCTCCCTGGGTTCAAAGTA
Sp-EMX1-RFLP-R	RFLP, シーケンシング	*EMX1*	AGAGGGGTCTGGATGTCGTAA
Pb_EMX1_sp1	ノザンブロット プローブ	該当せず	TAGCTCTAAAACTTCTTCTTCTGCTCGGAC
Pb_tracrRNA	ノザンブロット プローブ	適用せず	CTAGCCTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTT

図15

【図１６Ａ】

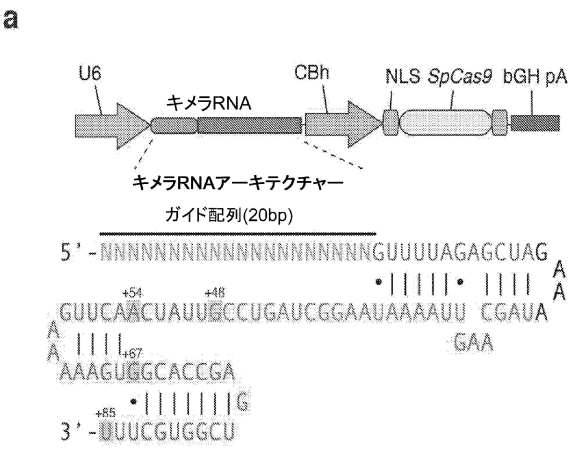


図16A

【図１６Ｂ】

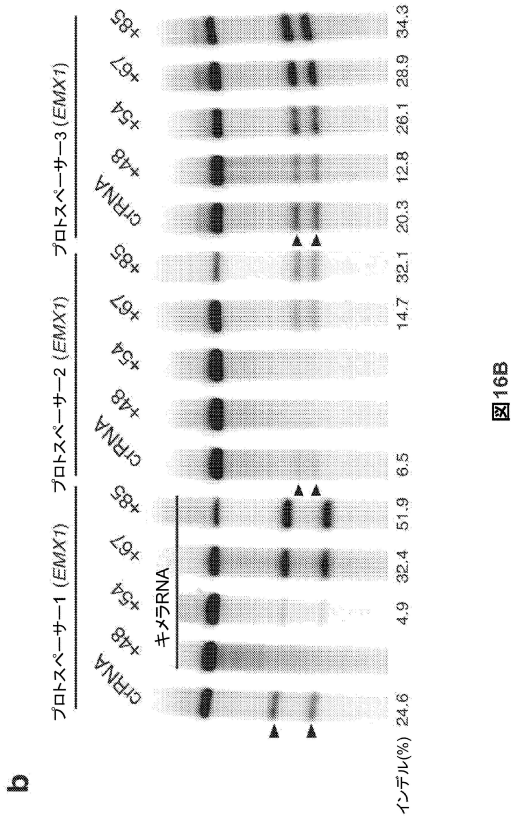


図16B

【図１６Ｃ】

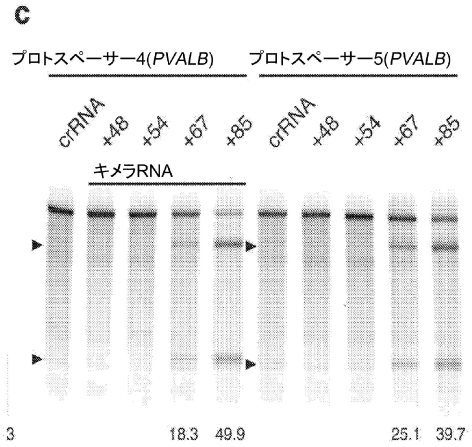


図16C

【図１７Ａ－Ｂ】

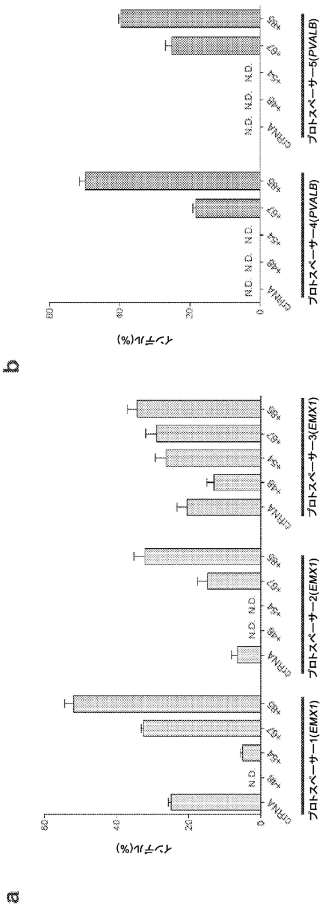


図17A-B

【図１８】

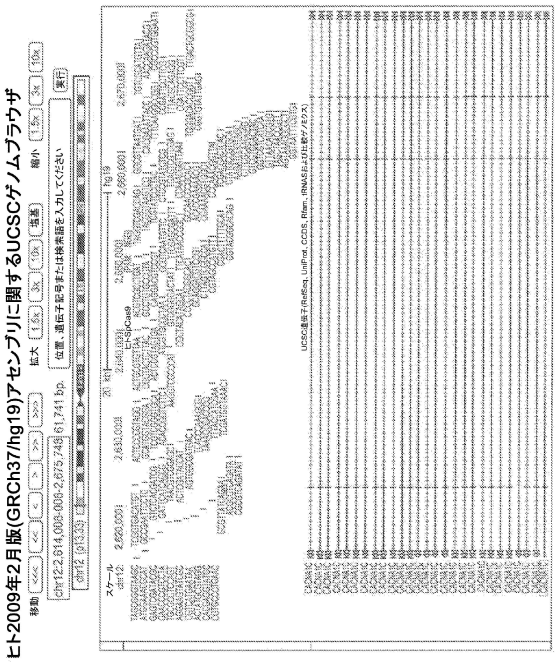


図18

【図１９Ａ】

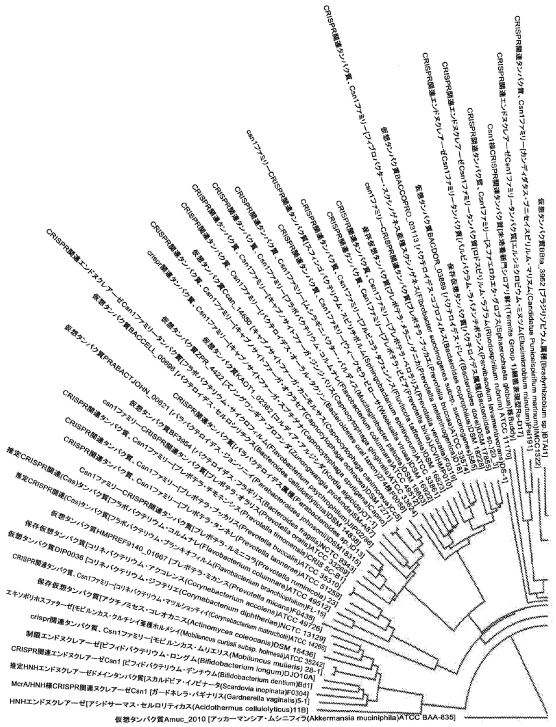


図19A

【図１９Ｂ】

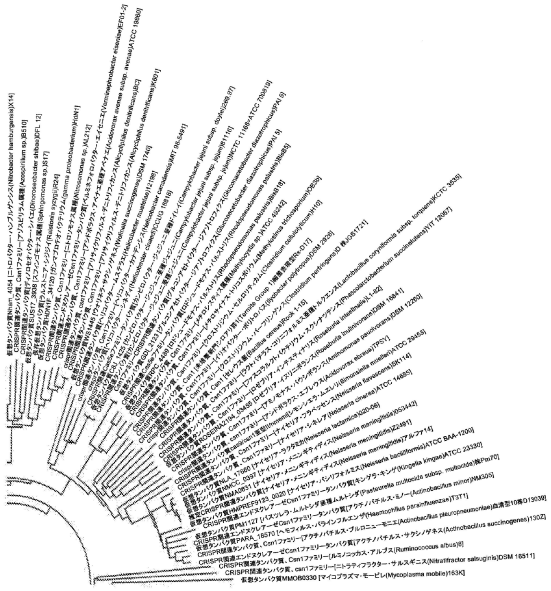


図19B

【図１９Ｃ】

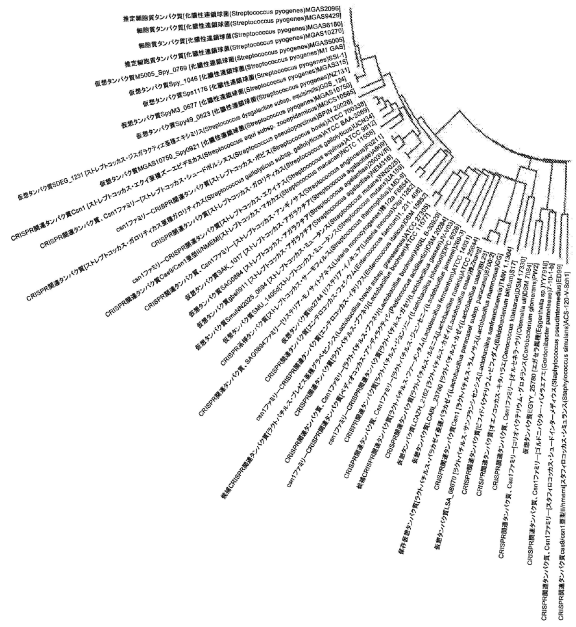


図19C

【図１９Ｄ】

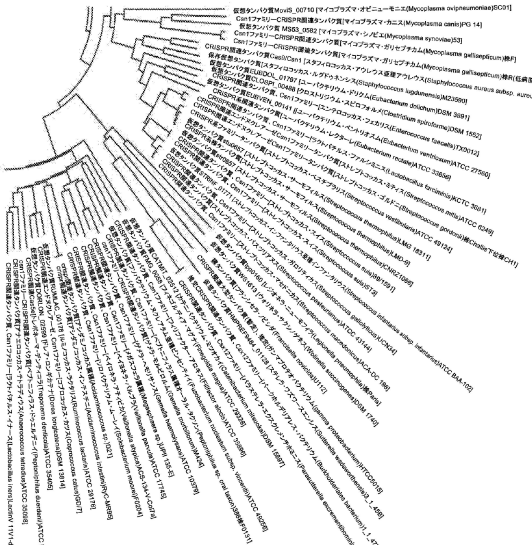


図19D

【図２０Ａ】

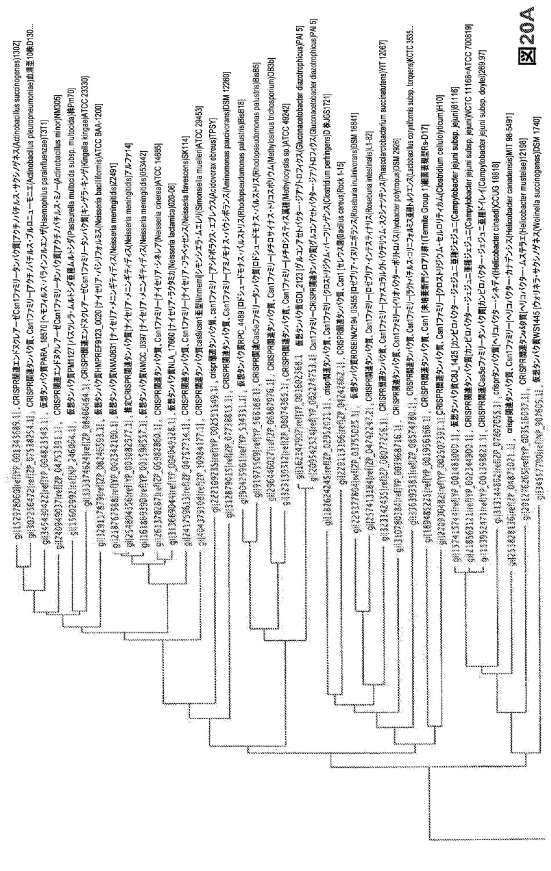


図20A

【図２０Ｂ】

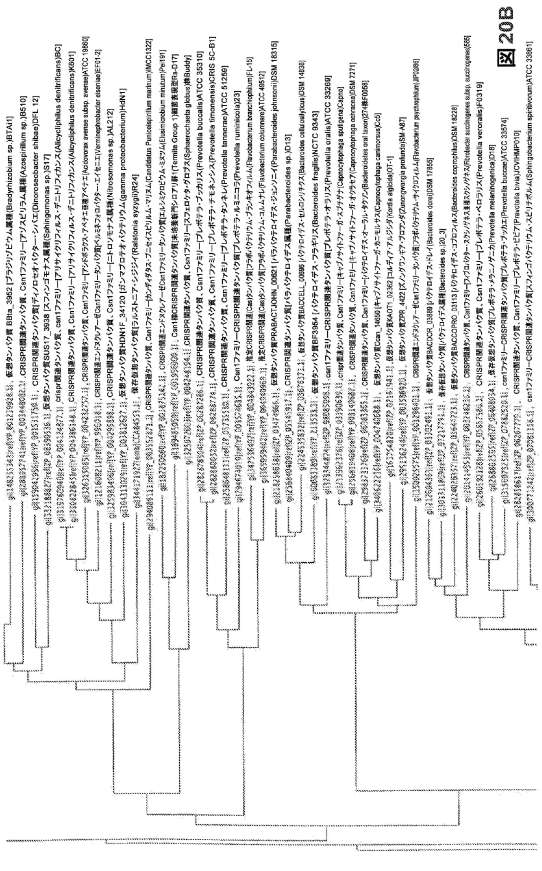


図20B

【図２０Ｃ】

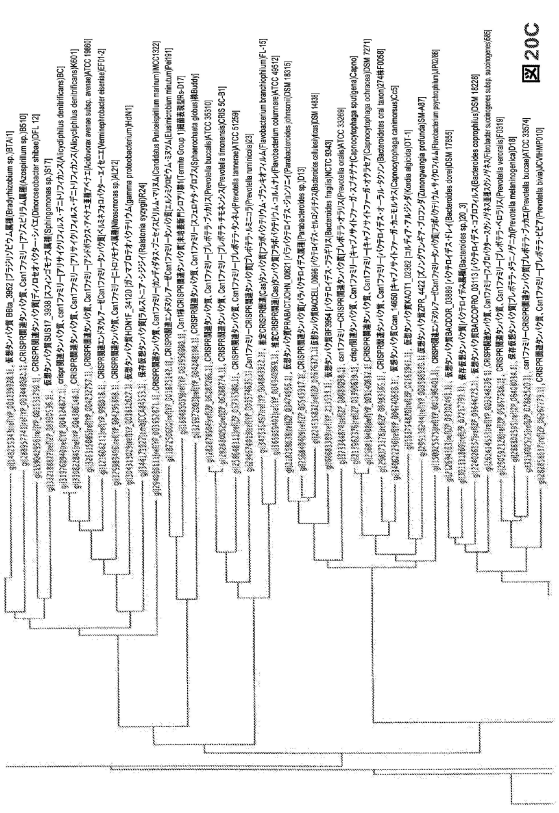


図 20C

【図２０Ｄ】

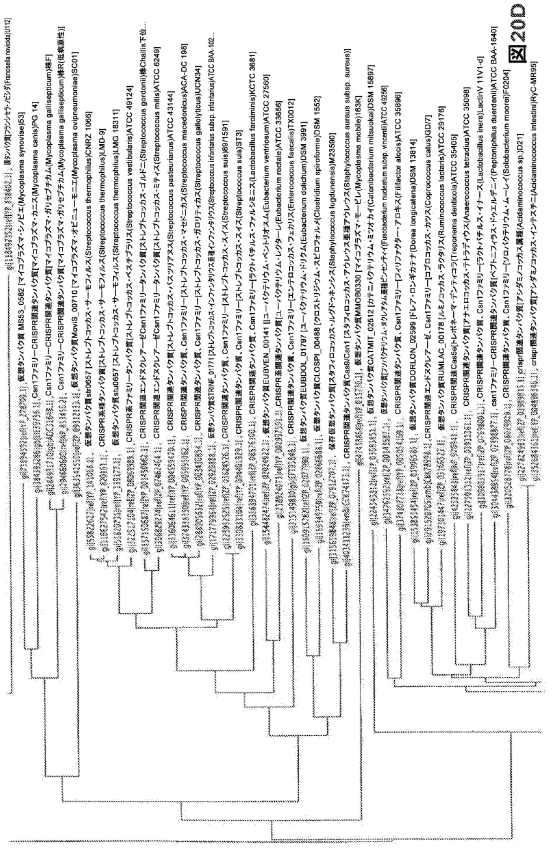


図 20D

【図２０Ｅ】

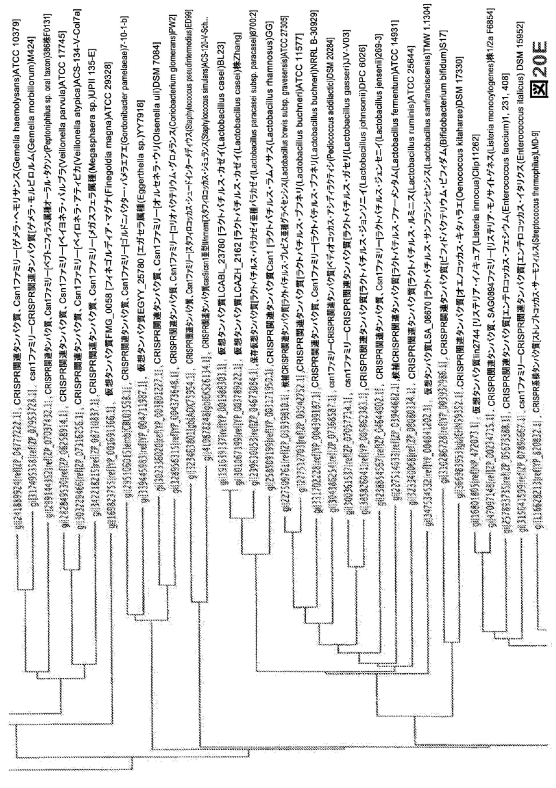


図 20E

【図２０Ｆ】

図 20F

【図２１Ａ】

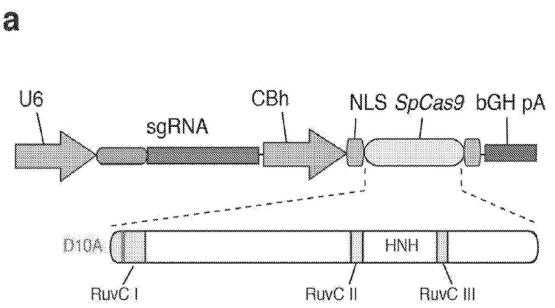


図21A

【図２１Ｂ】

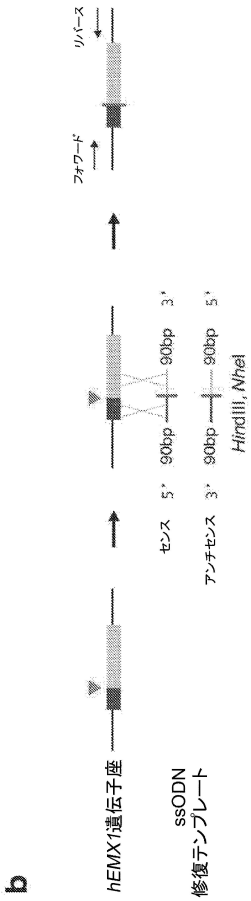


図21B

【図２１Ｃ】

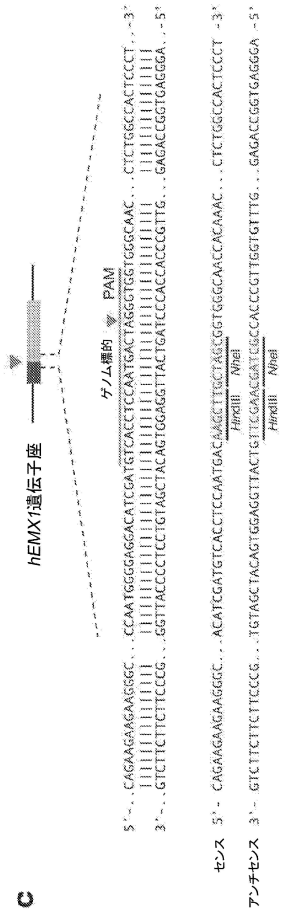


図21C

【図２１Ｄ】

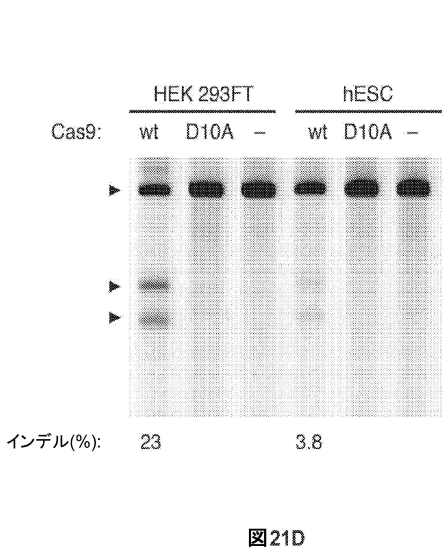


図21D

【図２２Ａ】

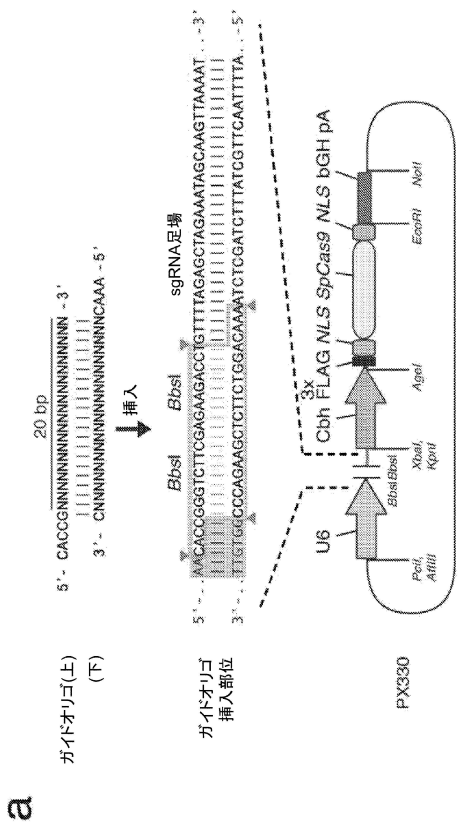


図22A

【図２２Ｂ】

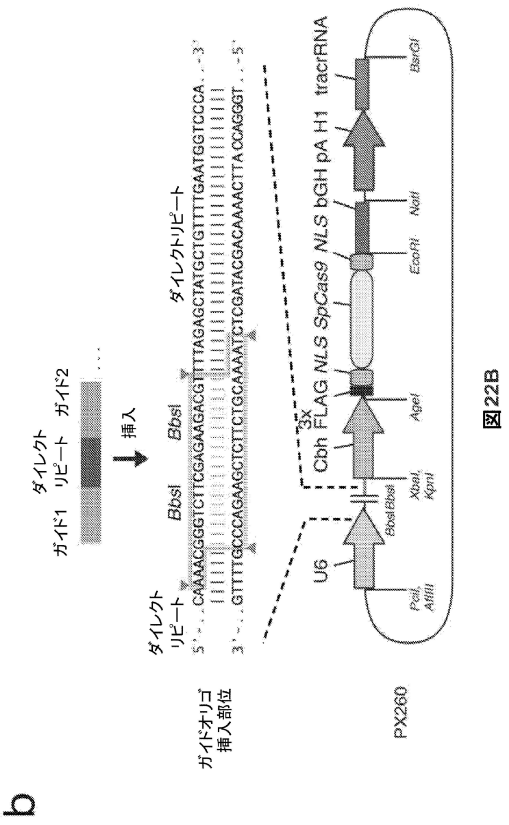


図22B

【図２３】

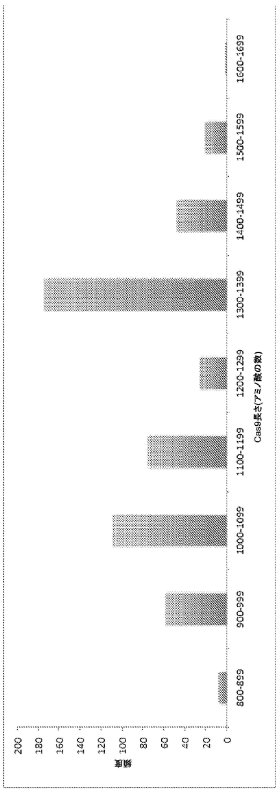


図23

【図２４Ａ】

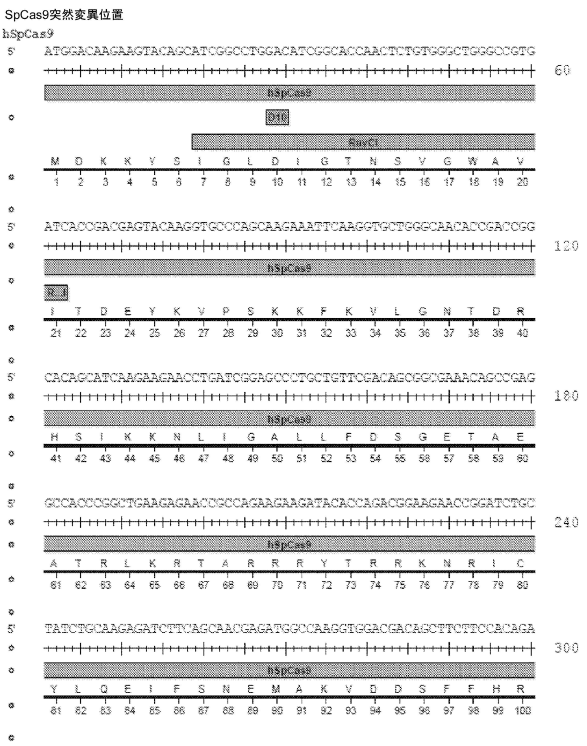


図24A

【図２４Ｂ】

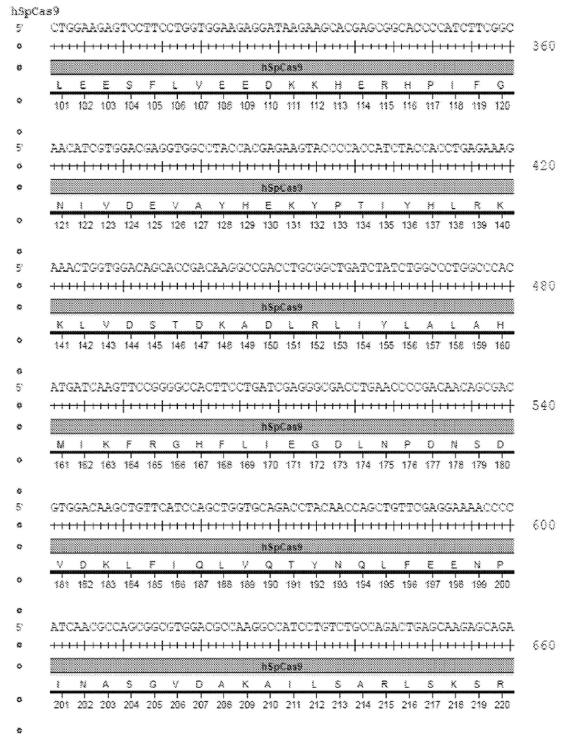


図24B

【図２４Ｃ】

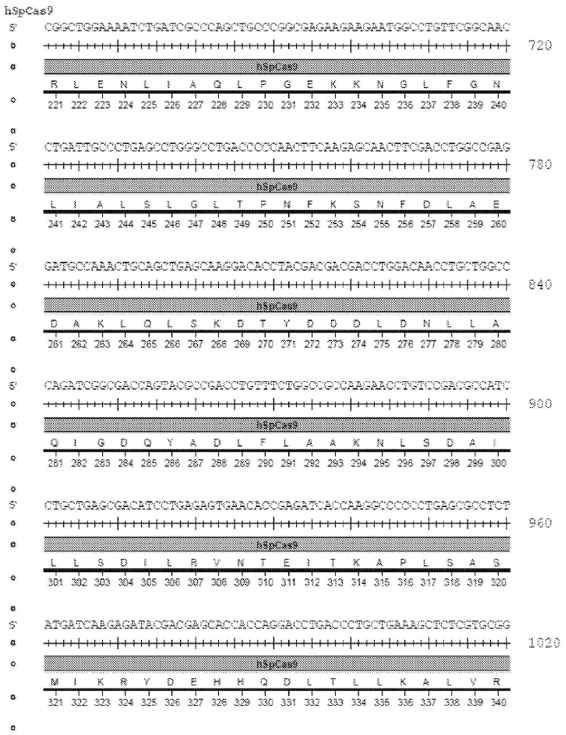


図24C

【図２４Ｄ】

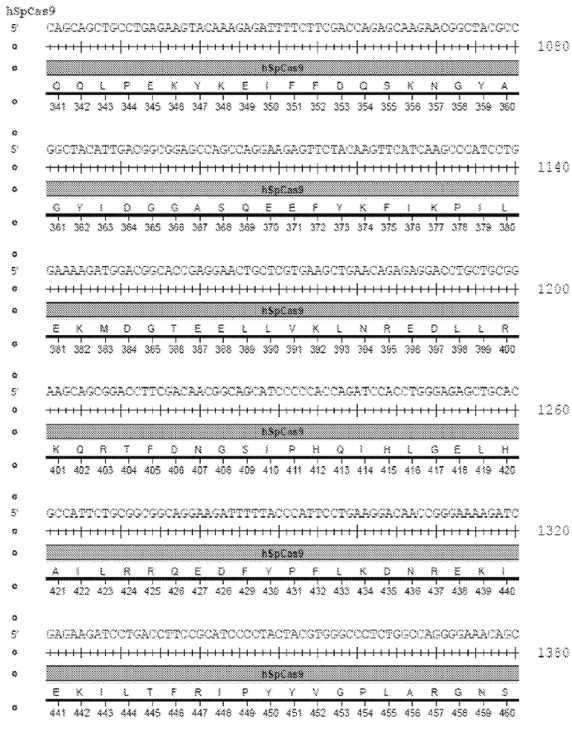


図24D

【図２４Ｅ】

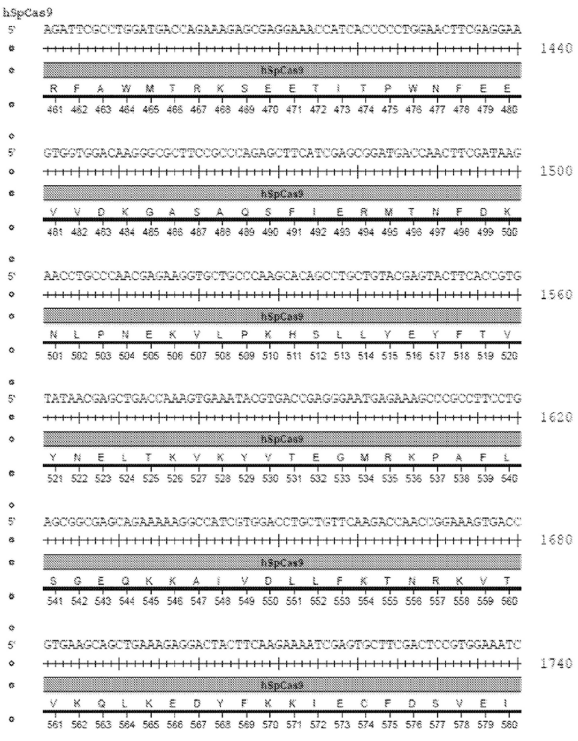


図24E

【図２４Ｆ】

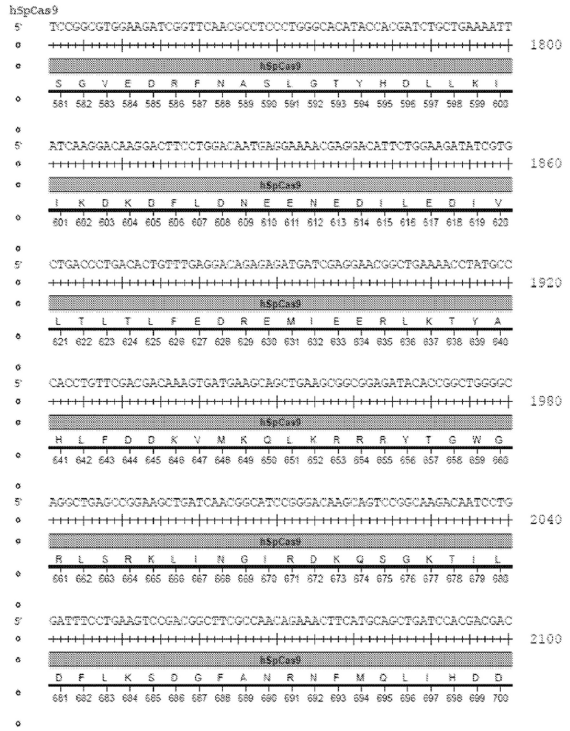


図24F

【図２４Ｇ】

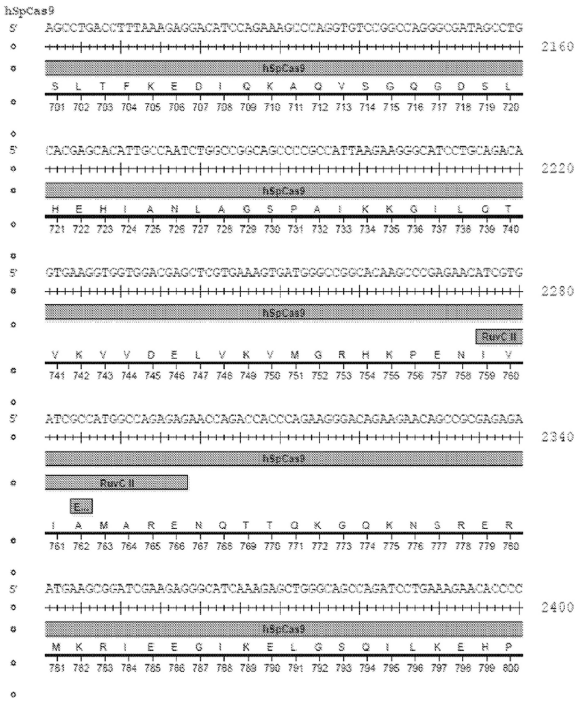


図24G

【図２４Ｈ】

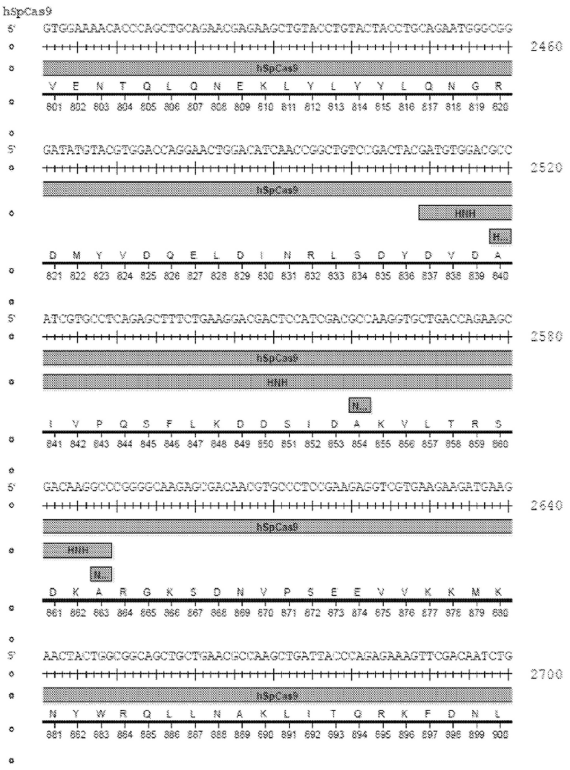


図24H

【図２４Ｉ】

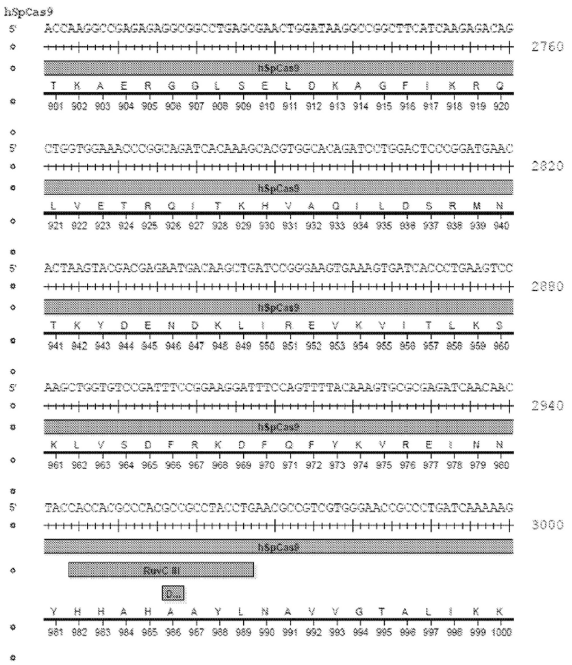


図24I

【図２４Ｊ】

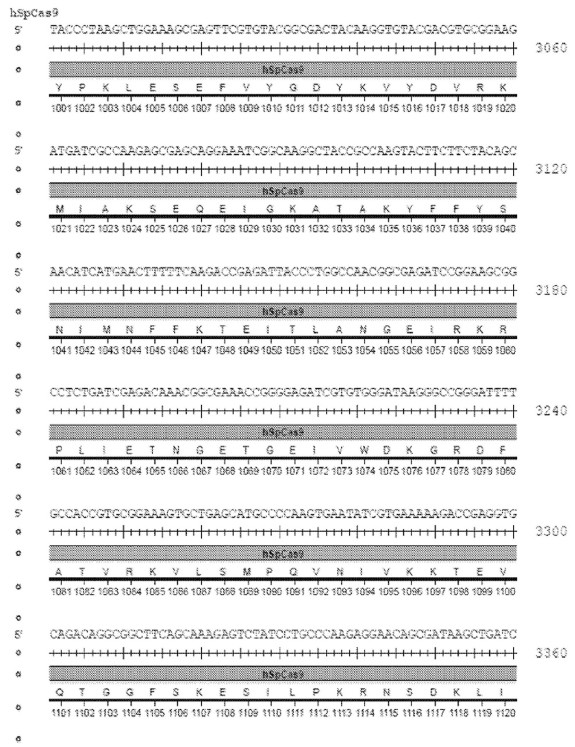


図24J

【図２４Ｋ】

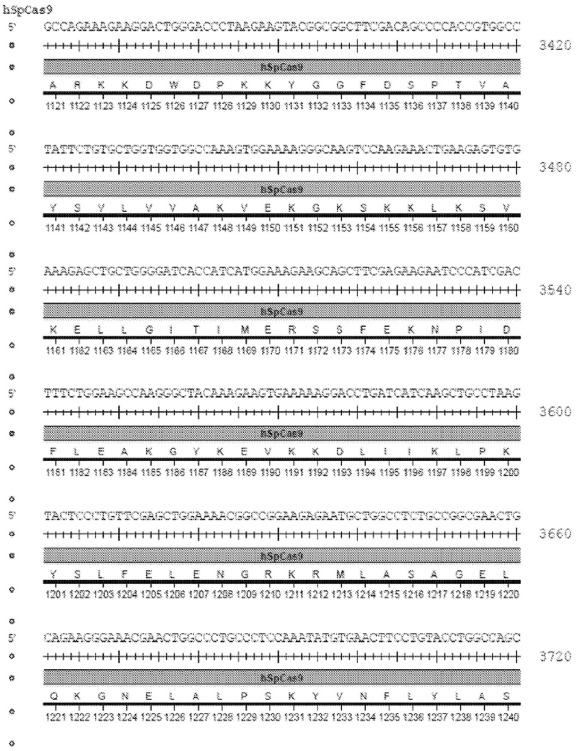


図24K

【図２４Ｌ】

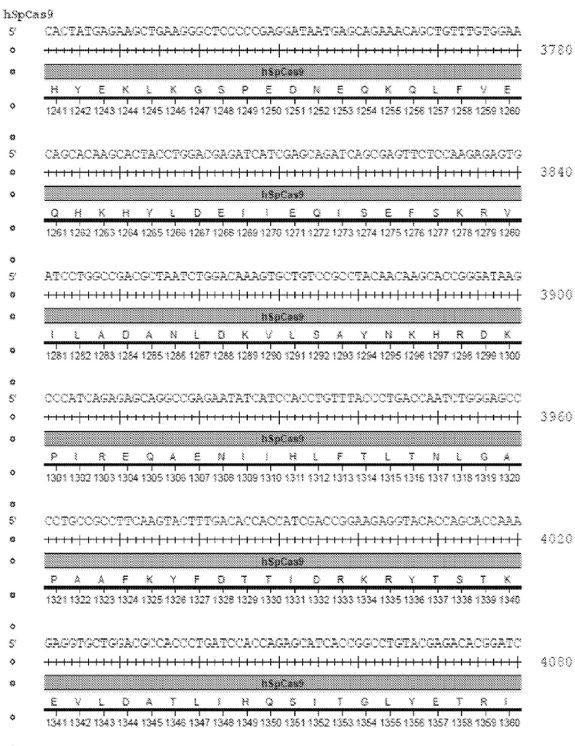


図24L

【図２４Ｍ】

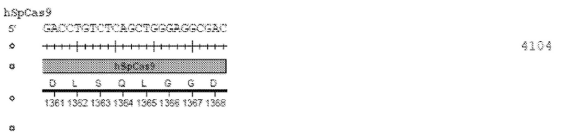


図24M

【図２５Ａ】

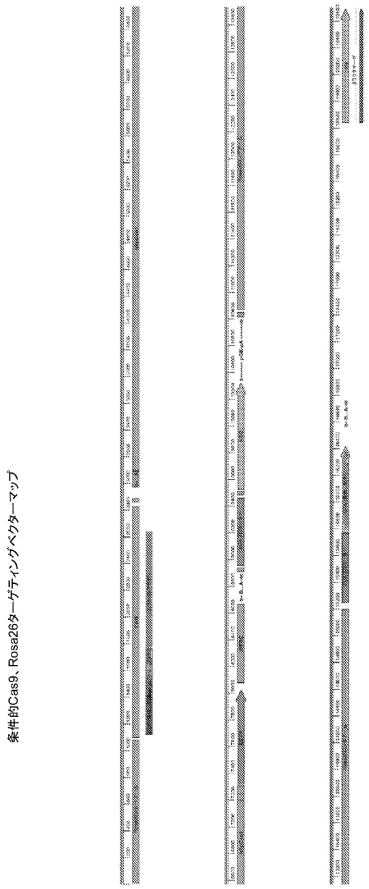


図25A

【図２５Ｂ】

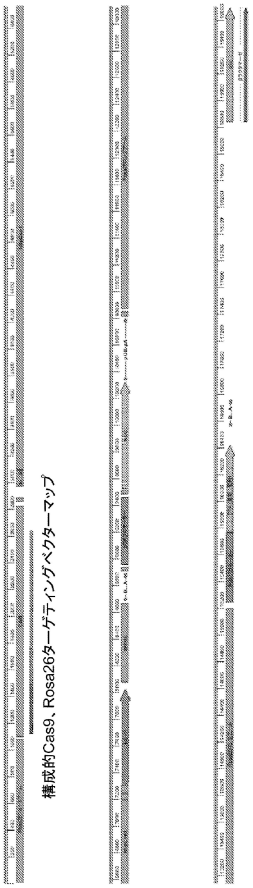


図25B

【図２６】

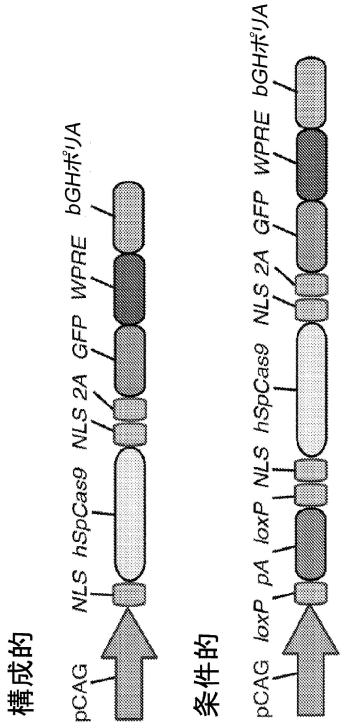


図26

【図２７】

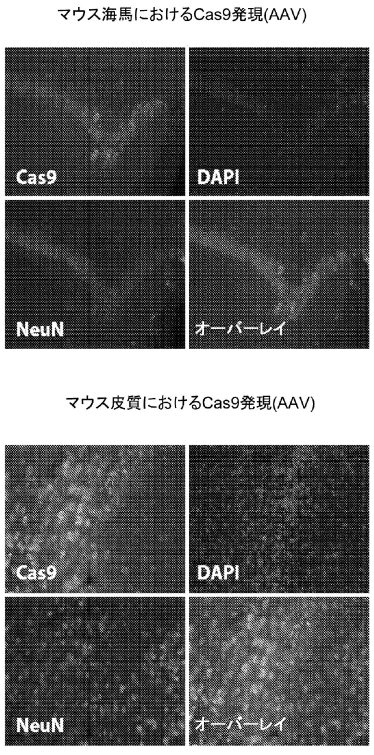


図27

【図２８】

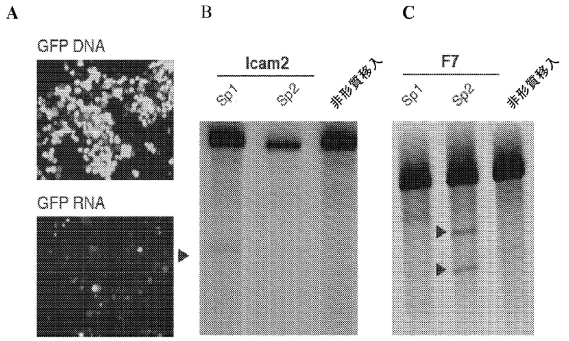


図28

【図２９】

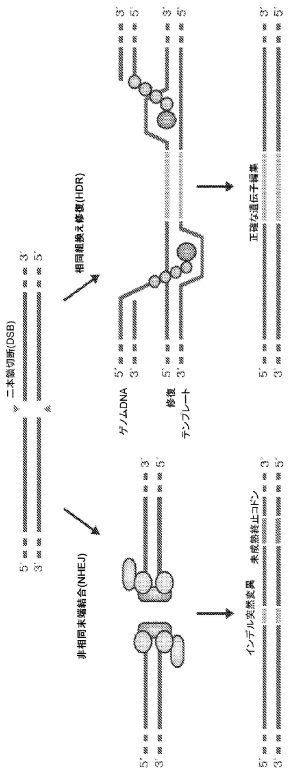


図29

【図３０】

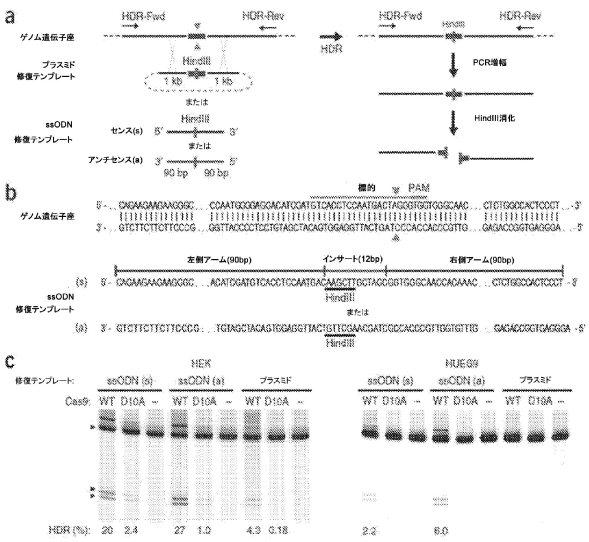


図30A-C

【図３１】

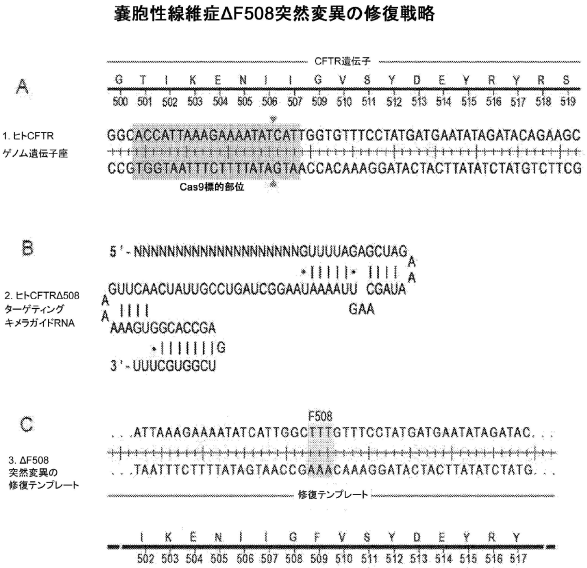


図31A-C

【図３２】

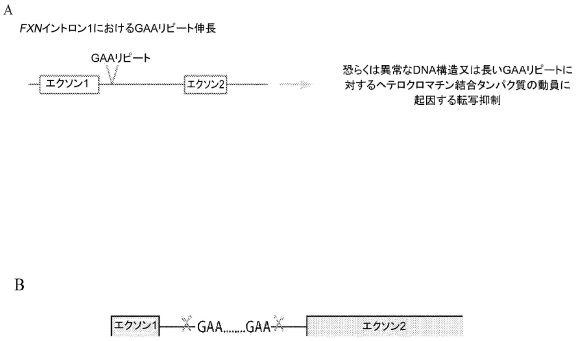


図32A-B

【図３３】

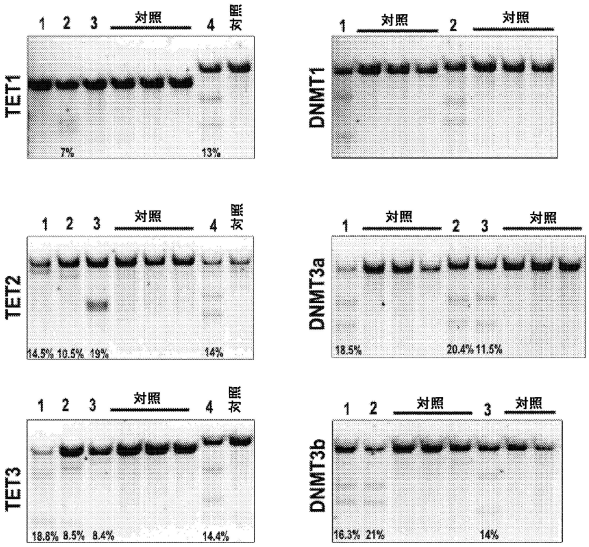


図33

【図３４】

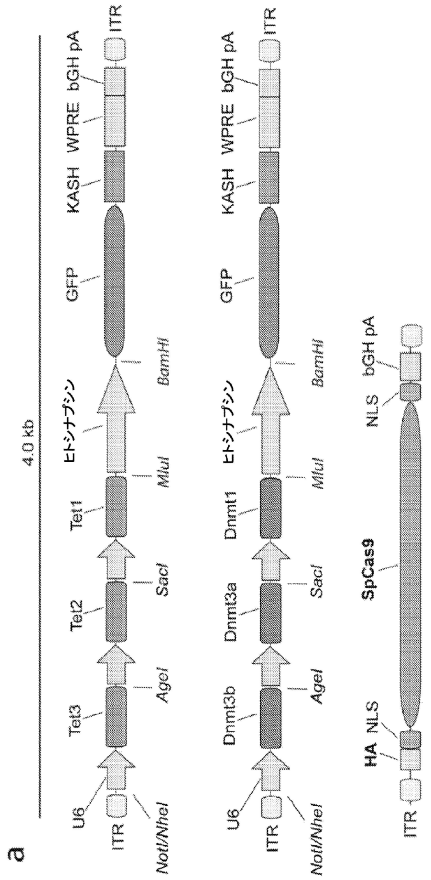


図34

【図３５】

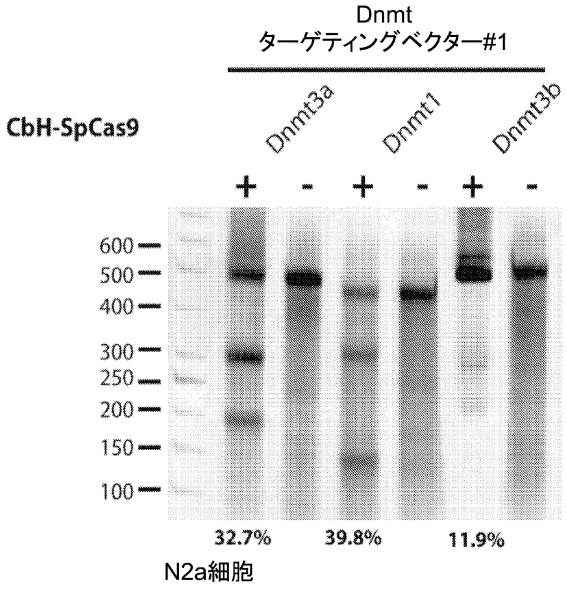


図35

【図３６】

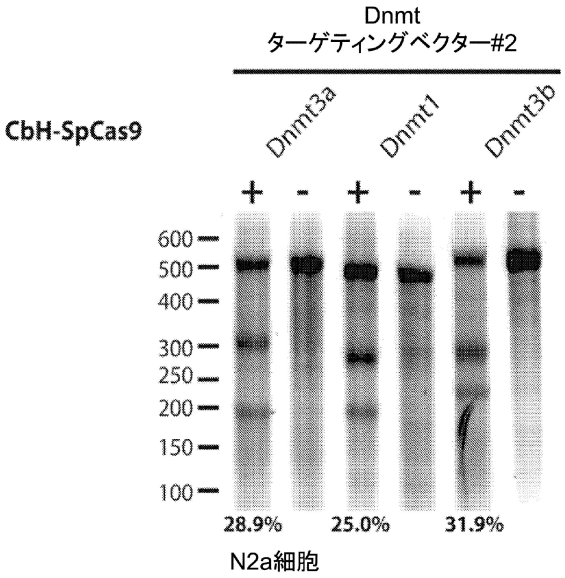


図36

【図３７】

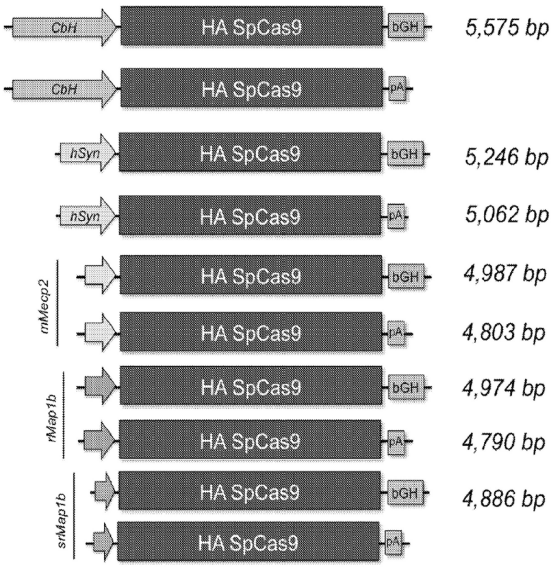


図37

【図３８】

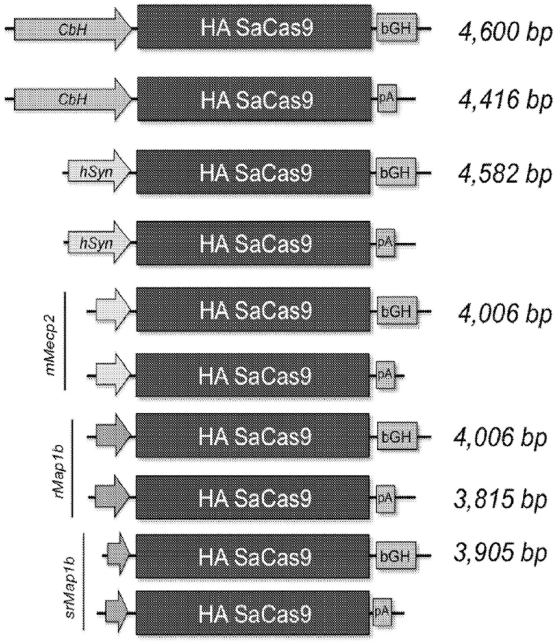


図38

【図３９】

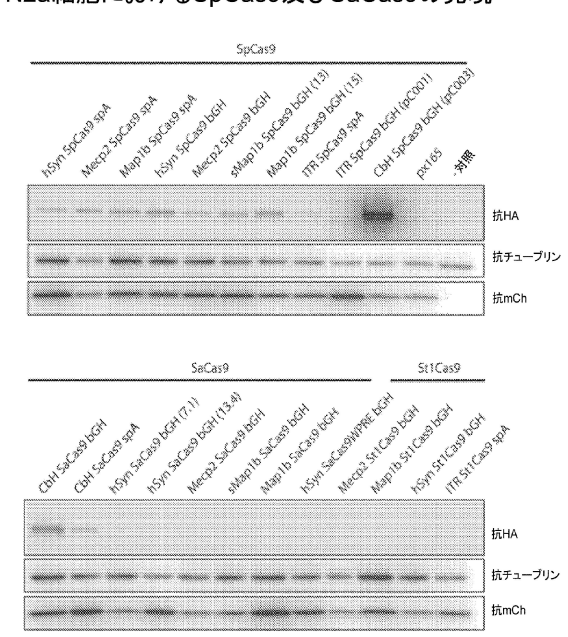


図39

【図４０】

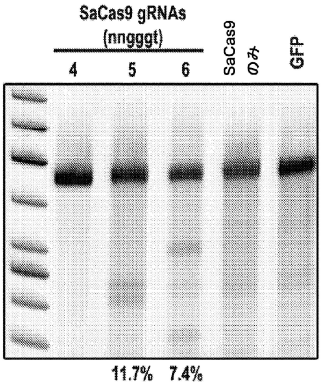


図40

【図４１】

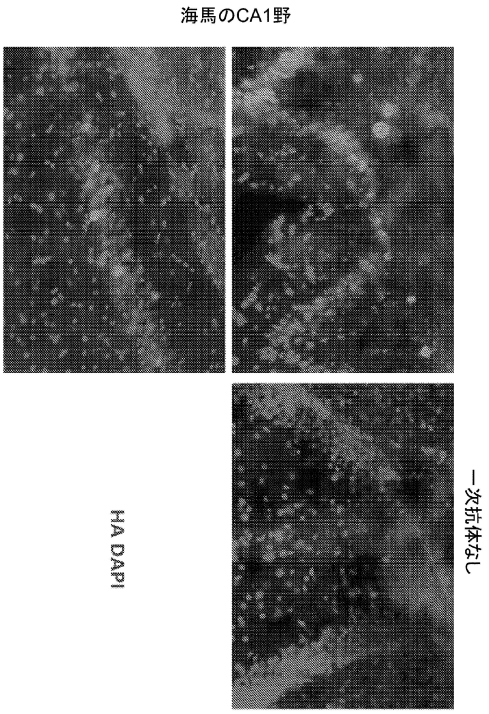


図41

【図４２】

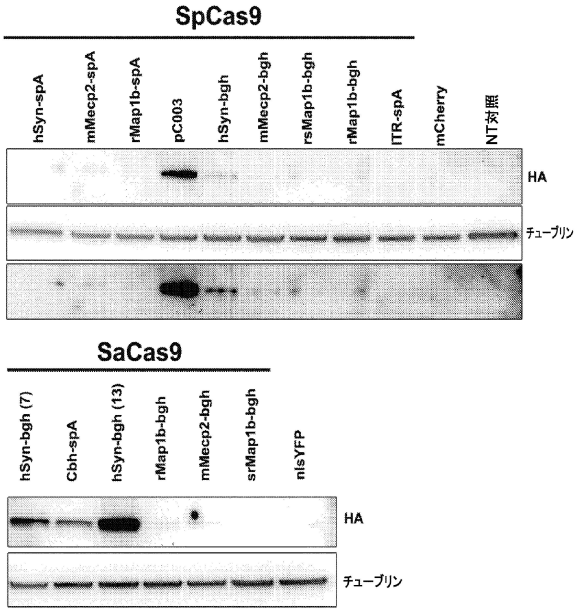


図42

【図４３】

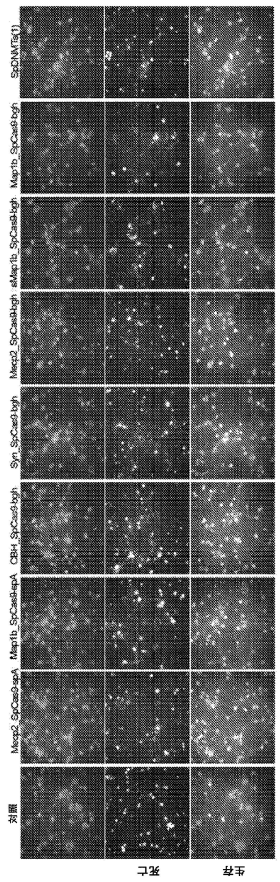


図43

【図４４】

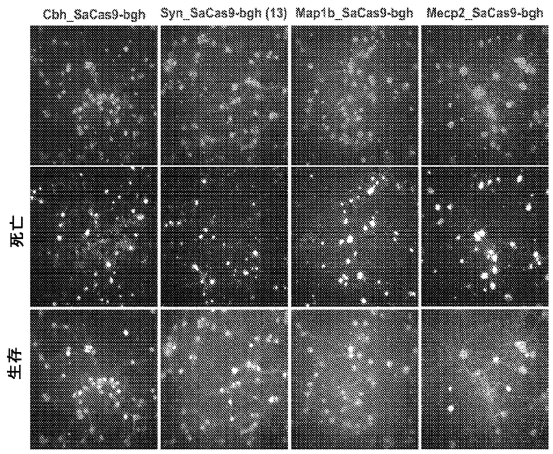


図44

【図４５】

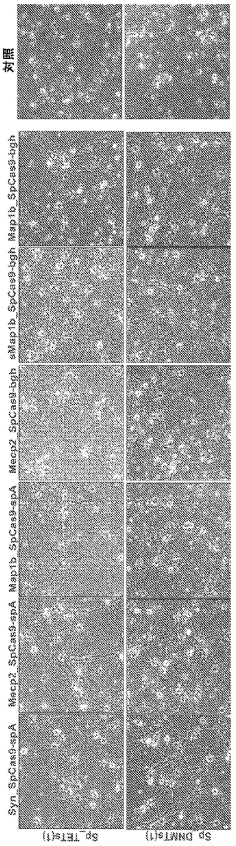


図45

【図４６】

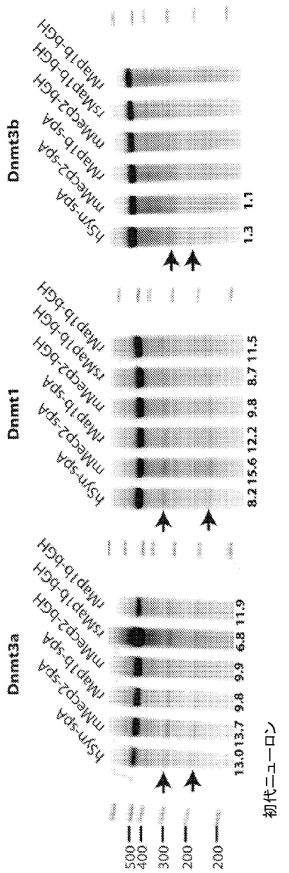


図46

【図４７】

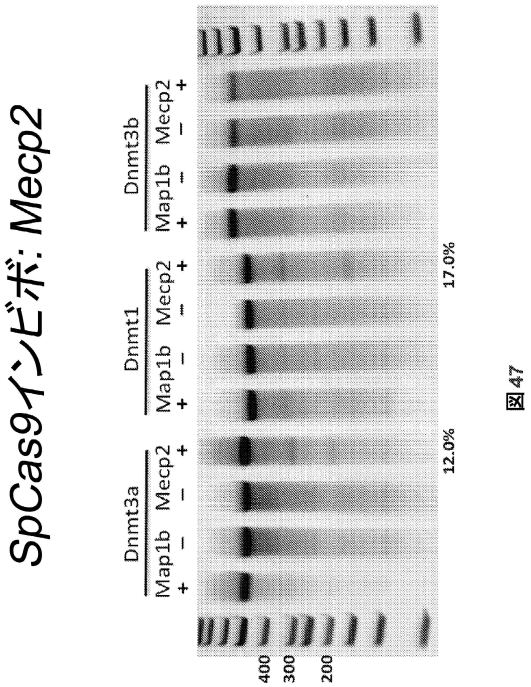


図47

【図４８】

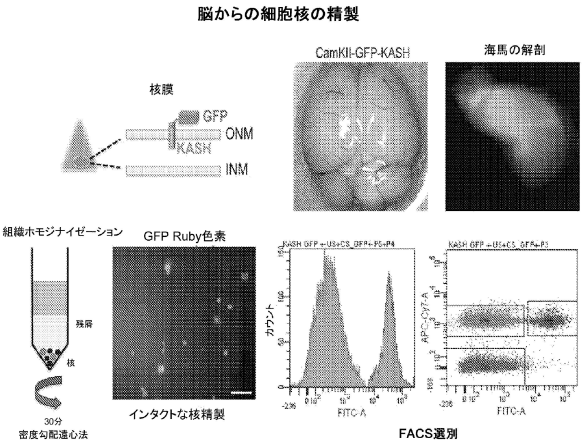


図48

【図４９】

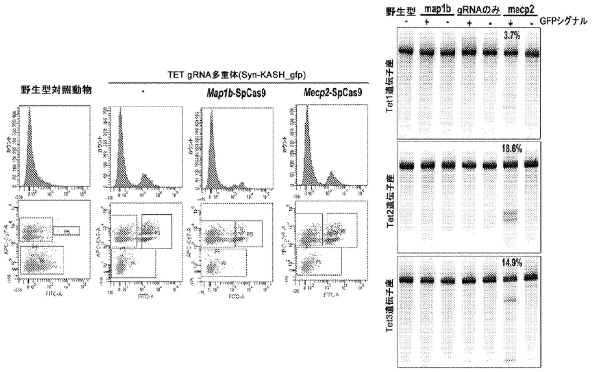


図49

【図５０】

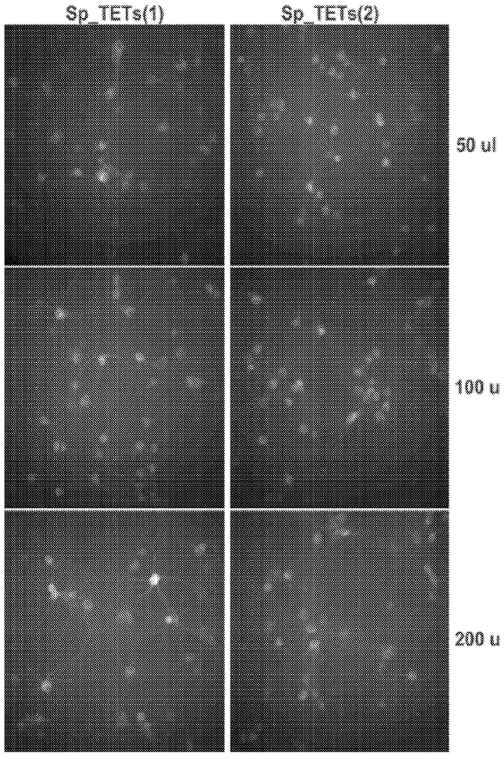


図50

【図５１】

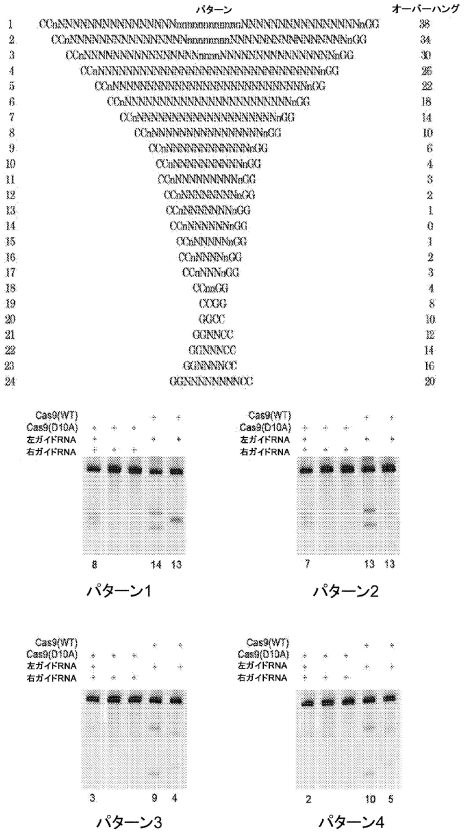


図 51

【図５２】

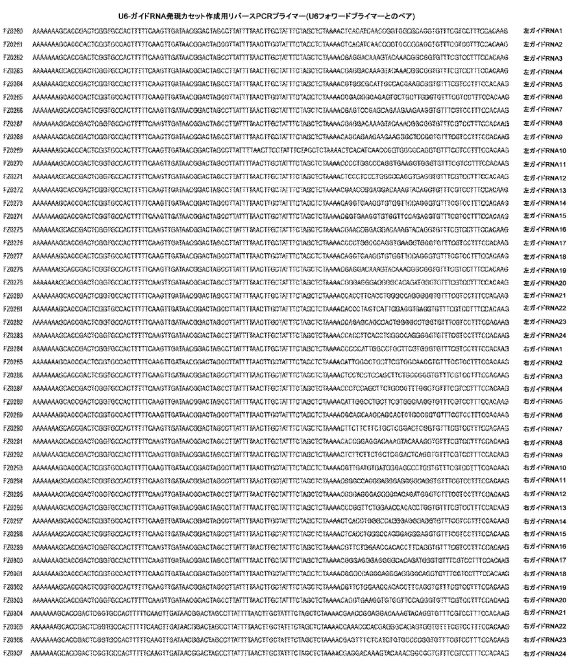


図52

【図５３】

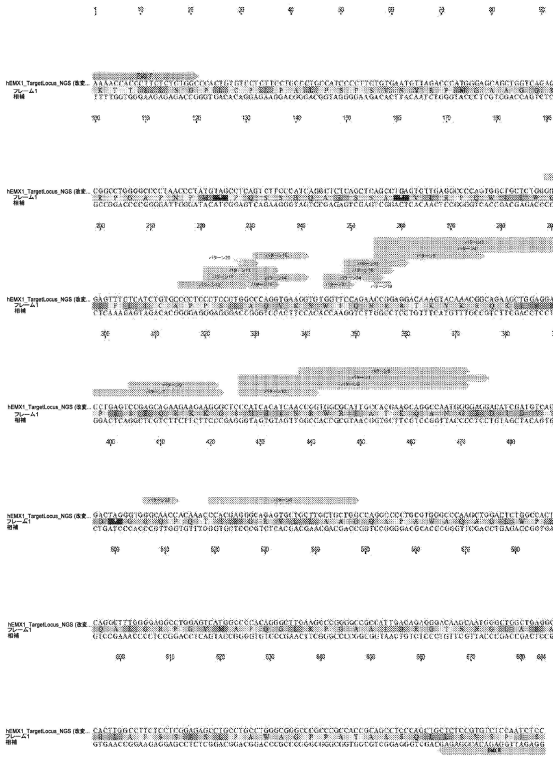
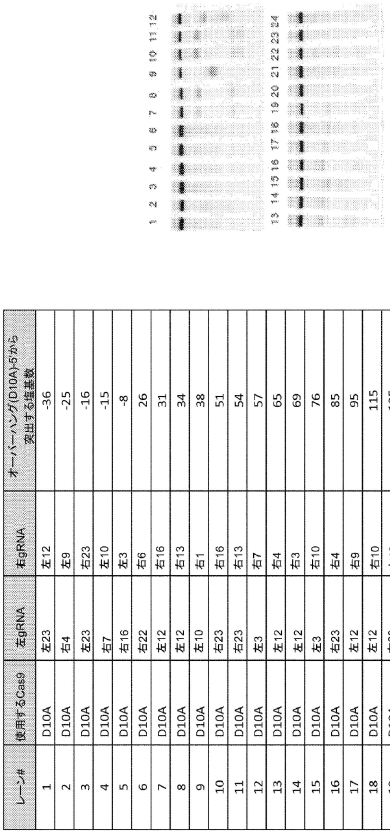


図53

【図５４】



レーン#	使用するCas9	右gRNA	左gRNA	オーバーハング(D10A)-5'から突出する塩基数
1	D10A	左23	左12	-36
2	D10A	左4	左9	-25
3	D10A	左23	左23	-16
4	D10A	左7	左10	-15
5	D10A	左16	左3	-8
6	D10A	左22	左6	26
7	D10A	左12	左16	31
8	D10A	左12	左13	34
9	D10A	左10	左11	38
10	D10A	左23	左16	51
11	D10A	左23	左13	54
12	D10A	左3	左7	57
13	D10A	左12	左4	65
14	D10A	左12	左3	69
15	D10A	左3	左10	76
16	D10A	左23	左4	85
17	D10A	左12	左9	95
18	D10A	左12	左10	115
19	D10A	左23	左10	135
20	D10A	左12	左2	145
21	D10A	左12	左22	181
22	D10A	左23	左22	201
23	D10A	左12	左6	222
24	D10A	左23	左6	242

図54

【図５５】

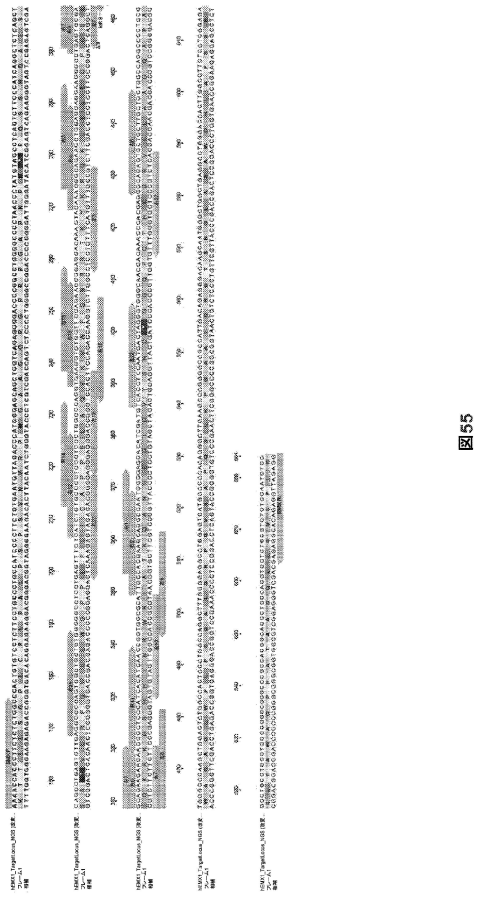


図55

【図５６】

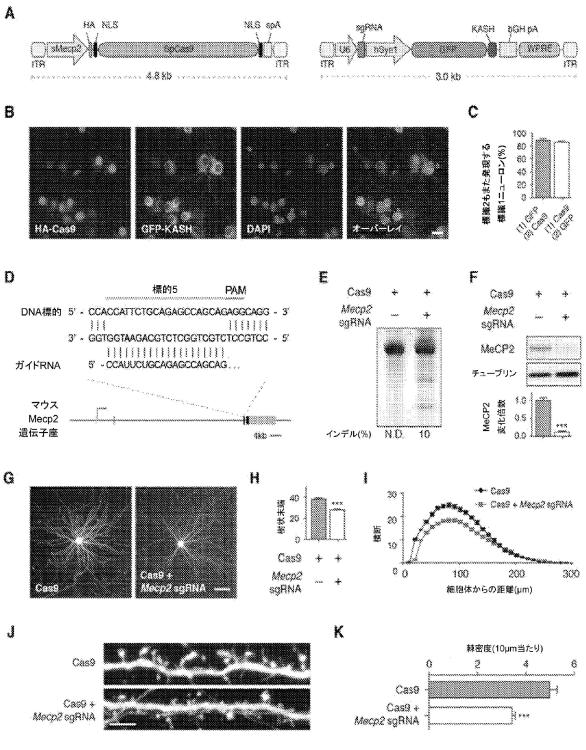


図56A-K

【図５７】

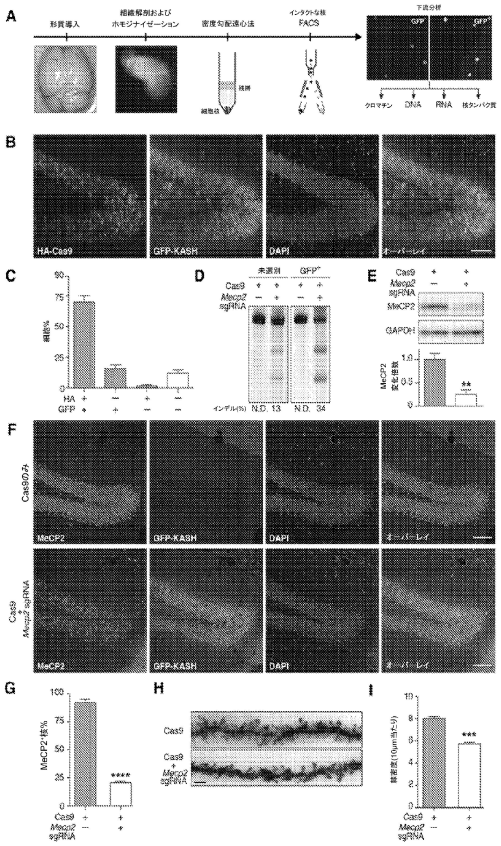


図57A-I

【図５８】

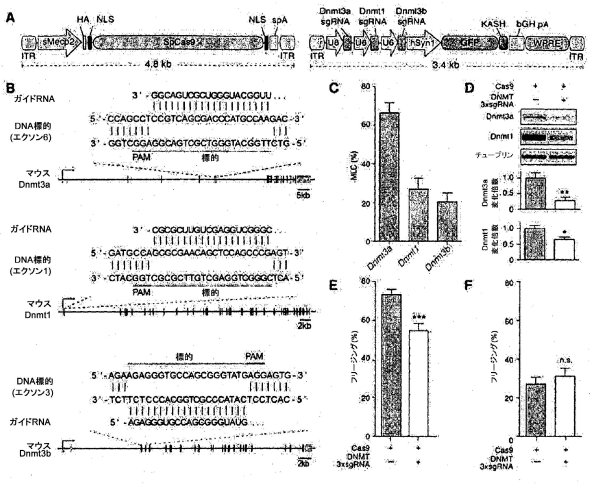


図58A-F

【図５９】

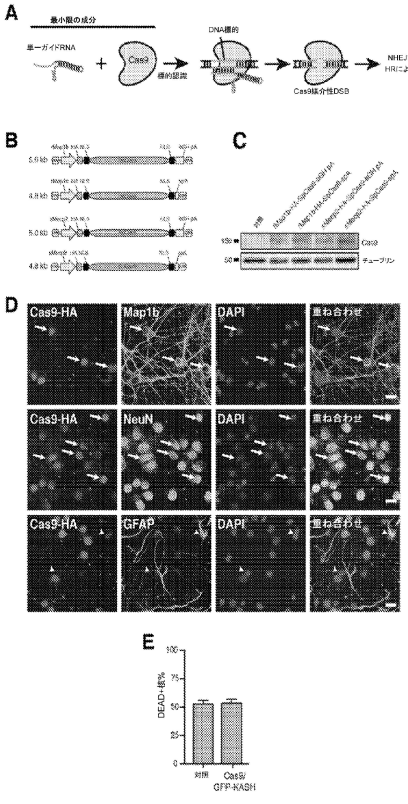


図59A-E

【図６０】

A

	*Mecp2*標的配列	PAM
標的1	CTGGGAGAGGGAGCCCCTCC	AGG
標的2	AAAGGTGGGAGACACCTCCT	TGG
標的3	TCCAACCTTCAGGCAAGGTG	GGG
標的4	AGGAAGTCTGGCCGATCTGC	TGG
標的5	CCATTCTGCAGAGCCAGCAG	AGG
標的6	CTCTGAGGCCCTGGAGATCC	TGG

B

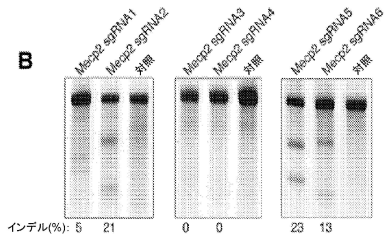


図60A-B

【図６１】

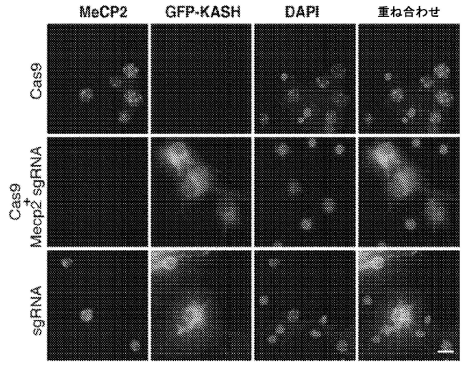


図61

【図６２】

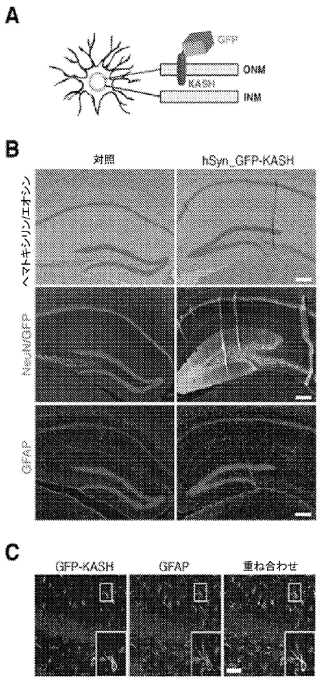


図62A-C

【図６３】

A

標的	標的配列	PAM
Dnmt3a	TTGGCATGGGTCGCTGACGG	AGG
Dnmt1	CGGGCTGGAGCTGTTCGCGC	TGG
Dnmt3b	AGAGGGTGCCAGCGGGTATG	AGG

B

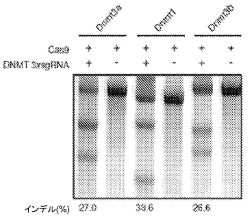


図63A-B

【図６４】

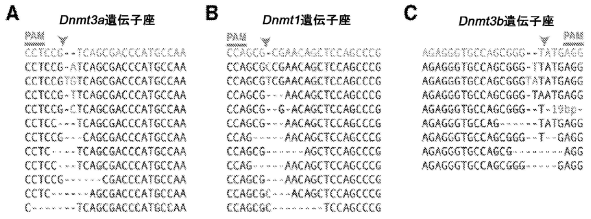


図64A-C

【図６５Ａ】

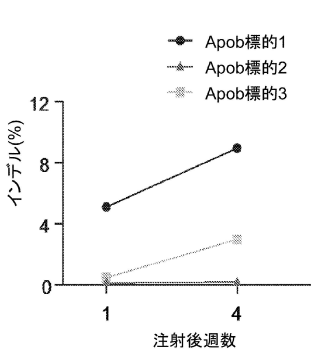


図65A

【図６５Ｂ】

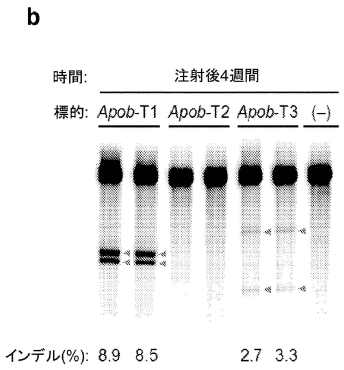


図65B

【図６６】

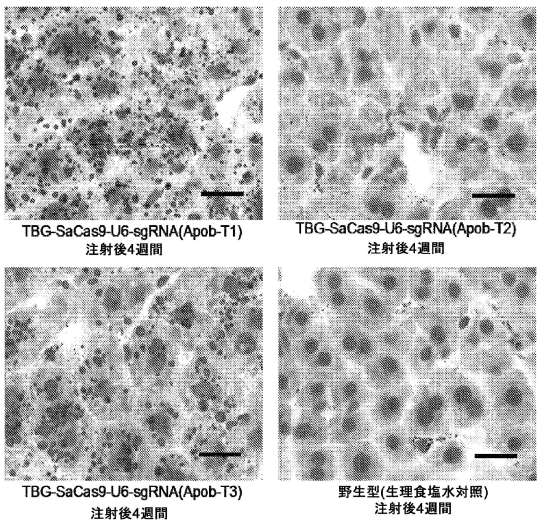


図66

【図６７】

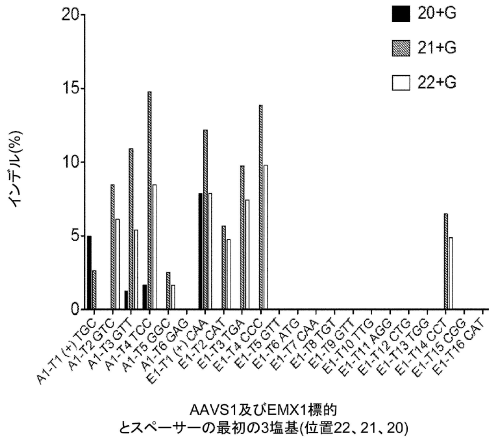


図67

【図６８】

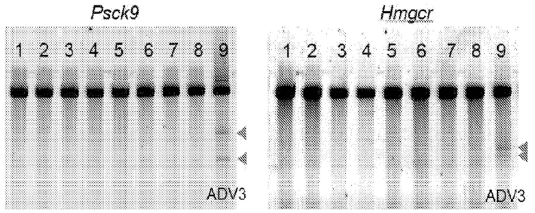


図68

【図６９】

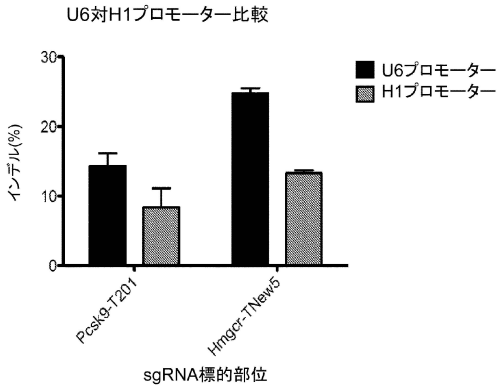


図69

【図７０】

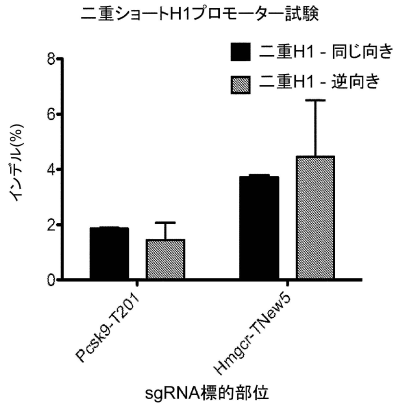


図70

【図７１】

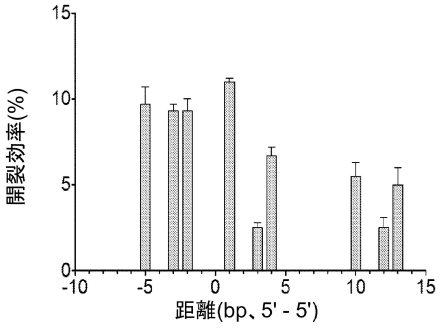


図71

【図７２】

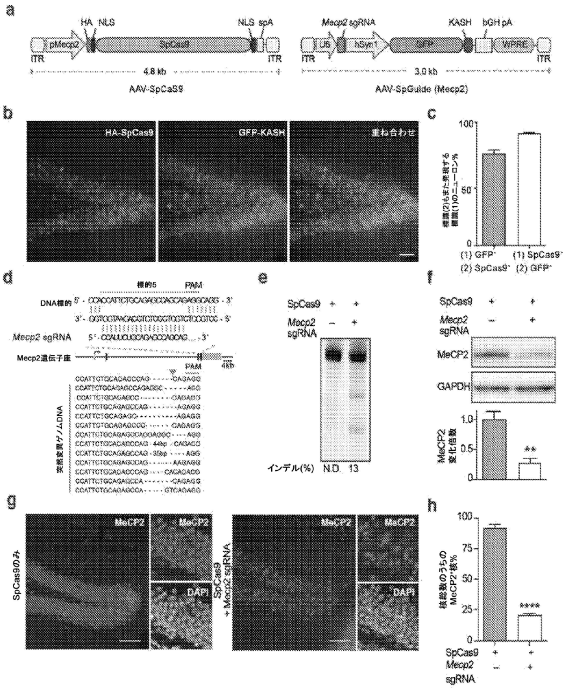


図72

【図７３】

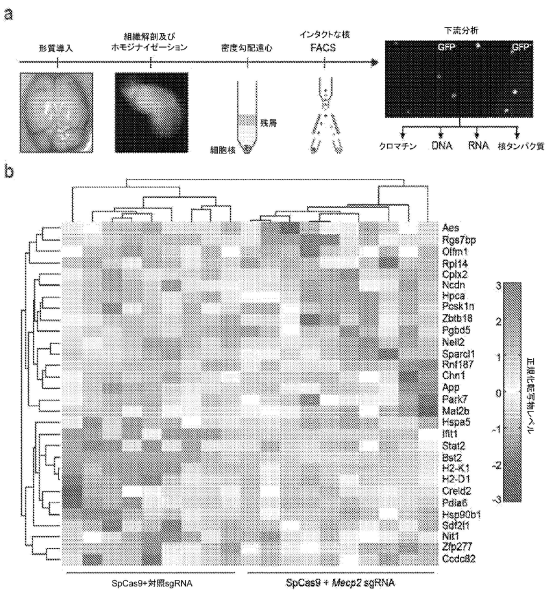


図73

【図７４】

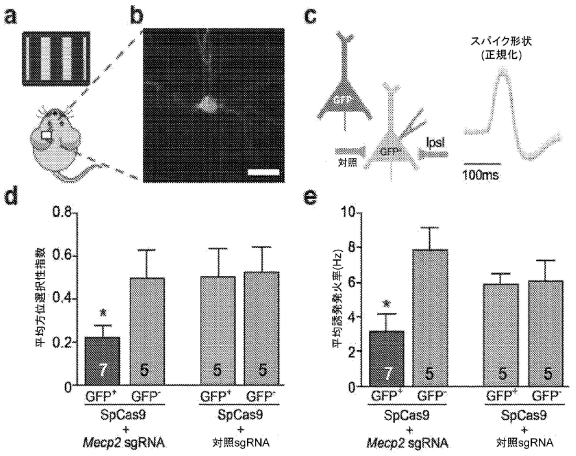


図74

【図７５】

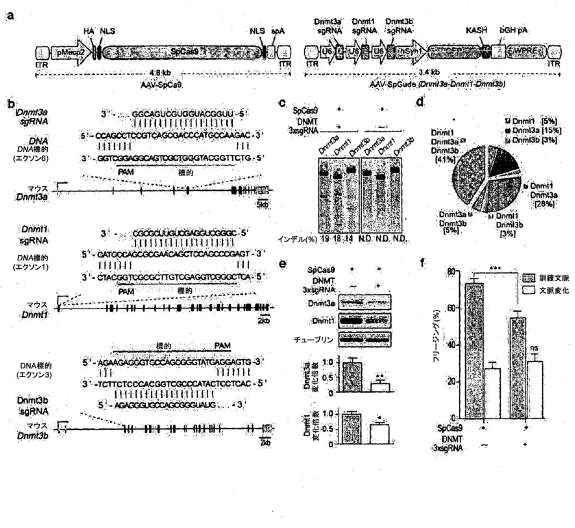


図75

【図７６】

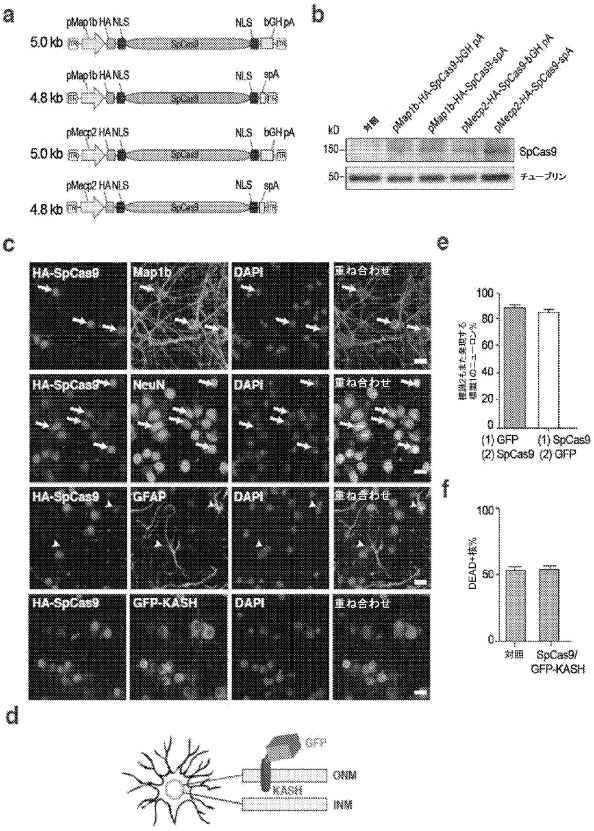


図76

【図７７】

a

	Mecp2標的配列	PAM
標的1	CTGGGAGAGGGAGCCCCTCC	AGG
標的2	AAAGGTGGGAGACACCTCCT	TGG
標的3	TCCAACCTTCAGGCAAGGTG	GGG
標的4	AGGAAGTCTGGCCGATCTGC	TGG
標的5	CCATTCTGCAGAGCCAGCAG	AGG
標的6	CTCTGAGGCCCTGGAGATCC	TGG

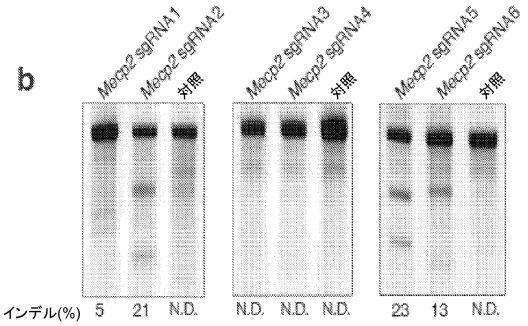


図77

【図７８】

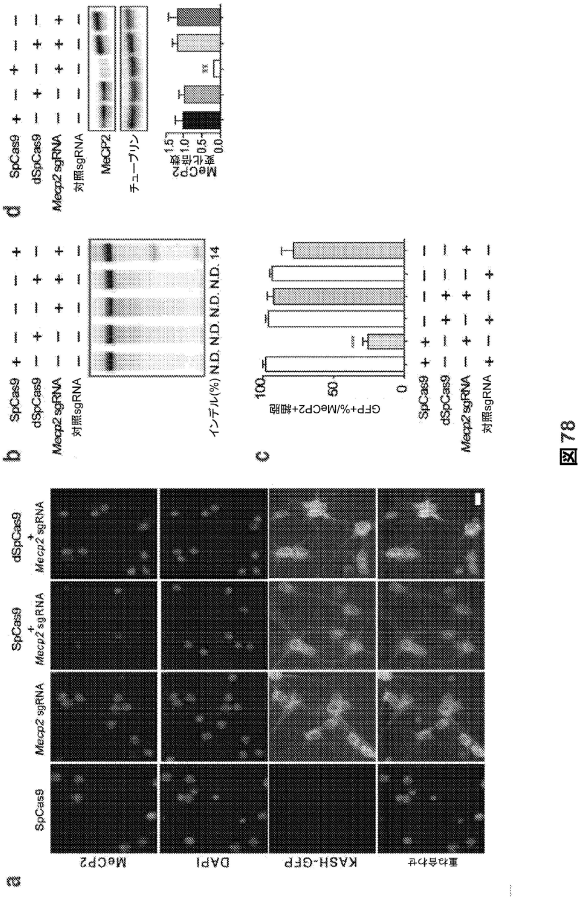


図78

【図７９】

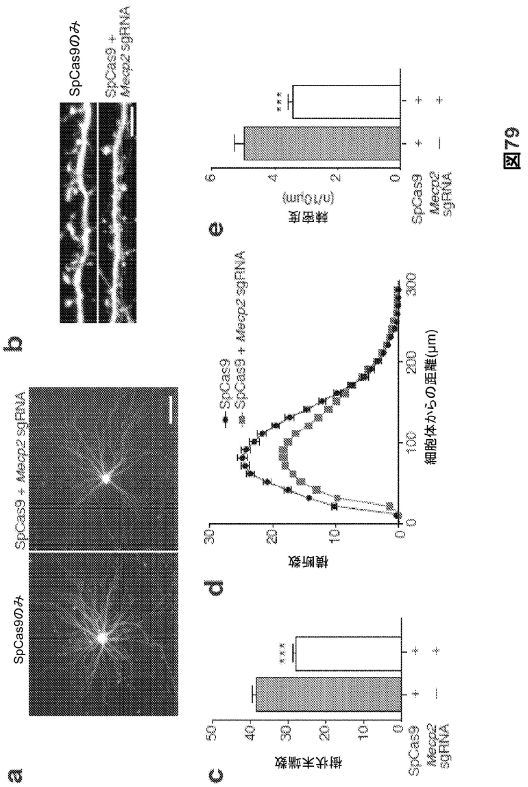


図79

【図８０】

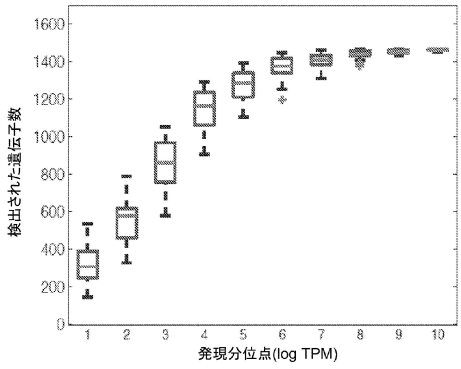


図80

【図８１】

a

標的	標的配列	PAM
Dnmt3a	TTGGCATGGGTCGCTGACGG	AGG
Dnmt1	CGGGCTGGAGCTGTTCGCGC	TGG
Dnmt3b	AGAGGGTGCCAGCGGGTATG	AGG

b

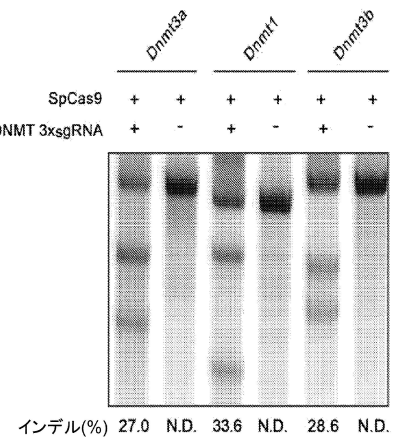


図81

【図８２】

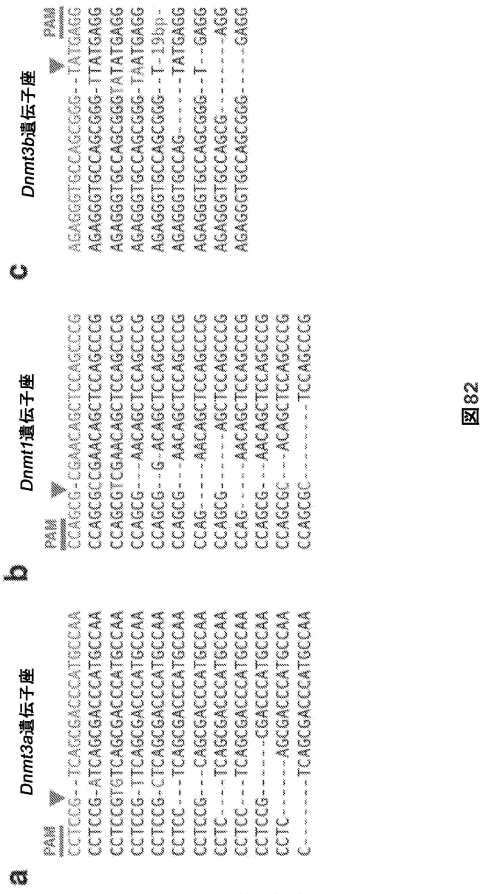


図82

【図８３】

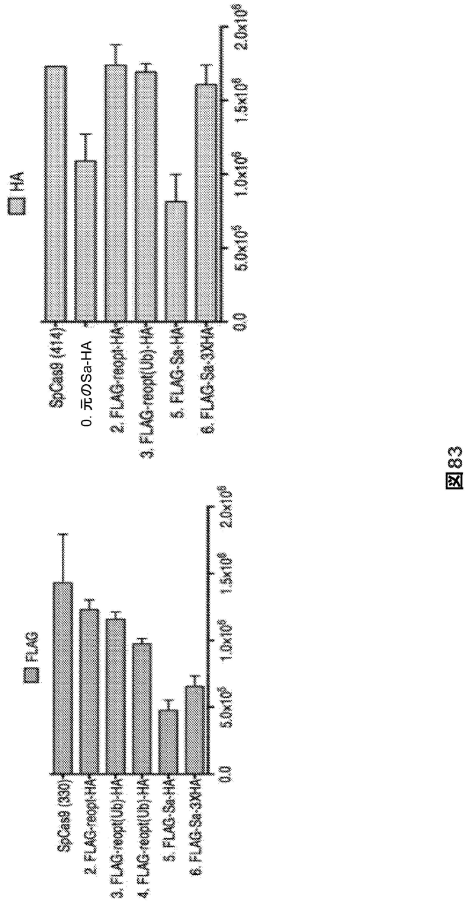


図83

【図８４】

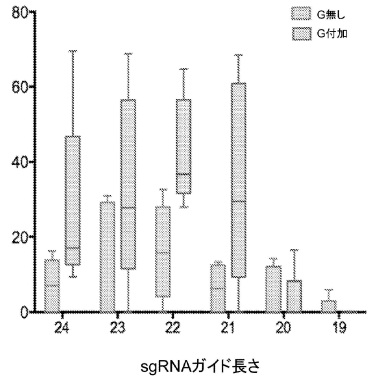


図84

【図８５】

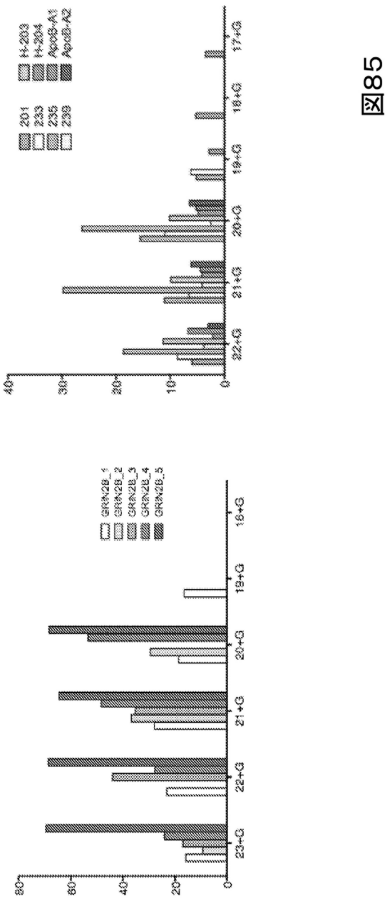

H-203
H-204
ApoB-A1
ApoB-A2
201
233
235
239
40
30
20
10
0
22+G
21+G
20+G
19+G
18+G
17+G
GRK+2B_1
GRK+2B_2
GRK+2L_3
GRK+2L_4
GRK+2B_5
80
60
40
20
0
23+G
22+G
21+G
20+G
19+G
18+G

図85

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI	
Ａ６１Ｋ	***35/761***	***(2015.01)***	Ａ６１Ｋ	35/761
Ａ６１Ｐ	***43/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00

(31)優先権主張番号 61/862,355
(32)優先日 平成25年8月5日(2013.8.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 PCT/US2013/074667
(32)優先日 平成25年12月12日(2013.12.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/847,537
(32)優先日 平成25年7月17日(2013.7.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/915,225
(32)優先日 平成25年12月12日(2013.12.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/836,123
(32)優先日 平成25年6月17日(2013.6.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 505028576
プレジデント アンド フェロウズ オヴ ハーヴァード カレッジ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３８ ケンブリッジ クインシー・ストリート １７
(74)代理人 110000109
特許業務法人特許事務所サイクス
(72)発明者 チャン フェン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９ ケンブリッジ パシフィック ストリート １００ アパートメント １１
(72)発明者 コン レ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２ ケンブリッジ メモリアル ドライヴ １００ アパートメント ８－２１ビー
(72)発明者 ラン フェイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１１６ ボストン クラレンドン ストリート ３０
(72)発明者 ハイデンライヒ マティアス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４４ サマーヴィル チェスター ストリート ５３
(72)発明者 スウィッチ ルカシュ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１２０ ボストン グリニッジ ストリート ６ アパートメント ３

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 国際公開第２０１３／１７６７７２（WO，Ａ１）
国際公開第２０１４／０８９２９０（WO，Ａ１）
国際公開第２０１４／１８６５８５（WO，Ａ１）
国際公開第２０１４／１９１５１８（WO，Ａ１）
特表２００６－５１３６９４（ＪＰ，Ａ）
特表２０１３－５０００４５（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５０９４０９（ＪＰ，Ａ）
特表２００６－５１８９９６（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５０２１７０（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１１／１４６１２１（WO，Ａ１）
特表２０１２－５１０８１２（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５２２５４７（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５３６８２７（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５１１３３２（ＪＰ，Ａ）
特表２０１６－５２３０８２（ＪＰ，Ａ）
Science (Feb 2013) vol.339, issue 6121, p.819-823, Supplementary Material
Genome Res. (2012) vol.22, no.7, p.1327-1333
Science (Feb 2013) vol.339, issue 6121, p.823-826, Supplementary Material
Nat. Methods (Mar 2013) vol.10, no.3, p.243-245
ウイルス (2007) vol.57, no.1, p.47-56
eLife (Jan 2013) vol.2, e00471
Cell Res. (Mar 2013) vol.23, issue 4, p.465-472
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (2012) vol.109, no.45, E3136-E3145
J. Neurosci. (2010) vol.30, issue 49, p.16469-16474

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００ － １５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＤＷＰＩ（Ｄｅｒｗｅｎｔ Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ）