

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6985250号  
(P6985250)

(45) 発行日 令和3年12月22日(2021.12.22)

(24) 登録日 令和3年11月29日(2021.11.29)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	Z N A
A 6 1 K 31/713	(2006.01)	A 6 1 K 31/713	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 O
C 1 2 N 9/22	(2006.01)	C 1 2 N 9/22	
C 1 2 N 15/63	(2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z

請求項の数 17 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-511592 (P2018-511592)  
 (86) (22) 出願日 平成28年4月15日 (2016.4.15)  
 (65) 公表番号 特表2018-516978 (P2018-516978A)  
 (43) 公表日 平成30年6月28日 (2018.6.28)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2016/027987  
 (87) 國際公開番号 WO2016/186772  
 (87) 國際公開日 平成28年11月24日 (2016.11.24)  
 審査請求日 平成31年4月10日 (2019.4.10)  
 (31) 優先権主張番号 62/162,720  
 (32) 優先日 平成27年5月16日 (2015.5.16)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)

(73) 特許権者 500034653  
 ジェンザイム・コーポレーション  
 アメリカ合衆国O 2 1 4 2 マサチューセット  
 州 ケンブリッジ、ビニー・ストリート  
 50番  
 (74) 代理人 100127926  
 弁理士 結田 純次  
 (74) 代理人 100140132  
 弁理士 竹林 則幸  
 (72) 発明者 グウォシアン・ルアン  
 アメリカ合衆国ニュージャージー州O 8 8  
 0 7. ブリッジウォーター、メイルコード  
 55エー-505エー、コーポレートド  
 ライブ55. サノフィ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】深部イントロン突然変異の遺伝子編集

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

個体の遺伝子または核酸における深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療するための組成物であって、該組成物は：

(i) 遺伝子操作された、天然に存在しない C l u s t e r e d R e g u l a r l y I n t e r s p a c e d S h o r t P a l i n d r o m i c R e p e a t s ( C R I S P R ) - C R I S P R 関連 ( C a s ) ( C R I S P R - C a s ) システムをコードする核酸であって、

a) 標的 D N A と反対側の D N A 鎖とハイブリダイズする、第 1 のガイド R N A および第 2 のガイド R N A であって、該標的 D N A は、深部イントロン突然変異と、該深部イントロン突然変異の両端に位置する配列とを含み、第 1 のガイドおよび第 2 のガイドは、該両端配列と反対側の部位にハイブリダイズする、前記第 1 のガイド R N A および第 2 のガイド R N A 、および

b) C a s タンパク質をコードするヌクレオチド配列および第 1 のガイド R N A 標的部位を含む C a s 発現カセット、ここで、第 1 のガイド R N A または第 2 のガイド R N A は第 1 のガイド R N A 標的部位にハイブリダイズする、

を含む、前記核酸；

または

(ii) ウイルスベクターを含むウイルス粒子であって、該ウイルスベクターは、遺伝子操作された、天然に存在しない C l u s t e r e d R e g u l a r l y I n t e r

10

20

spaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)  
- CRISPR関連(Cas) (CRISPR-Cas)システムをコードする核酸をコードし、

a) 標的DNAと反対側のDNA鎖とハイブリダイズする、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAであって、該標的DNAは、深部イントロン突然変異と、該深部イントロン突然変異の両端に位置する配列とを含み、第1のガイドおよび第2のガイドは、該両端配列と反対側の部位にハイブリダイズする、前記第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNA、および

b) Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列および第1のガイドRNA標的部位を含むCas発現カセット、ここで、第1のガイドRNAまたは第2のガイドRNAは第1のガイドRNA標的部位にハイブリダイズする、

を含む、前記ウイルス粒子；

を含み、

該Casタンパク質は、該Cas発現カセットから発現され；該Casタンパク質は、該深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、該深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出し；および、該Casタンパク質は、該第1のガイドRNA標的部位で該Cas発現カセットを切断し、それによって、該Cas発現カセットの切断前の該Casタンパク質の発現と比較して、該Casタンパク質の発現を低減する、

前記組成物。

10

20

#### 【請求項2】

Cas発現カセットは、第1のガイドRNAまたは第2のガイドRNAとハイブリダイズする第2のガイドRNA標的部位  
をさらに含み；

Casタンパク質は、該Cas発現カセットを、第1および第2のガイドRNA標的部位で切断し、それによって、該Cas発現カセットの切断前の該Casタンパク質の発現と比較して、該Casタンパク質の発現を低減し；および

(i) 該第1のガイドRNAは、第1のガイドRNA標的部位および第2のガイドRNA標的部位とハイブリダイズする、

(ii) 該第2のガイドRNAは、第1のガイドRNA標的部位および第2のガイドRNA標的部位とハイブリダイズする、または

(iii) 該第1のガイドRNAは、第1のガイドRNA標的部位とハイブリダイズし、該第2のガイドRNAは、第2のガイドRNA標的部位とハイブリダイズする、  
請求項1に記載の組成物。

30

#### 【請求項3】

Cas発現カセットは、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されているポリアデニル化(ポリA)配列をさらに含み、そして、該Casタンパク質による第1または第2のガイドRNA標的部位の切断は、該Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびポリA配列間の作動可能な連結を妨げる、請求項1または2に記載の組成物。

40

#### 【請求項4】

深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害は、眼の障害、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群、X連鎖網膜色素変性症、無フィブリノーゲン血症、アルポート症候群、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体劣性多発性囊胞腎、バース症候群、サラセニア、先天性無フィブリノーゲン血症、先天性白内障・顔貌異常・ニューロパチー症候群、先天性グリコシル化異常症Ia型、先天性グリコシル化異常症II型、囊胞性線維症、ジヒドロブテリジンレダクターゼ欠乏症、ファブリー病、急性骨髓性白血病を伴う家族性血小板異常症、ファンコニ貧血、ギテルマン症候群、成長ホルモン不応症、フリードライヒ運動失調症、血友病A、遺伝性巨赤芽球性貧血1、ヘルマンスキーリー・パドラック症候群

50

、ホモ시스チン尿症、メープルシロップ尿症、マルファン症候群、メチオニンシントーゼ欠乏症、メチルマロン酸血症、ミトコンドリア三機能タンパク質欠乏症、ムコ多糖症ⅠⅠ型、マルチミニコア病、筋ジストロフィー、神経線維腫症Ⅰ型、ニーマン・ピック病C型、眼白子症Ⅰ型、オルニチンデルタアミノトランスフェラーゼ欠損症、全身性エリテマトーデスの素因、プロピオン酸血症、ラブドイド腫瘍、シュワルツ・ヤンペル症候群、ステイックラー症候群、全身性エリテマトーデス、結節性硬化症、ウェルナー症候群、X連鎖高免疫グロブリンM血症、または、X連鎖低リン酸血症である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項5】

深部イントロン突然変異は、

10

(i) 表1または表2に示される深部イントロン突然変異である；

(ii) 中心体タンパク質290kDa (CEP290) の深部イントロン突然変異であり、場合によりヒトCEP290、および/または配列番号23に示される配列の深部イントロン突然変異を含む；

(iii) c. 2991 + 1655 A > G 突然変異である；

(iv) 核酸の5'スプライス供与部位の約1～10,000ヌクレオチド、約1～1000ヌクレオチドまたは約100～1000ヌクレオチド下流に位置する；

(v) 核酸の3'スプライス受容部位の約1～10,000ヌクレオチド、約1～100ヌクレオチドまたは約100～1000ヌクレオチド上流に位置する；または

(vi) 核酸中にスプライス供与部位またはスプライス受容部位を導入する；

20

請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】

(i) 第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAガイド配列は、中心体タンパク質290kDa (CEP290) 遺伝子の深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズし、場合によりヒトCEP290、および/または配列番号23に示される配列の深部イントロン突然変異を含む；

(ii) 第1のガイドRNAは、配列番号41、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号19、配列番号50、配列番号51または配列番号52の配列を含むDNAによってコードされる；

(iii) 第2のガイドRNAは、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号48、配列番号49、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号53または配列番号54の配列を含むDNAによってコードされる；

30

(iv) 第1のガイドRNAおよび/または第2のガイドRNAは、トランスクレオチド配列と融合されており、場合により該トランスクレオチド配列は、配列番号25によってコードされるヌクレオチド配列を含む；

(v) 第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよびCasタンパク質は、真核細胞において発現される；

(vi) 第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよび/またはCasタンパク質をコードする核酸は、1つまたはそれ以上の調節制御エレメントと作動可能に連結されている；および/または

40

(vii) 第1のガイドRNAおよび/または第2のガイドRNAは、RNAポリメラーゼⅡⅡプロモーター、場合によりU6、7SKまたはH1プロモーター、と作動可能に連結されている；および/または

(viii) Casタンパク質をコードする核酸は、RNAポリメラーゼⅡⅡプロモーター、場合により、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、CMVプロモーター(miniCMVプロモーター)由来の最小プロモーター断片、RSVLTR、MMLVLTR、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK)プロモーター、サルウイルス40(SV40)プロモーター、CK6プロモーター、トランスクレオチドプロモーター(TEGR)、TKプロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター(TRE)、HBVプロモーター、hAATプロモーター、LSPプロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター。

50

ロモーター (LSP) 、 E2F プロモーター、 E1F プロモーター、 テロメラーゼ (hTERT) プロモーター、 サイトメガロウイルスエンハンサー / ニワトリ - アクチン / ウサギ - グロビンプロモーター (CAG) プロモーター、 桿体オプシンプロモーター、 錐体オプシンプロモーター、 ホスホジエステラーゼ (PDE) プロモーター、 網膜色素変性症 (RP1) プロモーターまたは光受容体間レチノイド結合タンパク質遺伝子 (IRBP) プロモーター、 と作動可能に連結されている ;

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

Cas タンパク質は、 Cas9 タンパク質であり、 場合により、 Cas9 タンパク質 は

10

(i) 化膿性連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes) Cas9 タンパク質、 黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) Cas9 タンパク質、 ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) Cas9 タンパク質、 髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis) Cas9 タンパク質またはトレポネーマ・デンティコラ (Treponema denticola) Cas9 タンパク質である ; および / または 、

(ii) 真核細胞、 場合により哺乳動物のまたはヒトの細胞、 における発現のために最適化されたコドンである ;

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

20

CRISPR - Cas システムは、 1 つまたはそれ以上の核局在性シグナル (NLS) をさらに含み、 場合により、

(i) Cas タンパク質は、 1 つまたはそれ以上の NLS を含む ;

(ii) 該 NLS は、 SV40 ラージ T 抗原中の C 末端配列である ; および / または 、

(iii) 該 NLS は、 配列 P K K K R K V ( 配列番号 26 ) または P K K K R K V E D P K K K R K V D ( 配列番号 27 ) を含む ;

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

第 1 のガイド RNA 、 第 2 のガイド RNA または Cas タンパク質のうちの 1 つまたはそれ以上をコードする核酸は、 システムの同一または異なるベクター上に位置し、 場合により該ベクターは、 組換えアデノ隨伴ウイルス (rAAV) ベクター、 組換えアデノウイルスベクター、 組換えレンチウイルスベクター、 または、 組換え単純ヘルペスウイルス (HSV) ベクターである、 請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 10】

ベクターは、 組換え AAV (rAAV) ベクターであり、 そして第 1 のガイド RNA 、 第 2 のガイド RNA または Cas タンパク質のうちの 1 つまたはそれ以上をコードする核酸は、 1 つ、 2 つまたはそれ以上の AAV 逆方向末端反復 (ITR) 配列がその両端に位置する、 請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

AAV ITR は、 AAV1 、 AAV2 、 AAV3 、 AAV4 、 AAV5 、 AAV6 、 AAV7 、 AAV8 、 AAVrh8 、 AAVrh8R 、 AAV9 、 AAV10 、 AAVrh10 、 AAV11 、 AAV12 、 AAV2R471A 、 AAVDJ 、 ヤギAAV 、 ウシAAV またはマウスAAVキャプシド血清型 ITR であり、 そして AAV 粒子は、 AAV1 、 AAV2 、 AAV3 、 AAV4 、 AAV5 、 AAV6 、 AAV7 、 AAV8 、 AAVrh8 、 AAVrh8R 、 AAV9 、 AAV10 、 AAVrh10 、 AAV11 、 AAV12 、 AAV2R471A 、 AAV2/2-7m8 、 AAVDJ 、 AAV2N587A 、 AAV2E548A 、 AAV2N708A 、 AAVV708K 、 ヤギAAV 、 AAV1/AAV2キメラ 、 ウシAAV またはマウスAAVキャプシド rAAV2/HBoV1 血清型キャプシドを含むか、 または、 チロシン突然変異またはヘパラン結合突然変異を含む AAV1 、 AAV2 、 AAV8 、 AAVrh8R 、 AAV9 および / または A

40

50

A V r h 1 0 キャプシドを含み ; 場合によりベクターは、自己相補的ベクターである、請求項 1 0 に記載の組成物。

【請求項 1 2】

個体の核酸における深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療するための医薬を製造する方法における、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 1 3】

深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害は、眼の障害、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群、X 連鎖網膜色素変性症、無フィブリノーゲン血症、アルポート症候群、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体劣性多発性囊胞腎、バース症候群、サラセミア、先天性無フィブリノーゲン血症、先天性白内障・顔貌異常・ニューロパチー症候群、先天性グリコシル化異常症 I a 型、先天性グリコシル化異常症 I I 型、囊胞性線維症、ジヒドロブテリジンレダクターゼ欠乏症、ファブリー病、急性骨髓性白血病を伴う家族性血小板異常症、ファンコニ貧血、ギテルマン症候群、成長ホルモン不応症、フリードライヒ運動失調症、血友病 A、遺伝性巨赤芽球性貧血 1 、ヘルマンスキー・パドラック症候群、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、マルファン症候群、メチオニンシナーゼ欠乏症、メチルマロン酸血症、ミトコンドリア三機能タンパク質欠乏症、ムコ多糖症 I I 型、マルチミニコア病、筋ジストロフィー、神経線維腫症 I 型、ニーマン・ピック病 C 型、眼白子症 I 型、オルニチンデルタアミノトランスフェラーゼ欠損症、全身性エリテマトーデスの素因、プロピオン酸血症、ラブドトイド腫瘍、シュワルツ・ヤンペル症候群、ステイックラー症候群、全身性エリテマトーデス、結節性硬化症、ウェルナー症候群、X 連鎖高免疫グロブリン M 血症、または、X 連鎖低リン酸血症である、請求項 1 2 に記載の使用。

【請求項 1 4】

深部イントロン突然変異は、

( i ) 表 1 または表 2 に示される深部イントロン突然変異である；

( i i ) 中心体タンパク質 2 9 0 k D a ( C E P 2 9 0 ) の深部イントロン突然変異であり、場合によりヒト C E P 2 9 0 、および / または配列番号 2 3 に示される配列の深部イントロン突然変異を含む；または、

( i i i ) c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異である；

請求項 1 2 または 1 3 に記載の使用。

【請求項 1 5】

組成物は、個体の眼に投与され、場合により該投与は、網膜下または硝子体内である、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の組成物を含むキット。

【請求項 1 7】

ウイルスベクターを含むウイルス粒子であって、該ウイルスベクターは、

a ) 標的 D N A と反対側の D N A 鎖とハイブリダイズする、第 1 のガイド R N A および第 2 のガイド R N A であって、該標的 D N A は、深部イントロン突然変異と、該深部イントロン突然変異の両端に位置する配列とを含み、第 1 のガイドおよび第 2 のガイドは、該両端配列と反対側の部位にハイブリダイズする、前記第 1 のガイド R N A および第 2 のガイド R N A 、および

b ) C a s タンパク質をコードするヌクレオチド配列および第 1 のガイド R N A 標的部位を含む C a s 発現カセット、ここで、第 1 のガイド R N A または第 2 のガイド R N A は第 1 のガイド R N A 標的部位にハイブリダイズする、

を含む、遺伝子操作された、天然に存在しない C l u s t e r e d R e g u l a r l y I n t e r s p a c e d S h o r t P a l i n d r o m i c R e p e a t s ( C R I S P R ) - C R I S P R 関連 ( C a s ) ( C R I S P R - C a s ) システムをコードする核酸を含み、

10

20

30

40

50

該 Cas タンパク質は、該深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的 DNA 分子を切断し、それによって、該深部イントロン突然変異を含む標的 DNA の部分を切り出し；該 Cas タンパク質は、該 Cas 発現力セットから発現され；該 Cas タンパク質は、該第 1 のガイド RNA 標的部位で該 Cas 発現力セットを切断し、それによって、該 Cas 発現力セットの切断前の該 Cas タンパク質の発現と比較して、該 Cas タンパク質の発現を低減し；および、該ウイルスベクターは、組換えアデノ隨伴ウイルス (rAAV) ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクター、または、組換え単純ヘルペスウイルス (HSV) ベクターである、前記ウイルス粒子。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、すべての目的のために参照によってその全文を本明細書に組み入れる 2015 年 5 月 16 日に出願された米国特許仮出願番号第 62/162,720 号の優先権を主張する。

【0002】

ASCII テキストファイルでの配列表の提出

ASCII テキストファイルでの以下の提出の内容は、その全文を参照によって本明細書に組み入れる：配列表のコンピュータによって読み取り可能な形式 (CRF) (ファイル名：159792013440SEQLIST.TXT、記録日時：2016 年 4 月 14 日、サイズ：49KB)。

20

【0003】

本発明は、遺伝子操作された、天然に存在しないクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (CRISPR) - CRISPR 関連 (Cas) (CRISPR-Cas) システムを使用して、深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療するための方法ならびにそれと関連する組成物、キットおよびウイルス粒子に関する。

【背景技術】

30

【0004】

イントロンのような非コード配列中の突然変異は、幅広い疾患に関連している。ヒトゲノムは、虫およびハエのようなその他の生物よりも長いイントロンをより高い割合で含有し；ヒトイントロンの 90% 超は、100 ヌクレオチドを超える長さであり、すべてのイントロンの 3 分の 1 より多くは、2,000 ヌクレオチドまたはそれより長い (非特許文献 1)。さらに、深部イントロン突然変異は、ヒト疾患の重要な、無視されている可能性がある原因と同定されており、疾患と関連のある突然変異を同定する多くの試みは、コード配列に焦点を合わせていた (非特許文献 2)。ヒトにおける mRNA スプライシングの複雑性のために、これらの深部イントロン突然変異は、とりわけ、mRNA 不安定化、分解およびミススプライシング (例えば、潜在スプライシング部位を生成する) を含む機序のために、種々の病状を潜在的に引き起こし得る。実際、ヒトにおける、メンデルの法則に従った疾患の最大 5% は、深部イントロン突然変異と関連している可能性があると推定した人もいる (非特許文献 3)。

40

【0005】

いくつかの場合に深部イントロン突然変異と関連していた障害の例示的例として、レーバー先天黒内障 (LCA) は、人生の最初の 1 年において症状が発生する遺伝性網膜ジストロフィーの最も重症な形態である (非特許文献 4)。LCA 患者における視力は、20/400 よりも良好であることは稀である (非特許文献 5)。LCA は、一般集団中、30,000 人の個体あたりおよそ 1 人に影響を及ぼし、すべての遺伝性網膜ジストロフィーの 5% を占める (非特許文献 6)。欧州諸国におけるおよび米国におけるすべての LCA

50

A症例のおよそ15%を占める、LCAの最も頻繁な遺伝子的原因は、CEP290遺伝子のイントロン26中の深部イントロン突然変異c.2991+1655A>Gであり、これは、潜在スプライス供与部位を生成し、その結果、CEP290 mRNAの未熟な停止コドン(p.C998X)を含有する異常なエキソンを含むことになる(非特許文献7;非特許文献8;非特許文献9;非特許文献10)。CEP290突然変異によって引き起こされるLCA疾患は、LCA10として知られている。ホモ接合性患者における、すべてではないがいくつかのmRNA転写物において、潜在エキソンのCEP290 mRNAへの選択的スプライシングが起こっており(非特許文献11)、これは、このイントロン突然変異の低形質性を強調する。

## 【0006】

10

ヒトCEP290遺伝子は、2479アミノ酸のタンパク質をコードする54個のエキソンを包含する。CEP290は、纖毛の構築および纖毛タンパク質輸送の両方において重要な役割を果たす中心体タンパク質である(非特許文献12;非特許文献13)。CEP290突然変異によって最も影響を受ける網膜細胞である光受容体では、CEP290は、結合纖毛に局在し(非特許文献14)、これは、光受容体の内側セグメントおよび外側セグメントを結合する。

## 【0007】

現在、CEP290突然変異によって引き起こされるLCAの治療法はない。この疾患に立ち向かうための2つの前臨床アプローチとして、遺伝子増強およびアンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)がある。ヒトCEP290相補的DNA(cDNA)の大きさは、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)のカーゴサイズ(約4.8kb)を超える。レンチウイルスベクター系は、全長CEP290 cDNAを収容し得る;しかし、CEP290の発現レベルを正確に制御できない場合がある。これまでの報告は、光受容体は、導入遺伝子発現のレベルに対して感受性があり、CEP290の過剰発現は、細胞傷害性であることを実証した(非特許文献15;非特許文献16)。代替戦略は、AONを使用して、CEP290の異常なスプライシングを干渉することである(非特許文献17;非特許文献18)。しかし、このアプローチは、網膜の専門家による数年間にわたる毎週または毎月の網膜下注射を必要とする。

20

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

30

## 【0008】

【非特許文献1】Molecular Biology of the Cell、第6版(Alberts, B.ら編、2014)

【非特許文献2】Homolova, K.ら(2010)Hum. Mutat.第31巻:437~444頁

【非特許文献3】Cooper, D. N.ら(2010)Hum. Mutat.第31巻:631~655頁

【非特許文献4】Leber, T. K. G. v. (1869) Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology第15巻:1~25頁

40

【非特許文献5】Cremers, F. P. ら(2002)Human molecular genetics第11巻:1169~1176頁

【非特許文献6】Koenekoop, R. K. (2004) Survey of ophthalmology第49巻:379~398頁

【非特許文献7】den Hollander, A. I. ら(2006)Am. J. Hum. Genet.第79巻:556~561頁

【非特許文献8】Perrault, I. ら(2007)Hum. Mutat.第28巻:416頁

【非特許文献9】Stone, E. M. (2007)Am. J. Ophthalmol.第144巻:791~811頁

50

【非特許文献 10】Wiszniowski, W. ら (2011) Hum. Genet. 第 129巻: 319~327頁

【非特許文献 11】den Hollander, A. I. ら (2006) Am. J. Hum. Genet. 第 79巻: 556~561頁

【非特許文献 12】Barbelanne, M. ら (2013) Hum. Mol. Genet. 第 22巻: 2482~2494頁

【非特許文献 13】Craige, B. ら (2010) J. Cell Biol. 第 190巻: 927~940頁

【非特許文献 14】Chang, B. ら (2006) Hum. Mol. Genet. 第 15巻: 1847~1857頁

【非特許文献 15】Burnight, E. R. ら (2014) Gene Ther. 第 21巻: 662~672頁

【非特許文献 16】Tan, E. ら (2001) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 第 42巻: 589~600頁

【非特許文献 17】Collin, R. W. ら (2012) Mol. Ther. Nucleic Acids 第 1巻: e14

【非特許文献 18】Gerard, X. ら (2012) Mol. Ther. Nucleic Acids 第 1巻: e29

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

したがって、CEP290突然変異によって引き起こされるLCA10のような、深部イントロン突然変異と関連のある障害を治療するための改善された治療アプローチが緊急に必要である。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療するための組成物であって、該組成物が、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b) Casタンパク質とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連(Cas) (CRISPR-Cas)システムを含み、該Casタンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療するための組成物であって、該組成物が、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b) Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連(Cas) (CRISPR-Cas)システムをコードする核酸を含み、該Casタンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す組成物を提供する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害は、無フィブリノーゲン血症、アルポート症候群、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体劣性多発性囊胞腎、バース症候群、サラセミア、先天性無フィブリノーゲン血症、先天性白内障・顔貌異常・ニューロパチー症候群、先天性グリコシル化異常症Ia型、先天性グリコシル化異常症II型、囊胞性線維症、ジヒドロプロテリジンレダクターゼ欠乏症、ファブリー病、急性骨髓性白血病を伴う家族性血小板異常症、ファンコニ

10

20

30

40

50

貧血、ギテルマン症候群、成長ホルモン不応症、フリードライヒ運動失調症、血友病A、遺伝性巨赤芽球性貧血1、ヘルマンスキー・パドラック症候群、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、マルファン症候群、メチオニンシントーゼ欠乏症、メチルマロン酸血症、ミトコンドリア三機能タンパク質欠乏症、ムコ多糖症II型、マルチミニコア病、筋ジストロフィー、神経線維腫症I型、ニーマン・ピック病C型、眼白子症I型、オルニチンデルタアミノトランスフェラーゼ欠損症、全身性エリテマトーデスの素因、プロピオニ酸血症、ラブドトイド腫瘍、シュワルツ・ヤンペル症候群、スティックラー症候群、全身性エリテマトーデス、結節性硬化症、ウェルナー症候群、X連鎖高免疫グロブリンM血症またはX連鎖低リン酸血症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表1に示される深部イントロン突然変異である。

10

#### 【0011】

いくつかの態様では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患または障害を治療するための組成物であって、該組成物が、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b) Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連(Cas) (CRISPR-Cas)システムをコードする核酸を含み、該Casタンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患または障害を治療するための組成物であって、該組成物が、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b) Casタンパク質とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連(Cas) (CRISPR-Cas)システムを含み、該Casタンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す組成物を提供する。いくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群またはX連鎖網膜色素変性症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表2に示される深部イントロン突然変異である。

20

#### 【0012】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障である。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAガイド配列は、中心体タンパク質290kDa (CEP290) 遺伝子の深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、c. 2991 + 1655 A > G 突然変異である。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号41 (SpCas9の)、配列番号45 (SaCas9の)、配列番号46 (SaCas9の)または配列番号47 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号19 (SpCas9の)、配列番号50 (SaCas9の)、配列番号51 (SaCas9の)または配列番号52 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号42 (SpCas9の)、配列番号43 (SpCas9の)、配列番号44 (SpCas9の)、配列番号48 (SaCas9の)または配列番号49 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号20 (SpCas9の)、配列番号21 (SpCas9の)、配列番号22 (SpCas9の)、配列番号53 (SaCas9の)または配列番号54 (SaCas9の)の配列

30

40

50

を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、CEP290は、ヒトCEP290である。いくつかの実施形態では、CEP290は、配列番号23に示される配列の深部イントロン突然変異を含む。

#### 【0013】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の5'スプライス供与部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド下流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の3'スプライス受容部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド上流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子中にスプライス供与部位またはスプライス受容部位を導入する。

10

#### 【0014】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9タンパク質は、化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)Cas9タンパク質(配列番号40)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)Cas9タンパク質(配列番号55)、ストレプトコッカス・サーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)Cas9タンパク質、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)Cas9タンパク質またはトレポネーマ・デンティコラ(*Treponema denticola*)Cas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9は、真核細胞における発現のためにコドン最適化される。いくつかの実施形態では、真核細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、ヒト細胞である。

20

#### 【0015】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムは、1つまたはそれ以上の核局在性シグナル(NLS)をさらに含む。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、1つまたはそれ以上のNLSを含む。いくつかの実施形態では、NLSは、SV40ラージT抗原中のC末端配列である。いくつかの実施形態では、NLSは、配列PKKKRKV(配列番号26)またはPKKKRKVEDPKKKRKVD(配列番号27)を含む。

30

#### 【0016】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび/または第2のガイドRNAは、トランス活性化cr(*tracr*)配列と融合されている。いくつかの実施形態では、*tracr*配列は、配列番号25によってコードされるヌクレオチド配列を含む。

#### 【0017】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステム(例えば、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよびCasタンパク質)は、脂質、カチオン性脂質、リポソーム、ポリカチオンまたは核酸および/もしくはタンパク質の細胞取り込みを増強する物質と複合体形成されている。

40

#### 【0018】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよびCasタンパク質をコードする核酸は、真核細胞において発現される。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよび/またはCasタンパク質をコードする核酸は、1つまたはそれ以上の調節制御エレメントと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび/または第2のガイドRNAは、RNAポリメラーゼIIプロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼIIプロモーターは、U6、7SKまたはH1プロモーターである。いくつかの実施形態では、Casタンパク質をコードする核酸は、RNAポリメラーゼIIプロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では

50

、R N A ポリメラーゼ I I プロモーターは、サイトメガロウイルス ( C M V ) 最初期プロモーター、C M V プロモーター由来の最小プロモーター断片 ( m i n C M V プロモーター ) 、R S V L T R 、M o M L V L T R 、ホスホグリセリン酸キナーゼ - 1 ( P G K ) プロモーター、サルウイルス 4 0 ( S V 4 0 ) プロモーター、C K 6 プロモーター、トランスサイレチンプロモーター ( T T R ) 、T K プロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター ( T R E ) 、H B V プロモーター、h A A T プロモーター、L S P プロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター ( L S P ) 、E 2 F プロモーター、E F 1 プロモーター、テロメラーゼ ( h T E R T ) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー / ニワトリ - アクチン / ウサギ - グロビンプロモーター ( C A G ) プロモーター、桿体オプシンプロモーター、錐体オプシンプロモーター、ホスホジエステラーゼ ( P D E ) プロモーター、網膜色素変性症 ( R P 1 ) プロモーターまたは光受容体間レチノイド結合タンパク質遺伝子 ( I R B P ) プロモーターである。

## 【 0 0 1 9 】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、第 1 のガイド R N A 、第 2 のガイド R N A または C a s タンパク質のうちの 1 つまたはそれ以上をコードする核酸は、システムの同一または異なるベクター上に位置する。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミドである。いくつかの実施形態では、ベクターは、送達システムと複合体形成されている。いくつかの実施形態では、ベクターは、脂質、カチオン性脂質、リポソーム、ポリカチオンまたは核酸の細胞取り込みを増強する物質と複合体形成されている。

## 【 0 0 2 0 】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、ベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターまたは組換え単純ヘルペスウイルス ( H S V ) ベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えアデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型 2 、 1 、 5 、 6 、 1 9 、 3 、 1 1 、 7 、 1 4 、 1 6 、 2 1 、 1 2 、 1 8 、 3 1 、 8 、 9 、 1 0 、 1 3 、 1 5 、 1 7 、 1 9 、 2 0 、 2 2 、 2 3 、 2 4 ~ 3 0 、 3 7 、 4 0 、 4 1 、 A d H u 2 、 A d H u 3 、 A d H u 4 、 A d H u 2 4 、 A d H u 2 6 、 A d H u 3 4 、 A d H u 3 5 、 A d H u 3 6 、 A d H u 3 7 、 A d H u 4 1 、 A d H u 4 8 、 A d H u 4 9 、 A d H u 5 0 、 A d C 6 、 A d C 7 、 A d C 6 9 、 ウシ A d 3 型、イヌ A d 2 型、ヒツジ A d またはブタ A d 3 型に由来する。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型 2 またはアデノウイルス血清型 5 の変異体に由来する。

## 【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、組換えレンチウイルスベクターは、水泡性口内炎ウイルス ( V S V ) 、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス ( L C M V ) 、ロスリバーウイルス ( R R V ) 、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス ( M o k a l a v i r u s ) 、狂犬病ウイルス、R D 1 1 4 またはその変異体で偽型化されたレンチウイルスに由来する。

## 【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態では、ベクターは、r H S V ベクターである。いくつかの実施形態では、r H S V ベクターは、r H S V - 1 またはr H S V - 2 に由来する。

## 【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組換え A A V ( r A A V ) ベクターである。いくつかの実施形態では、第 1 のガイド R N A 、第 2 のガイド R N A または C a s タンパク質のうちの 1 つまたはそれ以上をコードする核酸は、1 つまたはそれ以上の A A V 逆方向末端反復 ( I T R ) 配列がその両端に位置する。いくつかの実施形態では、第 1 のガイド R N A 、第 2 のガイド R N A または C a s タンパク質のうちの 1 つまたはそれ以上をコードする核酸は、2 つの A A V I T R がその両端に位置する。いくつかの実施形態では、A A V I T R は、A A V 1 、A A V 2 、A A V 3 、A A V 4 、A A V 5 、A A V 6 、A A V 7 、A A V 8 、A A V r h 8 、A A V r h 8 R 、A A V 9 、A A V 1 0 、A A V r h

10

20

30

40

50

10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、ヤギAAV、ウシAAVまたはマウスAAVキャプシド血清型ITRである。いくつかの実施形態では、AAV ITRは、AAV2 ITRである。いくつかの実施形態では、ベクターは、自己相補的ベクターである。

【0024】

いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルス粒子中にキャプシド封入されている。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド封入する組換えアデノウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAdまたはブタAd3型に由来するキャプシドを含む。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2キャプシドまたはアデノウイルス血清型5キャプシドの変異体を含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド封入する組換えレンチウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えレンチウイルス粒子は、水泡性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス(Mokola virus)、狂犬病ウイルス、RD114またはその変異体で偽型化されたキャプシドを含む。

【0026】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えHSVベクターをキャプシド封入する組換えHSV粒子である。いくつかの実施形態では、組換えHSV粒子は、rHSV-1粒子またはrHSV-2ウイルス粒子である。

【0027】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えAAVベクターを含む組換えAAVウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えAAVウイルス粒子は、クレードA～Fに由来するAAV血清型キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、AAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAVまたはマウスAAVキャプシドrAAV2/HBoV1血清型キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、rAAVウイルス粒子のITRおよびキャプシドは、同一AAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、rAAVウイルス粒子のITRおよびキャプシドは、異なるAAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、組換えAAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9、および/またはAAVrh10キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9および/またはAAVrh10キャプシドは、チロシン突然変異またはヘパラン結合突然変異を含む。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、AAV2 ITRを含む。

【0028】

いくつかの態様では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療するための方法であって、該方法が、a)深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b)Casタンパク質とを含む、遺伝子操作された、天然

10

20

30

40

50

に存在しない Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連 (Cas) (CRISPR-Cas) システムを含む組成物の治療有効量を、個体に投与することを含み、該 Cas タンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的 DNA 分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的 DNA の部分を切り出す方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療するための方法であって、該方法が、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列の逆鎖とハイブリダイズする、第 1 のガイド RNA および第 2 のガイド RNA と、b) Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しない Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連 (Cas) (CRISPR-Cas) システムをコードする核酸を含む組成物の治療有効量を個体に投与することを含み、該 Cas タンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的 DNA 分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的 DNA の部分を切り出す方法を提供する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害は、無フィブリノーゲン血症、アルポート症候群、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体劣性多発性囊胞腎、バース症候群、サラセミア、先天性無フィブリノーゲン血症、先天性白内障・顔貌異常・ニューロパチー症候群、先天性グリコシル化異常症 Ia 型、先天性グリコシル化異常症 II 型、囊胞性線維症、ジヒドロプロテリジンレダクター欠乏症、ファブリー病、急性骨髓性白血病を伴う家族性血小板異常症、ファンコニ貧血、ギテルマン症候群、成長ホルモン不応症、フリードライヒ運動失調症、血友病 A、遺伝性巨赤芽球性貧血 1、ヘルマンスキー・パドラック症候群、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、マルファン症候群、メチオニンシナーゼ欠乏症、メチルマロン酸血症、ミトコンドリア三機能タンパク質欠乏症、ムコ多糖症 II 型、マルチミニコア病、筋ジストロフィー、神経線維腫症 I 型、ニーマン・ピック病 C 型、眼白子症 I 型、オルニチンデルタアミノトランスフェラーゼ欠損症、全身性エリテマトーデスの素因、プロピオン酸血症、ラブドトイド腫瘍、シュワルツ・ヤンペル症候群、スティックラー症候群、全身性エリテマトーデス、結節性硬化症、ウェルナー症候群、X 連鎖高免疫グロブリン M 血症または X 連鎖低リン酸血症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表 1 に示される深部イントロン突然変異である。

#### 【0029】

態様では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患または障害を治療するための方法であって、該方法が、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列の逆鎖とハイブリダイズする、第 1 のガイド RNA および第 2 のガイド RNA と、b) Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しない Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連 (Cas) (CRISPR-Cas) システムを含む組成物の治療有効量を、個体に投与することを含み、該 Cas タンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的 DNA 分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的 DNA の部分を切り出す方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患または障害を治療するための方法であって、該方法が、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列の逆鎖とハイブリダイズする、第 1 のガイド RNA および第 2 のガイド RNA と、b) Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しない Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連 (Cas) (CRISPR-Cas) システムをコードする核酸を含む組成物の治療有効量を、個体に投与することを含み、該 Cas タンパク質が、深部イントロン突然変異 10 20 30 40 50

異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す方法を提供する。いくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群またはX連鎖網膜色素変性症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表2に示される深部イントロン突然変異である。

#### 【0030】

上記の方法のいくつかの実施形態では、個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。いくつかの実施形態では、組成物は、個体の眼に投与される。いくつかの実施形態では、投与は、網膜下または硝子体内である。

#### 【0031】

上記の方法のいくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障である。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAガイド配列は、中心体タンパク質290kDa(CEP290)遺伝子の深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、c.2991+1655A>G突然変異である。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号41(SpCas9の)、配列番号45(SaCas9の)、配列番号46(SaCas9の)または配列番号47(SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号19(SpCas9の)、配列番号50(SaCas9の)、配列番号51(SaCas9の)または配列番号52(SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号42(SpCas9の)、配列番号43(SpCas9の)、配列番号44(SpCas9の)、配列番号48(SaCas9の)または配列番号49(SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号20(SpCas9の)、配列番号21(SpCas9の)、配列番号22(SpCas9の)、配列番号53(SaCas9の)または配列番号54(SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、CEP290は、ヒトCEP290である。いくつかの実施形態では、CEP290は、配列番号23に示される配列の深部イントロン突然変異を含む。

#### 【0032】

上記の方法のいくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の5'スプライス供与部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド下流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の3'スプライス受容部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド上流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子中にスプライス供与部位またはスプライス受容部位を導入する。

#### 【0033】

上記の方法のいくつかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9タンパク質は、化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)Cas9タンパク質、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)Casタンパク質、ストレプトコッカス・サーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)Cas9タンパク質、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)Cas9タンパク質またはトレポネーマ・デンティコラ(*Treponema denticola*)Cas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9は、真核細胞における発現のためにコドン最適化される。いくつかの実施形態では、真核細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、ヒト細胞である。

#### 【0034】

上記の方法のいくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムは、1つまたは

10

20

30

40

50

それ以上の核局在性シグナル (NLS) をさらに含む。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、1つまたはそれ以上のNLSを含む。いくつかの実施形態では、NLSは、SV40ラージT抗原中のC末端配列である。いくつかの実施形態では、NLSは、配列PKKKRKV (配列番号26) またはPKKKRKVEDPKKKRKVD (配列番号27) を含む。

#### 【0035】

上記の方法のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび/または第2のガイドRNAは、トランス活性化cr (tracr) 配列と融合されている。いくつかの実施形態では、tracr配列は、配列番号25によってコードされるヌクレオチド配列を含む。

10

#### 【0036】

上記の方法のいくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステム (例えば、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよびCasタンパク質) は、脂質、カチオン性脂質、リポソーム、ポリカチオンまたは核酸および/もしくはタンパク質の細胞取り込みを増強する物質と複合体形成されている。

#### 【0037】

上記の方法のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよびCasタンパク質をコードする核酸は、真核細胞において発現される。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよび/またはCasタンパク質をコードする核酸は、1つまたはそれ以上の調節制御エレメントと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび/または第2のガイドRNAは、RNAポリメラーゼIIプロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼIIプロモーターは、U6、7SKまたはH1プロモーターである。いくつかの実施形態では、Casタンパク質をコードする核酸は、RNAポリメラーゼIIプロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼIIプロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) 最初期プロモーター、CMVプロモーター由来の最小プロモーター断片 (minCMVプロモーター) 、RSV LTR、MoMLV LTR、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1 (PGK) プロモーター、サルウイルス40 (SV40) プロモーター、CK6プロモーター、トランスサイレチンプロモーター (TTT) 、TKプロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター (TRE) 、HBVプロモーター、hAATプロモーター、LSPプロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター (LSP) 、E2Fプロモーター、EF1プロモーター、テロメラーゼ (hTERT) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ-アクチン/ウサギ-グロビンプロモーター (CAG) プロモーター、桿体オプシンプロモーター、錐体オプシンプロモーター、ホスホジエステラーゼ (PDE) プロモーター、網膜色素変性症 (RP1) プロモーターまたは光受容体間レチノイド結合タンパク質遺伝子 (IRBP) プロモーターである。

20

#### 【0038】

上記の方法のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、システムの同一または異なるベクター上に位置する。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミドである。いくつかの実施形態では、ベクターは、送達システムと複合体形成されている。いくつかの実施形態では、ベクターは、脂質、カチオン性脂質、リポソーム、ポリカチオンまたは核酸の細胞取り込みを増強する物質と複合体形成されている。

30

#### 【0039】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、ベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターまたは組換え単純ヘルペスウイルス (HSV) ベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えアデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、

40

50

14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAdまたはブタAd3型に由来する。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2またはアデノウイルス血清型5の変異体に由来する。

#### 【0040】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、組換えレンチウイルスベクターは、水泡性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス(Mokola virus)、狂犬病ウイルス、RD114またはその変異体で偽型化されたレンチウイルスに由来する。

#### 【0041】

いくつかの実施形態では、ベクターは、rHSVベクターである。いくつかの実施形態では、rHSVベクターは、rHSV-1またはrHSV-2に由来する。

#### 【0042】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えAAV(rAAV)ベクターである。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、1つまたはそれ以上のAAV逆方向末端反復(ITS)配列がその両端に位置する。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、2つのAAV ITSがその両端に位置する。いくつかの実施形態では、AAV ITSは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、ヤギAAV、ウシAAVまたはマウスAAVキャプシド血清型ITSである。いくつかの実施形態では、AAV ITSは、AAV2 ITSである。いくつかの実施形態では、ベクターは、自己相補的ベクターである。

#### 【0043】

いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルス粒子中にキャプシド封入されている。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド封入する組換えアデノウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAdまたはブタAd3型に由来するキャプシドを含む。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2キャプシドまたはアデノウイルス血清型5キャプシドの変異体を含む。

#### 【0044】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド封入する組換えレンチウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えレンチウイルス粒子は、水泡性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス(Mokola virus)、狂犬病ウイルス、RD114またはその変異体で偽型化されたキャプシドを含む。

#### 【0045】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えHSVベクターをキャプシド封入す

10

20

30

40

50

る組換えHSV粒子である。いくつかの実施形態では、組換えHSV粒子は、rHSV-1粒子またはrHSV-2ウイルス粒子である。

【0046】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えAAVベクターを含む組換えAAVウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えAAVウイルス粒子は、クレードA~Fに由来するAAV血清型キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、AAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV-DJ、AAV2-N587A、AAV2-E548A、AAV2-N708A、AAV-V708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAVまたはマウスAAVキャプシドrAAV2/HB0V1血清型キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、rAAVウイルス粒子のITRおよびキャプシドは、同一AAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、rAAVウイルス粒子のITRおよびキャプシドは、異なるAAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、組換えAAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9、および/またはAAVrh10キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9および/またはAAVrh10キャプシドは、チロシン突然変異またはヘパラン結合突然変異を含む。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、AAV2-ITRを含む。

10

20

【0047】

上記の方法のいくつかの実施形態では、組成物は、医薬組成物である。

【0048】

いくつかの態様では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する障害を治療するための、上記の実施形態のいずれか1つの組成物の使用を提供する。いくつかの態様では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する障害を治療するための医薬の製造における、上記の実施形態のいずれか1つの組成物の使用を提供する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害は、無フィブリノーゲン血症、アルポート症候群、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体劣性多発性囊胞腎、バース症候群、サラセミア、先天性無フィブリノーゲン血症、先天性白内障・顔貌異常・ニューロパチー症候群、先天性グリコシル化異常症Ia型、先天性グリコシル化異常症II型、囊胞性線維症、ジヒドロプロテリジンレダクターゼ欠乏症、ファブリー病、急性骨髓性白血病を伴う家族性血小板異常症、ファンコニ貧血、ギテルマン症候群、成長ホルモン不応症、フリードライヒ運動失調症、血友病A、遺伝性巨赤芽球性貧血1、ヘルマンスキー・パドラック症候群、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、マルファン症候群、メチオニンシントーゼ欠乏症、メチルマロン酸血症、ミトコンドリア三機能タンパク質欠乏症、ムコ多糖症II型、マルチミニコア病、筋ジストロフィー、神経線維腫症I型、ニーマン・ピック病C型、眼白子症I型、オルニチンデルタアミノトランスフェラーゼ欠損症、全身性エリテマトーデスの素因、プロピオン酸血症、ラブドイド腫瘍、シュワルツ・ヤンペル症候群、スティックラー症候群、全身性エリテマトーデス、結節性硬化症、ウェルナー症候群、X連鎖高免疫グロブリンM血症またはX連鎖低リン酸血症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表1に示される深部イントロン突然変異である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害は、眼の疾患である。いくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群またはX連鎖網膜色素変性症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表2に示される深部イントロン突然変異である。いくつかの実施形態では、個体は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。いくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障である。

30

40

50

## 【0049】

上記の使用のいくつかの実施形態では、組成物は、個体の眼への投与のために製剤化される。いくつかの実施形態では、投与は、網膜下または硝子体内投与のために製剤化される。

## 【0050】

上記の使用のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAガイド配列は、中心体タンパク質290kDa (CEP290) 遺伝子の深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、c.2991+1655A>G突然変異である。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号41 (SpCas9の)、配列番号45 (SaCas9の)、配列番号46 (SaCas9の)または配列番号47 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号19 (SpCas9の)、配列番号50 (SaCas9の)、配列番号51 (SaCas9の)または配列番号52 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号42 (SpCas9の)、配列番号43 (SpCas9の)、配列番号44 (SpCas9の)、配列番号48 (SaCas9の)または配列番号49 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号20 (SpCas9の)、配列番号21 (SpCas9の)、配列番号22 (SpCas9の)、配列番号53 (SaCas9の)または配列番号54 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、CEP290は、ヒトCEP290である。いくつかの実施形態では、CEP290は、配列番号23に示される配列の深部イントロン突然変異を含む。

10

20

30

## 【0051】

上記の使用のいくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の5'スプライス供与部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド下流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の3'スプライス受容部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド上流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、スプライス供与部位またはスプライス受容部位を導入する。

## 【0052】

いくつかの態様では、本発明は、上記の実施形態のいずれか1つの組成物を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載される方法のいずれかにおいて使用するための、上記の実施形態のいずれか1つの組成物を含む。いくつかの実施形態では、キットは、使用のための説明書をさらに含む。

## 【0053】

いくつかの態様では、本発明は、ウイルスベクターを含むウイルス粒子であって、該ウイルスベクターが、a)個体の遺伝子における深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b)Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-CRISPR関連(Cas) (CRISPR-Cas)システムをコードする核酸を含み、該Casタンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切斷し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出すウイルス粒子を提供する。いくつかの実施形態では、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異は、無フィブリノーゲン血症、アルポート症候群、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体劣性多発性囊胞腎、バース症候群、サラセミア、先天性無フィブリノーゲン血症、先天性白内障・顔貌異常・ニューロパチー症候群、先天性グリコシル

40

50

化異常症 I a 型、先天性グリコシル化異常症 I I 型、囊胞性線維症、ジヒドロブテリジンレダクターゼ欠乏症、ファブリー病、急性骨髓性白血病を伴う家族性血小板異常症、ファンコニ貧血、ギテルマン症候群、成長ホルモン不応症、フリードライヒ運動失調症、血友病 A、遺伝性巨赤芽球性貧血 1、ヘルマンスキー・パドラック症候群、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、マルファン症候群、メチオニンシントーゼ欠乏症、メチルマロン酸血症、ミトコンドリア三機能タンパク質欠乏症、ムコ多糖症 I I 型、マルチミニコア病、筋ジストロフィー、神経線維腫症 I 型、ニーマン・ピック病 C 型、眼白子症 I 型、オルニチンデルタアミノトランスフェラーゼ欠損症、全身性エリテマトーデスの素因、プロピオニ酸血症、ラブドイド腫瘍、シュワルツ・ヤンペル症候群、スティックラー症候群、全身性エリテマトーデス、結節性硬化症、ウェルナー症候群、X 連鎖高免疫グロブリン M 血症または X 連鎖低リン酸血症と関連する。いくつかの実施形態では、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異は、表 1 に示される深部イントロン突然変異である。 10

#### 【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、無フィブリノーゲン血症、アルポート症候群、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体劣性多発性囊胞腎、バース症候群、サラセミア、先天性無フィブリノーゲン血症、先天性白内障・顔貌異常・ニューロパチー症候群、先天性グリコシル化異常症 I a 型、先天性グリコシル化異常症 I I 型、囊胞性線維症、ジヒドロブテリジンレダクターゼ欠乏症、ファブリー病、急性骨髓性白血病を伴う家族性血小板異常症、ファンコニ貧血、ギテルマン症候群、成長ホルモン不応症、フリードライヒ運動失調症、血友病 A、遺伝性巨赤芽球性貧血 1、ヘルマンスキー・パドラック症候群、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、マルファン症候群、メチオニンシントーゼ欠乏症、メチルマロン酸血症、ミトコンドリア三機能タンパク質欠乏症、ムコ多糖症 I I 型、マルチミニコア病、筋ジストロフィー、神経線維腫症 I 型、ニーマン・ピック病 C 型、眼白子症 I 型、オルニチンデルタアミノトランスフェラーゼ欠損症、全身性エリテマトーデスの素因、プロピオニ酸血症、ラブドイド腫瘍、シュワルツ・ヤンペル症候群、スティックラー症候群、全身性エリテマトーデス、結節性硬化症、ウェルナー症候群、X 連鎖高免疫グロブリン M 血症または X 連鎖低リン酸血症を有する個体を治療するために使用される。 20

#### 【 0 0 5 5 】

いくつかの態様では、本発明は、ウイルスベクターを含むウイルス粒子であって、該ウイルスベクターが、 a ) 眼の疾患または障害と関連する個体の遺伝子における深部イントロン突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列の逆鎖とハイブリダイズする、第 1 のガイド RNA および第 2 のガイド RNA と、 b ) Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しない Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR 関連 (Cas) (CRISPR-Cas) システムをコードする核酸を含み、該 Cas タンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的 DNA 分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的 DNA の部分を切り出すウイルス粒子を提供する。いくつかの実施形態では、眼の疾患または障害は、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群または X 連鎖網膜色素変性症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表 2 に示される深部イントロン突然変異である。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群または X 連鎖網膜色素変性症を治療するために使用される。 30 40

#### 【 0 0 5 6 】

いくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障である。いくつかの実施形態では、第 1 のガイド RNA および第 2 のガイド RNA ガイド配列は、中心体タンパク質 290 kDa (CEP290) 遺伝子の深部イントロン突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列の逆鎖とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変 50

異は、c. 2991 + 1655 A > G 突然変異である。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号41 (SpCas9の)、配列番号45 (SaCas9の)、配列番号46 (SaCas9の)または配列番号47 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号19 (SpCas9の)、配列番号50 (SaCas9の)、配列番号51 (SaCas9の)または配列番号52 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号42 (SpCas9の)、配列番号43 (SpCas9の)、配列番号44 (SpCas9の)、配列番号48 (SaCas9の)または配列番号49 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号20 (SpCas9の)、配列番号21 (SpCas9の)、配列番号22 (SpCas9の)、配列番号53 (SaCas9の)または配列番号54 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、CEP290は、ヒトCEP290である。いくつかの実施形態では、CEP290は、配列番号23に示される配列の深部イントロン突然変異を含む。  
10

#### 【0057】

上記のウイルス粒子のいくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の5'スプライス供与部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド下流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の3'スプライス受容部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド上流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子中にスプライス供与部位またはスプライス受容部位を導入する。  
20

#### 【0058】

上記のウイルス粒子のいくつかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9タンパク質は、化膿性連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes) Cas9タンパク質、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) Cas9タンパク質、ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) Cas9タンパク質またはトレポネーマ・デンティコラ (Treponema dentis) Cas9タンパク質またはトレポネーマ・デンティコラ (Treponema dentis) Cas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9は、真核細胞における発現のためにコドン最適化される。いくつかの実施形態では、真核細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、ヒト細胞である。  
30

#### 【0059】

上記のウイルス粒子のいくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムは、1つまたはそれ以上の核局在性シグナル (NL S) をさらに含む。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、1つまたはそれ以上のNL Sを含む。いくつかの実施形態では、NL Sは、SV40ラージT抗原中のC末端配列である。いくつかの実施形態では、NL Sは、配列PKKKRKV (配列番号26) またはPKKKRKVEDPKKKRKVD (配列番号27) を含む。  
40

#### 【0060】

上記のウイルス粒子のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび/または第2のガイドRNAは、トランス活性化cr (tracr) 配列と融合されている。いくつかの実施形態では、tracr配列は、配列番号25によってコードされるヌクレオチド配列を含む。

#### 【0061】

上記のウイルス粒子のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよびCasタンパク質をコードする核酸は、真核細胞において発現される。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよび/またはCasタン  
50

パク質をコードする核酸は、1つまたはそれ以上の調節制御エレメントと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび/または第2のガイドRNAは、RNAポリメラーゼIIIPロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼIIIPロモーターは、U6、7SKまたはH1プロモーターである。いくつかの実施形態では、Casタンパク質をコードする核酸は、RNAポリメラーゼIIIPロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼIIIPロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、CMVプロモーター由来の最小プロモーター断片(miniCMVプロモーター)、RSV-LTR、MoMLV-LTR、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK)プロモーター、サルウイルス40(SV40)プロモーター、CK6プロモーター、トランスサイレチンプロモーター(TTR)、TKプロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター(TRE)、HBVプロモーター、hAATプロモーター、LSPプロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター(LSP)、E2Fプロモーター、EF1プロモーター、テロメラーゼ(hTERT)プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ-アクチン/ウサギ-グロビンプロモーター(CAG)プロモーター、桿体オプシンプロモーター、錐体オプシンプロモーター、ホスホジエステラーゼ(PDE)プロモーター、網膜色素変性症(RP1)プロモーターまたは光受容体間レチノイド結合タンパク質遺伝子(IRBP)プロモーターである。

#### 【0062】

上記のウイルス粒子のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、システムの同一または異なるベクター上に位置する。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミドである。いくつかの実施形態では、ベクターは、送達システムと複合体形成されている。いくつかの実施形態では、ベクターは、脂質、カチオン性脂質、リポソーム、ポリカチオンまたは核酸の細胞取り込みを増強する物質と複合体形成されている。

#### 【0063】

上記のウイルス粒子のいくつかの実施形態では、ベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターまたは組換え単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えアデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24~30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAdまたはブタAd3型に由来する。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2またはアデノウイルス血清型5の変異体に由来する。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド封入する組換えアデノウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24~30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAdまたはブタAd3型に由来するキャプシドを含む。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2キャプシドまたはアデノウイルス血清型5キャプシドの変異体を含む。

#### 【0064】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えレンチウイルスベクターである。いくつ

10

20

30

40

50

かの実施形態では、組換えレンチウイルスベクターは、水泡性口内炎ウイルス（VSV）、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス（LCMV）、ロスリバーウイルス（RRV）、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス（Mokola virus）、狂犬病ウイルス、RD114またはその変異体で偽型化されたレンチウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド封入する組換えレンチウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えレンチウイルス粒子は、水泡性口内炎ウイルス（VSV）、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス（LCMV）、ロスリバーウイルス（RRV）、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス（Mokola virus）、狂犬病ウイルス、RD114またはその変異体で偽型化されたキャプシドを含む。

10

#### 【0065】

いくつかの実施形態では、ベクターは、rHSVベクターである。いくつかの実施形態では、rHSVベクターは、rHSV-1またはrHSV-2に由来する。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えHSVベクターをキャプシド封入する組換えHSV粒子である。いくつかの実施形態では、組換えHSV粒子は、rHSV-1粒子またはrHSV-2ウイルス粒子である。

#### 【0066】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えAAV（rAAV）ベクターである。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、1つまたはそれ以上のAAV逆方向末端反復（ITR）配列が両端に位置する。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、2つのAAV ITRが両端に位置する。いくつかの実施形態では、AAV ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV-DJ、ヤギAAV、ウシAAVまたはマウスAAVキャプシド血清型ITRである。いくつかの実施形態では、AAV ITRは、AAV2 ITRである。いくつかの実施形態では、ベクターは、自己相補的ベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えAAVベクターを含む組換えAAVウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えAAVウイルス粒子は、クレードA～Fに由来するAAV血清型キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、AAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV-DJ、AAV2\_N587A、AAV2\_E548A、AAV2\_N708A、AAV\_V708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAVまたはマウスAAVキャプシドrAAV2/HBov1血清型キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、rAAVウイルス粒子のITRおよびキャプシドは、同一AAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、rAAVウイルス粒子のITRおよびキャプシドは、異なるAAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、組換えAAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9および/またはAAVrh10キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9および/またはAAVrh10キャプシドは、チロシン突然変異またはヘパラン結合突然変異を含む。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、AAV2 ITRを含む。

20

#### 【0067】

上記のウイルス粒子のいくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、医薬組成物中にある。  
【0068】

いくつかの態様では、本発明は、a)真核細胞に、i)遺伝子中のイントロンの標的D

30

40

50

N A配列の逆鎖とハイブリダイズする単一ガイドR N Aと、i i ) C a sタンパク質をコードするヌクレオチド配列と、i i i ) 所望のイントロン突然変異およびプロトスペーサー隣接モチーフ( P A M )の両端に位置する相同性アームを含む相同性組換え修復( H D R )鋳型を含む一本鎖オリゴヌクレオチドとを含む、C R I S P R - C a sシステムをコードする核酸を導入することと、b ) 遺伝子中に組み込まれた突然変異を含む細胞を単離することとを含む、遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患のi n v i t r oモデルを作製するための方法を提供する。

#### 【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の5'スプライス供与部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド下流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の3'スプライス受容部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド上流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子中にスプライス供与部位またはスプライス受容部位を導入する。

#### 【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態では、P A Mは、細胞において発現されたC a sタンパク質による一本鎖オリゴヌクレオチドの切断を避けるために突然変異を含む。

#### 【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態では、C a sタンパク質は、C a s 9タンパク質である。いくつかの実施形態では、C a s 9タンパク質は、化膿性連鎖球菌( S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s ) C a s 9タンパク質、黄色ブドウ球菌( S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s ) C a s 9タンパク質、ストレプトコッカス・サーモフィルス( S t r e p t o c o c c u s t h e r m o p h i l u s ) C a s 9タンパク質、髄膜炎菌( N e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s ) C a s 9タンパク質またはトレポネマ・デンティコラ( T r e p o n e m a d e n t i c o l a ) C a s 9タンパク質である。いくつかの実施形態では、C a s 9は、真核細胞における発現のためにコドン最適化される。いくつかの実施形態では、真核細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、眼の細胞である。いくつかの実施形態では、眼の細胞は、網膜細胞である。

#### 【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態では、C R I S P R - C a sシステムは、1つまたはそれ以上の核局在性シグナル( N L S )をさらに含む。いくつかの実施形態では、C a sタンパク質は、1つまたはそれ以上のN L Sを含む。いくつかの実施形態では、N L Sは、S V 4 0 ラージT抗原中のC末端配列である。いくつかの実施形態では、N L Sは、配列P K K K R K V ( 配列番号2 6 )またはP K K K R K V E D P K K K R K V D ( 配列番号2 7 )を含む。

#### 【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態では、第1のガイドR N Aおよび/または第2のガイドR N Aは、トランス活性化c r ( t r a c r )配列と融合されている。いくつかの実施形態では、t r a c r配列は、配列番号2 5によってコードされるヌクレオチド配列を含む。

#### 【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態では、第1のガイドR N A、第2のガイドR N AおよびC a sタンパク質をコードする核酸は、真核細胞において発現される。いくつかの実施形態では、第1のガイドR N A、第2のガイドR N Aおよび/またはC a sタンパク質をコードする核酸は、1つまたはそれ以上の調節制御エレメントと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、第1のガイドR N Aおよび/または第2のガイドR N Aは、R N AポリメラーゼI I Iプロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、R N AポリメラーゼI I Iプロモーターは、U 6、7 S KまたはH 1プロモーターである。いくつかの実施形態では、C a sタンパク質をコードする核酸は、R N AポリメラーゼI

10

20

30

40

50

I プロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、R N A ポリメラーゼ I I プロモーターは、サイトメガロウイルス ( C M V ) 最初期プロモーター、C M V プロモーター由来の最小プロモーター断片 ( m i n C M V プロモーター ) 、R S V L T R 、M o M L V L T R 、ホスホグリセリン酸キナーゼ - 1 ( P G K ) プロモーター、サルウイルス 4 0 ( S V 4 0 ) プロモーター、C K 6 プロモーター、トランスサイレチンプロモーター ( T T R ) 、T K プロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター ( T R E ) 、H B V プロモーター、h A A T プロモーター、L S P プロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター ( L S P ) 、E 2 F プロモーター、E F 1 プロモーター、テロメラーゼ ( h T E R T ) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー / ニワトリ - アクチン / ウサギ - グロビンプロモーター ( C A G ) プロモーター、桿体オプシンプロモーター、錐体オプシンプロモーター、ホスホジエステラーゼ ( P D E ) プロモーター、網膜色素変性症 ( R P 1 ) プロモーターまたは光受容体間レチノイド結合タンパク質遺伝子 ( I R B P ) プロモーターである。

#### 【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、単一ガイドR N A 、C a s タンパク質または一本鎖オリゴヌクレオチドのうちの 1 つまたはそれ以上をコードする核酸は、システムの同一または異なるベクター上に位置する。

#### 【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群またはX連鎖網膜色素変性症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表 2 に示される深部イントロン突然変異である。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群またはX連鎖網膜色素変性症を治療するために使用される。

#### 【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障である。いくつかの実施形態では、第 1 のガイドR N A および第 2 のガイドR N A ガイド配列は、中心体タンパク質 2 9 0 k D a ( C E P 2 9 0 ) 遺伝子の深部イントロン突然変異の両端に位置する標的D N A 配列の逆鎖とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異である。いくつかの実施形態では、第 1 のガイドR N A は、配列番号 4 1 ( S p C a s 9 の ) 、配列番号 4 5 ( S a C a s 9 の ) 、配列番号 4 6 ( S a C a s 9 の ) または配列番号 4 7 ( S a C a s 9 の ) の配列を含むD N A によってコードされる。いくつかの実施形態では、第 1 のガイドR N A は、配列番号 1 9 ( S p C a s 9 の ) 、配列番号 5 0 ( S a C a s 9 の ) 、配列番号 5 1 ( S a C a s 9 の ) または配列番号 5 2 ( S a C a s 9 の ) の配列を含むD N A によってコードされる。いくつかの実施形態では、第 2 のガイドR N A は、配列番号 4 2 ( S p C a s 9 の ) 、配列番号 4 3 ( S p C a s 9 の ) 、配列番号 4 4 ( S p C a s 9 の ) 、配列番号 4 8 ( S a C a s 9 の ) または配列番号 4 9 ( S a C a s 9 の ) の配列を含むD N A によってコードされる。いくつかの実施形態では、第 2 のガイドR N A は、配列番号 2 0 ( S p C a s 9 の ) 、配列番号 2 1 ( S p C a s 9 の ) 、配列番号 2 2 ( S p C a s 9 の ) 、配列番号 5 3 ( S a C a s 9 の ) または配列番号 5 4 ( S a C a s 9 の ) の配列を含むD N A によってコードされる。いくつかの実施形態では、C E P 2 9 0 は、ヒトC E P 2 9 0 である。いくつかの実施形態では、C E P 2 9 0 は、配列番号 2 3 に示される配列の深部イントロン突然変異を含む。

#### 【 0 0 7 8 】

いくつかの態様では、本発明は、細胞において標的核酸を切断するための方法であって、該方法が、細胞に、 a ) 突然変異の両端に位置する標的D N A 配列の逆鎖とハイブリダイズする、第 1 のガイドR N A および第 2 のガイドR N A を含む、遺伝子操作された、天然に存在しないC l u s t e r e d R e g u l a r l y I n t e r s p a c e d S h o r t P a l i n d r o m i c R e p e a t s ( C R I S P R ) - C R I S P R 関

10

20

30

40

50

連 ( Cas ) ( CRISPR - Cas ) システムをコードする核酸と、 b ) i ) Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列および ii ) 第 1 のガイド RNA または第 2 のガイド RNA がハイブリダイズする第 1 のガイド RNA 標的部位を含む Cas 発現力セットとを含む組成物の有効量を送達することを含み、該 Cas タンパク質は、 Cas 発現力セットから発現され、 Cas タンパク質は、突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列を切断し、それによって、突然変異を含む標的 DNA の部分を切り出し、 Cas タンパク質は、第 1 のガイド RNA 標的部位で Cas 発現力セットを切断し、それによって、 Cas 発現力セットの切断前の Cas タンパク質の発現と比較して、 Cas タンパク質の発現を低減する方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、個体の核酸における突然変異と関連する疾患または障害を治療するための方法であって、該方法が、 a ) 突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列の逆鎖とハイブリダイズする、第 1 のガイド RNA および第 2 のガイド RNA を含む、遺伝子操作された、天然に存在しない Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ( CRISPR ) - CRISPR 関連 ( Cas ) ( CRISPR - Cas ) システムをコードする核酸と、 b ) i ) Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列および ii ) 第 1 のガイド RNA または第 2 のガイド RNA がハイブリダイズする第 1 のガイド RNA 標的部位を含む Cas 発現力セットとを含む組成物の治療有効量を個体に投与することを含み、該 Cas タンパク質が、 Cas 発現力セットから発現され、該 Cas タンパク質が、突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列を切断し、それによって、突然変異を含む標的 DNA の部分を切り出し、該 Cas タンパク質が、第 1 のガイド RNA 標的部位で Cas 発現力セットを切断し、それによって、 Cas 発現力セットの切断前の Cas タンパク質の発現と比較して、 Cas タンパク質の発現を低減する方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、個体の核酸における突然変異と関連する眼の疾患または障害を治療するための方法であって、該方法が、 a ) 突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列の逆鎖とハイブリダイズする、第 1 のガイド RNA および第 2 のガイド RNA を含む、遺伝子操作された、天然に存在しない Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ( CRISPR ) - CRISPR 関連 ( Cas ) ( CRISPR - Cas ) システムをコードする核酸と、 b ) i ) Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列および ii ) 第 1 のガイド RNA または第 2 のガイド RNA がハイブリダイズする第 1 のガイド RNA 標的部位を含む Cas 発現力セットとを含む組成物の治療有効量を個体に投与することを含み、該 Cas タンパク質が、 Cas 発現力セットから発現され、該 Cas タンパク質が、突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列を切断し、それによって、突然変異を含む標的 DNA の部分を切り出し、該 Cas タンパク質が、 Cas 発現力セットを、第 1 のガイド RNA 標的部位で切断し、それによって、 Cas 発現力セットの切断前の Cas タンパク質の発現と比較して、 Cas タンパク質の発現を低減する方法を提供する。いくつかの実施形態では、 Cas 発現力セットは、 iii ) 第 1 のガイド RNA または第 2 のガイド RNA がハイブリダイズする第 2 のガイド RNA 標的部位をさらに含み、 Cas タンパク質が、 Cas 発現力セットを、第 1 および第 2 のガイド RNA 標的部位で切断し、それによって、 Cas 発現力セットの切断前の Cas タンパク質の発現と比較して、 Cas タンパク質の発現を低減する。

#### 【 0079 】

上記の方法のいくつかの実施形態では、第 1 のガイド RNA は、第 1 のガイド RNA 標的部位および第 2 のガイド RNA 標的部位とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、第 2 のガイド RNA は、第 1 のガイド RNA 標的部位および第 2 のガイド RNA 標的部位とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、第 1 のガイド RNA は、第 1 のガイド RNA 標的部位とハイブリダイズし、第 2 のガイド RNA は、第 2 のガイド RNA 標的部位とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、 Cas 発現力セットは、 Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されているポリアデニル化 ( ポリ A ) 配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、ポリ A 配列は、 SV40 ポリ A 配

列である。いくつかの実施形態では、Casタンパク質による第1または第2のガイドRNA標的部位の切断は、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびポリア配列の間の作動可能な連結を妨げる。いくつかの実施形態では、第1または第2のガイドRNA標的部位は、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびポリア配列の間にある。いくつかの実施形態では、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、Cas発現力セットから発現されるCasタンパク質が、1つまたはそれ以上のNLSとインフレームで融合されるように、1つまたはそれ以上の核局在性シグナル(NLS)をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上のNLSをコードするヌクレオチド配列は、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびポリアデニル化(ポリア)配列の間にある。いくつかの実施形態では、第1または第2のガイドRNA標的部位は、1つまたはそれ以上のNLSをコードするヌクレオチド配列およびポリア配列の間にある。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上のNLSは、SV40ラージT抗原中のC末端配列を含む。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上のNLSは、配列PKKKRKV(配列番号26)またはPKKKRKVEDPKKKRKVD(配列番号27)を含む。いくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムをコードする核酸および/またはCas発現力セットは、1つまたはそれ以上の調節制御エレメントと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、プロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、Casタンパク質による第1または第2のガイドRNA標的部位の切断は、調節制御エレメントおよびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の間の作動可能な連結を妨げる。いくつかの実施形態では、第1または第2のガイドRNA標的部位は、プロモーターおよびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の間にある。10

#### 【0080】

上記の方法のいくつかの実施形態では、Cas発現力セットは、iii)第1のガイドRNAまたは第2のガイドRNAがハイブリダイズする第2のガイドRNA標的部位であって、Casタンパク質に特異的なプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と隣接する、第2のガイドRNA標的部位をさらに含み、Casタンパク質による第1のガイドRNA標的部位の切断が、調節制御エレメントおよびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の間の作動可能な連結を妨げ、Casタンパク質による第2のガイドRNA標的部位の切断が、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびポリア配列の間の作動可能な連結を妨げ、Casタンパク質の発現および標的DNA配列の切断の際に、Casタンパク質が、Cas発現力セットを、第1および第2のガイドRNA標的部位で切断し、それによって、Cas発現力セットの切断前のCasタンパク質の発現と比較して、Casタンパク質の発現を低減する。いくつかの実施形態では、Cas発現力セットは、iii)第1のガイドRNAまたは第2のガイドRNAがハイブリダイズする、第2のガイドRNA標的部位をさらに含み、第1のガイドRNA標的部位は、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されているプロモーターの間にあり、第2のガイドRNA標的部位は、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されているポリア配列の間にあり、Casタンパク質は、Cas発現力セットを、第1および第2のガイドRNA標的部位で切断し、それによって、Cas発現力セットの切断前のCasタンパク質の発現と比較して、Casタンパク質の発現を低減する。30

#### 【0081】

上記の方法のいくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害は、無フィブリノーゲン血症、アルポート症候群、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体劣性多発性囊胞腎、バース症候群、サラセミア、先天性無フィブリノーゲン血症、先天性白内障・顔貌異常・ニューロパチー症候群、先天性グリコシル化異常症Ia型、先天性グリコシル化異常症II型、囊胞性線維症、ジヒドロプロテリジ40

ンレダクターぜ欠乏症、ファブリー病、急性骨髓性白血病を伴う家族性血小板異常症、ファンコニ貧血、ギテルマン症候群、成長ホルモン不応症、フリードライヒ運動失調症、血友病A、遺伝性巨赤芽球性貧血1、ヘルマンスキー・パドラック症候群、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、マルファン症候群、メチオニンシントーゼ欠乏症、メチルマロン酸血症、ミトコンドリア三機能タンパク質欠乏症、ムコ多糖症II型、マルチミニコア病、筋ジストロフィー、神経線維腫症I型、ニーマン・ピック病C型、眼白子症I型、オルニチンデルタアミノトランスフェラーゼ欠損症、全身性エリテマトーデスの素因、プロピオン酸血症、ラブドトイド腫瘍、シュワルツ・ヤンペル症候群、スティックラー症候群、全身性エリテマトーデス、結節性硬化症、ウェルナー症候群、X連鎖高免疫グロブリンM血症またはX連鎖低リン酸血症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表1に示される深部イントロン突然変異である。 10

#### 【0082】

いくつかの態様では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患または障害を治療するための組成物であって、該組成物が、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b) Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-CRISPR関連(Cas)(CRISPR-Cas)システムをコードする核酸を含み、該Casタンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患または障害を治療するための組成物であって、該組成物が、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b) Casタンパク質とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-CRISPR関連(Cas)(CRISPR-Cas)システムを含み、該Casタンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す組成物を提供する。いくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群またはX連鎖網膜色素変性症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表2に示される深部イントロン突然変異である。 20

#### 【0083】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障である。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAガイド配列は、中心体タンパク質290kDa(CEP290)遺伝子の深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、c.2991+1655A>G突然変異である。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号41(SpCas9の)、配列番号45(SaCas9の)、配列番号46(SaCas9の)または配列番号47(SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号19(SpCas9の)、配列番号50(SaCas9の)、配列番号51(SaCas9の)または配列番号52(SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号42(SpCas9の)、配列番号43(SpCas9の)、配列番号44(SpCas9の)、配列番号48(SaCas9の)または配列番号49(SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号20(SpCas9の)、配列番号21(SpCas9の)、配列番号22(SpCas 30

10

20

30

40

50

9の)、配列番号53(SaCas9の)または配列番号54(SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、CEP290は、ヒトCEP290である。いくつかの実施形態では、CEP290は、配列番号23に示される配列の深部イントロン突然変異を含む。

#### 【0084】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の5'スプライス供与部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド下流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の3'スプライス受容部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまたは約100~1000ヌクレオチド上流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子中にスプライス供与部位またはスプライス受容部位を導入する。

#### 【0085】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9タンパク質は、化膿性連鎖球菌(*Strep tococcus pyogenes*)Cas9タンパク質(配列番号40)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)Cas9タンパク質(配列番号55)、 streptococcus・サーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)Cas9タンパク質、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)Cas9タンパク質またはトレポネーマ・デンティコラ(*Treponema denticola*)Cas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9は、真核細胞における発現のためにコドン最適化される。いくつかの実施形態では、真核細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、ヒト細胞である。

#### 【0086】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび/または第2のガイドRNAは、トランス活性化cr(*tracr*)配列と融合されている。いくつかの実施形態では、*tracr*配列は、配列番号25によってコードされるヌクレオチド配列を含む。

#### 【0087】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステム(例えば、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよびCasタンパク質)は、脂質、カチオン性脂質、リポソーム、ポリカチオンまたは核酸および/もしくはタンパク質の細胞取り込みを増強する物質と複合体形成されている。

#### 【0088】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよびCasタンパク質をコードする核酸は、真核細胞において発現される。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAおよび/またはCasタンパク質をコードする核酸は、1つまたはそれ以上の調節制御エレメントと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび/または第2のガイドRNAは、RNAポリメラーゼIIプロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼIIプロモーターは、U6、7SKまたはH1プロモーターである。いくつかの実施形態では、Casタンパク質をコードする核酸は、RNAポリメラーゼIIプロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼIIプロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、CMVプロモーター由来の最小プロモーター断片(mini CMVプロモーター)、RSV-LTR、MoMLV-LTR、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1(PGK)プロモーター、サルウイルス40(SV40)プロモーター、CK6プロモーター、トランスサイレチンプロモーター(TEGR)、TKプロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター(TRE)、HBVプロモーター、hAATプロモーター、LSPプロモータ

10

20

30

40

50

一、キメラ肝臓特異的プロモーター（LSP）、E2Fプロモーター、EF1プロモーター、テロメラーゼ（hERT）プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリ-アクチン／ウサギ-グロビンプロモーター（CAG）プロモーター、桿体オプシンプロモーター、錐体オプシンプロモーター、ホスホジエステラーゼ（PDE）プロモーター、網膜色素変性症（RP1）プロモーターまたは光受容体間レチノイド結合タンパク質遺伝子（IRBP）プロモーターである。

#### 【0089】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、システムの同一または異なるベクター上に位置する。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミドである。いくつかの実施形態では、ベクターは、送達システムと複合体形成されている。いくつかの実施形態では、ベクターは、脂質、カチオン性脂質、リポソーム、ポリカチオンまたは核酸の細胞取り込みを増強する物質と複合体形成されている。

10

#### 【0090】

上記の実施形態のいくつかの実施形態では、ベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターまたは組換え単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えアデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAdまたはブタAd3型に由来する。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2またはアデノウイルス血清型5の変異体に由来する。

20

#### 【0091】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、組換えレンチウイルスベクターは、水泡性口内炎ウイルス（VSV）、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス（LCMV）、ロスリバーウイルス（RRV）、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス（Mokola virus）、狂犬病ウイルス、RD114またはその変異体で偽型化されたレンチウイルスに由来する。

30

#### 【0092】

いくつかの実施形態では、ベクターは、rHSVベクターである。いくつかの実施形態では、rHSVベクターは、rHSV-1またはrHSV-2に由来する。

#### 【0093】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えAAV（rAAV）ベクターである。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、1つまたはそれ以上のAAV逆方向末端反復（ITR）配列がその両端に位置する。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、2つのAAV-ITRがその両端に位置する。いくつかの実施形態では、AAV-ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV-DJ、ヤギAAV、ウシAAVまたはマウスAAVキャプシド血清型ITRである。いくつかの実施形態では、AAV-ITRは、AAV2-ITRである。いくつかの実施形態では、ベクターは、自己相補的ベクターである。

40

#### 【0094】

いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルス粒子中にキャプシド封入されている。

50

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド封入する組換えアデノウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAdまたはブタAd3型に由来するキャプシドを含む。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2キャプシドまたはアデノウイルス血清型5キャプシドの変異体を含む。

10

#### 【0095】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド封入する組換えレンチウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えレンチウイルス粒子は、水泡性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス(Mokola virus)、狂犬病ウイルス、RD114またはその変異体で偽型化されたキャプシドを含む。

#### 【0096】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えHSVベクターをキャプシド封入する組換えHSV粒子である。いくつかの実施形態では、組換えHSV粒子は、rHSV-1粒子またはrHSV-2ウイルス粒子である。

20

#### 【0097】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えAAVベクターを含む組換えAAVウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えAAVウイルス粒子は、クレードA～Fに由来するAAV血清型キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、AAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV-DJ、AAV2\_N587A、AAV2\_E548A、AAV2\_N708A、AAV\_V708K、ヤギAAV、AAV1/AAV2キメラ、ウシAAVまたはマウスAAVキャプシドrAAV2/HBoV1血清型キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、rAAVウイルス粒子のITRおよびキャプシドは、同一AAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、rAAVウイルス粒子のITRおよびキャプシドは、異なるAAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、組換えAAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9、および/またはAAVrh10キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9および/またはAAVrh10キャプシドは、チロシン突然変異またはヘパラン結合突然変異を含む。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、AAV2\_ITRを含む。

30

#### 【0098】

いくつかの態様では、本発明は、細胞において標的核酸を切断するための組成物であって、該組成物が、a)突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする、第1のガイドRNAおよび第2のガイドを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats(CRISPR)-CRISPR関連(Cas)(CRISPR-Cas)システムをコードする核酸と、b)i)Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびii)第1のガイドRNAまたは第2のガイドRNAがハイブリダイズする第1のガイドRNA標的部位を含むCas発現カセットとを含み、該Casタンパク質が、Cas発現カセットから発現され、該Casタンパク質が、突然変異の両端に位置する標的DNA配列を切断し、それによって、突然変異を含む標的DN

40

50

Aの部分を切り出し、該 Cas タンパク質が、第 1 のガイド RNA 標的部位で Cas 発現力セットを切断し、それによって、Cas 発現力セットの切断前の Cas タンパク質の発現と比較して、Cas タンパク質の発現を低減する組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、個体の核酸における突然変異と関連する疾患または障害を治療するための組成物であって、該組成物が、a) 突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列の逆鎖とハイブリダイズする、第 1 のガイド RNA および第 2 のガイド RNA を含む、遺伝子操作された、天然に存在しない Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR 関連 (Cas) (CRISPR - Cas) システムをコードする核酸と、b) i) Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列および ii) 第 1 のガイド RNA または第 2 のガイド RNA がハイブリダイズする第 1 のガイド RNA 標的部位を含む Cas 発現力セットとを含み、該 Cas タンパク質が、Cas 発現力セットから発現され、該 Cas タンパク質が、突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列を切断し、それによって、突然変異を含む標的 DNA の部分を切り出し、該 Cas タンパク質が、第 1 のガイド RNA 標的部位で Cas 発現力セットを切断し、それによって、Cas 発現力セットの切断前の Cas タンパク質の発現と比較して、Cas タンパク質の発現を低減する組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、個体の核酸における突然変異と関連する眼の疾患または障害を治療するための組成物であって、該組成物が、a) 突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列の逆鎖とハイブリダイズする、第 1 のガイド RNA および第 2 のガイド RNA を含む、遺伝子操作された、天然に存在しない Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR 関連 (Cas) (CRISPR - Cas) システムをコードする核酸と、b) i) Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列および ii) 第 1 のガイド RNA または第 2 のガイド RNA がハイブリダイズする第 1 のガイド RNA 標的部位を含む Cas 発現力セットとを含み、該 Cas タンパク質が、Cas 発現力セットから発現され、該 Cas タンパク質が、突然変異の両端に位置する標的 DNA 配列を切断し、それによって、突然変異を含む標的 DNA の部分を切り出し、該 Cas タンパク質が、Cas 発現力セットを、第 1 のガイド RNA 標的部位で切断し、それによって、Cas 発現力セットの切断前の Cas タンパク質の発現と比較して、Cas タンパク質の発現を低減する組成物を提供する。いくつかの実施形態では、Cas 発現力セットは、i) ii) 第 1 のガイド RNA または第 2 のガイド RNA がハイブリダイズする第 2 のガイド RNA 標的部位をさらに含み、Cas タンパク質が、Cas 発現力セットを、第 1 および第 2 のガイド RNA 標的部位で切断し、それによって、Cas 発現力セットの切断前の Cas タンパク質の発現と比較して、Cas タンパク質の発現を低減する。

#### 【 0099 】

上記の組成物のいくつかの実施形態では、第 1 のガイド RNA は、第 1 のガイド RNA 標的部位および第 2 のガイド RNA 標的部位とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、第 2 のガイド RNA は、第 1 のガイド RNA 標的部位および第 2 のガイド RNA 標的部位とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、第 1 のガイド RNA は、第 1 のガイド RNA 標的部位とハイブリダイズし、第 2 のガイド RNA は、第 2 のガイド RNA 標的部位とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、Cas 発現力セットは、Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されているポリアデニル化 (ポリ A) 配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、ポリ A 配列は、SV40 ポリ A 配列である。いくつかの実施形態では、Cas タンパク質による第 1 または第 2 のガイド RNA 標的部位の切断は、Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列およびポリ A 配列の間の作動可能な連結を妨げる。いくつかの実施形態では、第 1 または第 2 のガイド RNA 標的部位は、Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列およびポリ A 配列の間にある。いくつかの実施形態では、Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、Cas 発現力セットから発現される Cas タンパク質が、1 つまたはそれ以上の NLS とインフレームで融合されるように、1 つまたはそれ以上の核局在性シグナル (NLS) 10 20 30 40 50

をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上のNLSをコードするヌクレオチド配列は、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびポリアデニル化(ポリA)配列の間にある。いくつかの実施形態では、第1または第2のガイドRNA標的部位は、1つまたはそれ以上のNLSをコードするヌクレオチド配列およびポリA配列の間にある。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上のNLSは、SV40ラージT抗原中のC末端配列を含む。いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上のNLSは、配列PKKKRKV(配列番号26)またはPKKKRKVEDPKKKRKVD(配列番号27)を含む。いくつかの実施形態では、CRISP-R-Casシステムをコードする核酸および/またはCas発現力セットは、1つまたはそれ以上の調節制御エレメントと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、プロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、Casタンパク質による第1または第2のガイドRNA標的部位の切断は、調節制御エレメントおよびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の間の作動可能な連結を妨げる。いくつかの実施形態では、第1または第2のガイドRNA標的部位は、プロモーターおよびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の間にある。

#### 【0100】

上記の組成物のいくつかの実施形態では、Cas発現力セットは、i i i)第1のガイドRNAまたは第2のガイドRNAがハイブリダイズする第2のガイドRNA標的部位であって、Casタンパク質に特異的なプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と隣接する、第2のガイドRNA標的部位をさらに含み、Casタンパク質による第1のガイドRNA標的部位の切断は、調節制御エレメントおよびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の間の作動可能な連結を妨げ、Casタンパク質による第2のガイドRNA標的部位の切断は、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびポリA配列の間の作動可能な連結を妨げ、Casタンパク質の発現および標的DNA配列の切断の際に、Casタンパク質は、Cas発現力セットを、第1および第2のガイドRNA標的部位で切断し、それによって、Cas発現力セットの切断前のCasタンパク質の発現と比較して、Casタンパク質の発現を低減する。いくつかの実施形態では、Cas発現力セットは、i i i)第1のガイドRNAまたは第2のガイドRNAがハイブリダイズする第2のガイドRNA標的部位をさらに含み、第1のガイドRNA標的部位は、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されているプロモーターの間にあり、第2のガイドRNA標的部位は、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されているポリA配列の間にあり、Casタンパク質は、Cas発現力セットを、第1および第2のガイドRNA標的部位で切断し、それによって、Cas発現力セットの切断前のCasタンパク質の発現と比較して、Casタンパク質の発現を低減する。

#### 【0101】

上記の組成物のいくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害は、無フィブリノーゲン血症、アルポート症候群、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体劣性多発性囊胞腎、バース症候群、サラセミア、先天性無フィブリノーゲン血症、先天性白内障・顔貌異常・ニューロパチー症候群、先天性グリコシル化異常症Ia型、先天性グリコシル化異常症II型、囊胞性線維症、ジヒドロプロテリジンレダクターゼ欠乏症、ファブリー病、急性骨髓性白血病を伴う家族性血小板異常症、ファンコニ貧血、ギテルマン症候群、成長ホルモン不応症、フリードライヒ運動失調症、血友病A、遺伝性巨赤芽球性貧血1、ヘルマンスキー・パドラック症候群、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、マルファン症候群、メチオニンシントーゼ欠乏症、メチルマロン酸血症、ミトコンドリア三機能タンパク質欠乏症、ムコ多糖症II型、マルチミニコア病、筋ジストロフィー、神経線維腫症I型、ニーマン・ピック病C型、眼白子症I型、オルニチンデルタアミノトランスフェラーゼ欠損症、全身性エリテマトーデスの素因、

プロピオン酸血症、ラブドイド腫瘍、シュワルツ・ヤンペル症候群、スティックラー症候群、全身性エリテマトーデス、結節性硬化症、ウェルナー症候群、X連鎖高免疫グロブリンM血症またはX連鎖低リン酸血症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表1に示される深部イントロン突然変異である。

【0102】

いくつかの態様では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患または障害を治療するための組成物であって、該組成物が、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b) Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連(Cas) (CRISPR-Cas)システムをコードする核酸を含み、該Casタンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患または障害を治療するための組成物であって、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b) Casタンパク質とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連(Cas) (CRISPR-Cas)システムを含み、該Casタンパク質が、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す組成物を提供する。いくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群またはX連鎖網膜色素変性症である。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、表2に示される深部イントロン突然変異である。

【0103】

上記の組成物のいくつかの実施形態では、眼の疾患は、レーバー先天黒内障である。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAガイド配列は、中心体タンパク質290kDa (CEP290) 遺伝子の深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、c. 2991 + 1655 A > G 突然変異である。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号41 (SpCas9の)、配列番号45 (SaCas9の)、配列番号46 (SaCas9の)または配列番号47 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNAは、配列番号19 (SpCas9の)、配列番号50 (SaCas9の)、配列番号51 (SaCas9の)または配列番号52 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号42 (SpCas9の)、配列番号43 (SpCas9の)、配列番号44 (SpCas9の)、配列番号48 (SaCas9の)または配列番号49 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、第2のガイドRNAは、配列番号20 (SpCas9の)、配列番号21 (SpCas9の)、配列番号22 (SpCas9の)、配列番号53 (SaCas9の)または配列番号54 (SaCas9の)の配列を含むDNAによってコードされる。いくつかの実施形態では、CEP290は、ヒトCEP290である。いくつかの実施形態では、CEP290は、配列番号23に示される配列の深部イントロン突然変異を含む。

【0104】

上記の組成物のいくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の5'スプライス供与部位の約1~10,000ヌクレオチド、約1~1000ヌクレオチドまた

10

20

30

40

50

は約 100 ~ 1000 ヌクレオチド下流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子の 3' スプライス受容部位の約 1 ~ 10,000 ヌクレオチド、約 1 ~ 1000 ヌクレオチドまたは約 100 ~ 1000 ヌクレオチド上流に位置する。いくつかの実施形態では、深部イントロン突然変異は、遺伝子中にスプライス供与部位またはスプライス受容部位を導入する。

#### 【0105】

上記の組成物のいくつかの実施形態では、Cas タンパク質は、Cas9 タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9 タンパク質は、化膿性連鎖球菌 ( *Streptococcus pyogenes* ) Cas9 タンパク質 ( 配列番号 40 ) 、黄色ブドウ球菌 ( *Staphylococcus aureus* ) Cas9 タンパク質 ( 配列番号 5 10 5 ) 、ストレプトコッカス・サーモフィルス ( *Streptococcus thermophilus* ) Cas9 タンパク質、髄膜炎菌 ( *Neisseria meningitidis* ) Cas9 タンパク質またはトレポネーマ・デンティコラ ( *Treponema denticola* ) Cas9 タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9 は、真核細胞における発現のためにコドン最適化される。いくつかの実施形態では、真核細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、ヒト細胞である。

#### 【0106】

上記の組成物のいくつかの実施形態では、第 1 のガイド RNA および / または第 2 のガイド RNA は、トランス活性化 cr ( *tracr* ) 配列と融合されている。いくつかの実施形態では、 *tracr* 配列は、配列番号 25 によってコードされるヌクレオチド配列を含む。 20

#### 【0107】

上記の組成物のいくつかの実施形態では、CRISPR-Cas システム ( 例えば、第 1 のガイド RNA 、第 2 のガイド RNA および Cas タンパク質 ) は、脂質、カチオン性脂質、リポソーム、ポリカチオンまたは核酸および / もしくはタンパク質の細胞取り込みを増強する物質と複合体形成されている。

#### 【0108】

上記の組成物のいくつかの実施形態では、第 1 のガイド RNA 、第 2 のガイド RNA および Cas タンパク質をコードする核酸は、真核細胞において発現される。いくつかの実施形態では、第 1 のガイド RNA 、第 2 のガイド RNA および / または Cas タンパク質をコードする核酸は、1 つまたはそれ以上の調節制御エレメントと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、第 1 のガイド RNA および / または第 2 のガイド RNA は、 RNA ポリメラーゼ II プロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、 RNA ポリメラーゼ II プロモーターは、 U6 、 7SK または H1 プロモーターである。いくつかの実施形態では、 Cas タンパク質をコードする核酸は、 RNA ポリメラーゼ II プロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、 RNA ポリメラーゼ II プロモーターは、サイトメガロウイルス ( CMV ) 最初期プロモーター、 CMV プロモーター由来の最小プロモーター断片 ( minCMV プロモーター ) 、 RSV LTR 、 MMLV LTR 、ホスホグリセリン酸キナーゼ -1 ( PGK ) プロモーター、サルウイルス 40 ( SV40 ) プロモーター、 CK6 プロモーター、トランスサイレチンプロモーター ( TTR ) 、 TK プロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター ( TRE ) 、 HBV プロモーター、 hAAT プロモーター、 LSP プロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター ( LSP ) 、 E2F プロモーター、 E F 1 プロモーター、テロメラーゼ ( hTERT ) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー / ニワトリ - アクチン / ウサギ - グロビンプロモーター ( CAG ) プロモーター、桿体オプシンプロモーター、錐体オプシンプロモーター、ホスホジエステラーゼ ( PDE ) プロモーター、網膜色素変性症 ( RP1 ) プロモーターまたは光受容体間レチノイド結合タンパク質遺伝子 ( IRBP ) プロモーターである。 40

#### 【0109】

上記の組成物のいくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、システムの同一または異なるベクター上に位置する。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミドである。いくつかの実施形態では、ベクターは、送達システムと複合体形成されている。いくつかの実施形態では、ベクターは、脂質、カチオン性脂質、リポソーム、ポリカチオニンまたは核酸の細胞取り込みを増強する物質と複合体形成されている。

#### 【0110】

上記の組成物のいくつかの実施形態では、ベクターは、組換えアデノ隨伴ウイルス(rAAV)ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターまたは組換え単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えアデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAdまたはブタAd3型に由来する。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型2またはアデノウイルス血清型5の変異体に由来する。

#### 【0111】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、組換えレンチウイルスベクターは、水泡性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス(Mokola virus)、狂犬病ウイルス、RD114またはその変異体で偽型化されたレンチウイルスに由来する。

#### 【0112】

いくつかの実施形態では、ベクターは、rHSVベクターである。いくつかの実施形態では、rHSVベクターは、rHSV-1またはrHSV-2に由来する。

#### 【0113】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えAAV(rAAV)ベクターである。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、1つまたはそれ以上のAAV逆方向末端反復(ITSR)配列がその両端に位置する。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA、第2のガイドRNAまたはCasタンパク質のうちの1つまたはそれ以上をコードする核酸は、2つのAAV-ITSRがその両端に位置する。いくつかの実施形態では、AAV-ITSRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV-DJ、ヤギAAV、ウシAAVまたはマウスAAVキャプシド血清型ITSRである。いくつかの実施形態では、AAV-ITSRは、AAV2-ITSRである。いくつかの実施形態では、ベクターは、自己相補的ベクターである。

#### 【0114】

いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルス粒子中にキャプシド封入されている。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド封入する組換えアデノウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウ

10

20

30

40

50

シ A d 3 型、イヌ A d 2 型、ヒツジ A d またはブタ A d 3 型に由来するキャプシドを含む。いくつかの実施形態では、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型 2 キャプシドまたはアデノウイルス血清型 5 キャプシドの変異体を含む。

【 0 1 1 5 】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド封入する組換えレンチウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換えレンチウイルス粒子は、水泡性口内炎ウイルス ( V S V ) 、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス ( L C M V ) 、ロスリバーウイルス ( R R V ) 、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス ( M o k a l a v i r u s ) 、狂犬病ウイルス、 R D 1 1 4 またはその変異体で偽型化されたキャプシドを含む。

10

【 0 1 1 6 】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換え H S V ベクターをキャプシド封入する組換え H S V 粒子である。いくつかの実施形態では、組換え H S V 粒子は、 r H S V - 1 粒子または r H S V - 2 ウイルス粒子である。

【 0 1 1 7 】

いくつかの実施形態では、ウイルス粒子は、組換え A A V ベクターを含む組換え A A V ウィルス粒子である。いくつかの実施形態では、組換え A A V ウィルス粒子は、クレード A ~ F に由来する A A V 血清型キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、 A A V ウィルス粒子は、 A A V 1 、 A A V 2 、 A A V 3 、 A A V 4 、 A A V 5 、 A A V 6 、 A A V 7 、 A A V 8 、 A A V r h 8 、 A A V r h 8 R 、 A A V 9 、 A A V 1 0 、 A A V r h 1 0 、 A A V 1 1 、 A A V 1 2 、 A A V 2 R 4 7 1 A 、 A A V 2 / 2 - 7 m 8 、 A A V D J 、 A A V 2 N 5 8 7 A 、 A A V 2 E 5 4 8 A 、 A A V 2 N 7 0 8 A 、 A A V V 7 0 8 K 、ヤギ A A V 、 A A V 1 / A A V 2 キメラ、ウシ A A V またはマウス A A V キャプシド r A A V 2 / H B o V 1 血清型キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、 r A A V ウィルス粒子の I T R およびキャプシドは、同一 A A V 血清型に由来する。いくつかの実施形態では、 r A A V ウィルス粒子の I T R およびキャプシドは、異なる A A V 血清型に由来する。いくつかの実施形態では、組換え A A V ウィルス粒子は、 A A V 1 、 A A V 2 、 A A V 8 、 A A V r h 8 R 、 A A V 9 、および / または A A V r h 1 0 キャプシドを含む。いくつかの実施形態では、 A A V 1 、 A A V 2 、 A A V 8 、 A A V r h 8 R 、 A A V 9 および / または A A V r h 1 0 キャプシドは、チロシン突然変異またはヘパラン結合突然変異を含む。いくつかの実施形態では、 r A A V ベクターは、 A A V 2 I T R を含む。

20

【 0 1 1 8 】

特許出願および刊行物を含む、本明細書において引用されるすべての参考文献は、参照によりその全文を組み入れる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 1 9 】

【 図 1 】 C E P 2 9 0 遺伝子におけるイントロン c . 2 2 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異の模式図である。 A > G 突然変異は、イントロン 2 6 内に位置する潜在性エキソンの 5 ' スプライス部位の + 5 位で起こる。 C E P 2 9 0 エキソン 2 6 からエキソン 2 7 領域のエキソン - イントロン構造を、野生型 ( 実線 ) および突然変異体 ( 破線 ) の転写物に関するスプライシングパターンと共に、それぞれ、四角および線で表す。突然変異ヌクレオチドを太字および下線で示し、黒い星印で表す。潜在性エキソンの 5 ' スプライス部位配列を、 B D G P : ニューラルネットワークによるスプライス部位予測 ( 例えば、 w w w . f r u i t f l y . o r g / s e q \_ t o o l s / s p l i c e . h t m l 、および R e e s e , M . G . e t a l . ( 1 9 9 7 ) J . C o m p u t . B i o l . 4 : 3 1 1 ~ 3 2 3 頁を参照されたい ) によって計算したそのスプライス部位の強さスコアと共に示す。エキソンヌクレオチドを大文字で示す。エキソンおよびイントロンのサイズを図の下に注釈する。

40

【 図 2 】 C E P 2 9 0 の c . 2 2 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異の両端に位置するイント

50

ロン領域を欠失させる戦略を示す模式図である。上流の s g R N A は、インtron 突然変異の上流に位置する第 1 の C a s 9 切断を導き、下流の s g R N A は、突然変異の下流に位置する第 2 の C a s 9 切断を導く。上流の標的座は、潜在性エキソンの上流または潜在性エキソン内のいずれかに位置することができることに注目されたい。2 つの切断末端を、非相同性末端結合 (N H E J) プロセスを通して直接ライゲートすると、c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異の両端に位置するインtron 断片が欠失される。インtron 2 6 はさらに、m R N A プロセシングの際に R N A スプライシングによって除去される。

【図 3】異なる細胞株における m R N A (図 3 A および 3 B) およびタンパク質 (図 3 C) 発現レベルを示す。図 3 A および 3 B は、野生型細胞 (白色の棒グラフ)、c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G および c . 2 9 9 1 + 1 6 6 6 C > G 突然変異を有する染色体に関してヘテロ接合である細胞 (灰色の棒グラフ)、ならびにホモ接合 c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G および c . 2 9 9 1 + 1 6 6 6 C > G 細胞 (突然変異体細胞；黒色の棒グラフ) における、R T - q P C R によって決定した野生型 (図 3 A) および突然変異体 (図 3 B) m R N A の基礎発現レベルのグラフを示す。データは、3 回の独立したトランスフェクションからの試料の平均値 ± 標準偏差 (n = 3) として表す。一元配置 A N O V A の後にテューキーの H S D 事後検定を使用して比較を実施した。\* = p < 0 . 0 5, \*\* = p < 0 . 0 1, \*\*\* = p < 0 . 0 0 1。図 3 C は、野生型細胞 (W T)、ヘテロ接合細胞 (H e t)、および突然変異体細胞 (M T) から調製したライセートのイムノプロットである。メンブレンを、C E P 2 9 0 (上) およびローディング対照としてのベータ - アクチン (下) に関してプロービングした。

【図 4】P C R (図 4 A) および次世代シーケンシング (図 4 B) によって決定した、s g R N A 対および S p C a s 9 による標的化欠失の効率を示す。図 4 A では、予想される欠失領域の外側のプライマーを使用した。上のバンドは、野生型 C E P 2 9 0 のインtron 2 6 から増幅された P C R 産物であり、下のバンドは、予想されるゲノム欠失後の C E P 2 9 0 対立遺伝子から増幅された P C R 産物である (それぞれ、「W t」および「T r u n c」と表示する)。M、1 k b DNA ラダー。図 4 B は、次世代シーケンシング (N G S) によって決定した、s g R N A 対および S p C a s 9 をトランスフェクトした突然変異体細胞における D N A の野生型およびトランケート型の百分率を示す。

【図 5】s g R N A 対および S p C a s 9 による C E P 2 9 0 発現のレスキューを示す。図 5 A および 5 B は、R T - q P C R によって測定した、s g R N A 対および S p C a s 9 をトランスフェクトした野生型 (白色の棒グラフ)、ヘテロ接合 (灰色の棒グラフ)、および突然変異体 (黒色の棒グラフ) 細胞における野生型 (図 5 A) および突然変異体 (図 5 B) m R N A の発現レベルを示す。データを、2 回の独立したトランスフェクションからの試料の平均値 ± 標準偏差 (n = 2) として表す。一元配置 A N O V A の後にテューキーの H S D 事後検定を使用して比較を実施した。\* = p < 0 . 0 5, \*\* = p < 0 . 0 1。図 5 C は、s g R N A 対および S p C a s 9 をトランスフェクトした突然変異体細胞から調製したライセートのイムノプロットである。メンブレンを、C E P 2 9 0 (上) およびローディング対照としてのベータ - アクチン (下) に関してプロービングした。

【図 6 - 1】自己限定性 C R I S P R - S p C a s 9 システムを示す。図 6 A は、自己限定性 C R I S P R - S p C a s 9 システムにおいて使用される p A A V - S p C a s 9 ベクターの模式図である。S p C a s 9 ヌクレアーゼの認識配列 (s p R N A 標的配列プラス P A M モチーフ) を、挿入部位 1 (m i n C M V プロモーターと S p C a s 9 の間) および / または挿入部位 2 (S p C a s 9 - N L S と S V 4 0 p A の間) に組み込む。N L S、核局在化シグナル、S V 4 0 p A、サルウイルス 4 0 ポリアデニル化シグナル。図 6 B は、U 1 D 3 s g R N A 対を発現する第 1 の A A V パッケージングプラスミドおよび S p C a s 9 を発現する第 2 の A A V パッケージングプラスミドをトランスフェクトした突然変異体細胞から調製したライセートのイムノプロットである。S p C a s 9 プラスミドは、2 つの挿入部位において U 1 s g R N A 認識配列 (U 1 T) および / または D 3 s g R N A 認識配列 (D 3 T) を含む。U 1 D 3 プラスミド単独をトランスフェクトした突然変異体細胞を、この場合の対照とした。メンブレンを S p C a s 9 (上) およびロ

10

20

30

40

50

ーディング対照としてのベータ-アクチン(下)に関してプローピングした。図6Cは、PCRによって決定した、突然変異体細胞にU1D3sgRNA対と自己限定性SpCas9をトランسفェクトした後の標的化欠失を示す。上のバンドは、野生型CEP290イントロン26から増幅されたPCR産物であり、下のバンドは、U1およびD3sgRNAにより導かれたゲノム欠失後のCEP290対立遺伝子から増幅されたPCR産物である。M、1kbDNAラダー。図6Dおよび6Eは、RT-qPCRによって測定した、U1D3sgRNA対および自己限定性SpCas9をトランسفェクトした突然変異体細胞における野生型(図6D)および突然変異体(図6E)mRNAの発現レベルを示す。データは、3回の独立したトランسفェクションからの試料の平均値±標準偏差( $n=3$ )として表す。一元配置ANOVAの後にテューキーのHSD事後検定を使用して比較を実施した。U1D3sgRNA対単独をトランسفェクトした細胞と比較して、 $^* = p < 0.05$ 、 $^{**} = p < 0.01$ 、 $^{***} = p < 0.001$ 。

【図6-2】図6-1の続き。

【図7】デュアルAAVシステムによるマウス網膜におけるCep290遺伝子のイントロン25における領域の欠失を示す。図7Aは、網膜下注射に使用したデュアルAAVの模式図である。図7Bは、PCRによって決定した、(1)AAV5-RK-EGFP(対照)、またはAAV5-U11D11sgRNA対-RK-EGFPおよび(2)AAV5-SpCas9による標的化欠失を示す。上のバンドは、野生型マウスCep290イントロン25から増幅されたPCR産物であり、下のバンドは、U11およびD11sgRNAにより導かれたゲノム欠失後のCep290対立遺伝子から増幅されたPCR産物である。M、1kbDNAラダー。

【図8】PCR(図8A)およびRT-qPCR(図8Bおよび8C)によって決定した、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)Cas9(SaCas9)およびSpCas9による標的化欠失を示す。突然変異体細胞に、SaCas9またはSpCas9のいずれかと共に、対になったsgRNA対をトランسفェクトした。sgRNA対およびSaCas9は、1つのAAVパッケージングプラスミドに存在するが、sgRNA対およびSpCas9は、2つの異なるAAVパッケージングプラスミドに存在することに注意されたい。図8Aにおいて、上のバンドは野生型CEP290のイントロン26から増幅されたPCR産物であり、下のバンドは、予想されるゲノム欠失後のCEP290対立遺伝子から増幅されたPCR産物である(それぞれ、「Wt」および「Trunc」と表示)。M、1kbDNAラダー。図8Aおよび8Bは、RT-qPCRによって測定した、SaCas9(白色の棒グラフ)またはSpCas9(灰色の棒グラフ)のいずれかと共にsgRNA対をトランسفェクトした突然変異体細胞における野生型(図8A)および突然変異体(図8B)mRNAの発現レベルを示す。データは、3回の独立したトランسفェクションからの試料の平均値±標準偏差( $n=3$ )として表す。一元配置ANOVAの後にテューキーのHSD事後検定を使用して比較を実施した。 $^* = p < 0.05$ 、 $^{**} = p < 0.01$ 、 $^{***} = p < 0.001$ 。SaCas9単独をトランسفェクトした突然変異体細胞と比較して、 $\# = p < 0.05$ 。

【発明を実施するための形態】

【0120】

本発明は、深部イントロン突然変異を編集するための組成物、方法およびウイルス粒子を提供する。いくつかの実施形態では、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療するための組成物は、a)深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b)Casタンパク質とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats(CRISPR)-CRISPR関連(Cas)(CRISPR-Cas)システムを含み、該Casタンパク質は、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す。その他の実施形態では、個体の遺伝子における

10

20

30

40

50

る深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療するための組成物は、a) 深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、b) Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列とを含む、遺伝子操作された、天然に存在しないClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連(Cas) (CRISPR-Cas)システムをコードする核酸を含み、該Casタンパク質は、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す。

【0121】

10

いくつかの態様では、本発明は、眼の疾患を治療するための組成物、方法およびウイルス粒子を提供する。上記のように、LCAの最も頻繁な遺伝子的原因は、CEP290遺伝子のイントロン26中の深部イントロン突然変異c.2991+1655A>Gであり、これは、潜在スプライス供与部位を生成し、その結果、CEP290 mRNAの未熟な停止コドン(p.C998X)を含有する異常なエキソンを含むことになる(図1)。本発明者らは、単一ガイドRNA(sgRNA)およびClustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)およびCRISPR関連タンパク質(Cas)システムの対による、ヒト細胞におけるターゲッティングされたゲノムDNA欠失によって、CEP290遺伝子中にイントロン性c.2991+1655A>G突然変異を有するLCA患者を治療するための簡単で効率的な方法を設計した(図2)。このアプローチは、イントロン性c.2991+1655A>G突然変異を効率的に、永久に欠失させ、CEP290 mRNA中に挿入された潜在エキソンのスプライシングを防ぎ、一方で、内因性ゲノム調節エレメントは無傷のまま残る。

【0122】

20

## I. 一般技術

本明細書において記載されるか、または参照される技術および手順は、一般的に十分に理解され、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrookら、第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.、2012) ; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubelら編、2003) ; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) ; PCR2: A Practical Approach (M.J. MacPherson、B.D. HamesおよびG.R. Taylor編、1995) ; Antibodies: A Laboratory Manual (HarlowおよびLane編、1988) ; Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney、第6版、J.Wiley and Sons、2010) ; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait編、1984) ; Methods in Molecular Biology, Human a Press ; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis編、Academic Press、1998) ; Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. MatherおよびP.E. Roberts、Plenum Press、1998) ; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle、J.B. GriffithsおよびD.G. Newell編、J.WileyおよびSons、1993~8) ; Handbook of Experimental Immunology (D.M. WeirおよびC.C. Blackwell編、1996) ; Gene Transfer Vectors for M

30

40

50

ammalian Cells (J. M. Miller および M. P. Calos 編、1987) ; PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullisら編、1994) ; Current Protocols in Immunology (J. E. Coliganら編、1991) ; Short Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、J. Wiley および Sons、2002) ; Immunobiology (C. A. Janeway ら、2004) ; Antibodies (P. Finch、1997) ; Antibodies: A Practical Approach (D. Catty. 編、IRL Press、1988～1989) ; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd および C. Dean 編、Oxford University Press、2000) ; Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow および D. Lane、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999) ; The Antibodies (M. Zanetti および J. D. Capra 編、Harwood Academic Publishers、1995) ; および Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita ら編、J. B. Lippincott Company、2011) において記載される、広く使用される方法論などの従来方法論を使用して当業者によって一般的に使用される。

## 【0123】

20

## II. 定義

本明細書において、「CRISPR-Cas」は、ガイドRNAおよびCasエンドヌクレアーゼを有する2成分リボヌクレオタンパク質複合体を指す。CRISPRは、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats II型システムを指す。CRISPRは、細菌および古細菌が、外来核酸（例えば、ウイルスまたはプラスミド由来の）を検出し、サイレンシングすることを可能にする適応防御システムとして発見されたが、配列特異的にポリヌクレオチド編集することを可能にするために種々の細胞種における使用のために適応してきた（例えば、Jinek, M. ら (2012) Science 第337巻: 816～821頁および Ran, F. A. ら (2013) Nat. Protoc. 第8巻: 2281～2308頁を参照のこと）。II型システムでは、ガイドRNAは、Casと相互作用し、Cas酵素のヌクレアーゼ活性を、ガイドRNAガイド配列と同一の標的DNA配列に向ける。ガイドRNAは、標的配列の逆鎖と塩基対形成する。次いで、Casヌクレアーゼ活性は、標的DNAにおいて二本鎖切断を生成する。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質である。

30

## 【0124】

本明細書において、「CRISPR-Cas単一ガイドRNA」（用語「単一ガイドRNA」および「sgRNA」）は、本明細書において同義的に使用することができる）は、標的DNAのCas媒介性切断を導くことができる単一RNA種を指す。いくつかの実施形態では、単一ガイドRNAは、Cas（例えば、Cas9）ヌクレアーゼ活性に必要な配列および目的の標的DNAと同一のガイド配列を含有し得る。

40

## 【0125】

用語「キメラRNA」、「キメラガイドRNA」、「ガイドRNA」、「単一ガイドRNA」および「合成ガイドRNA」は、本明細書において同義的に使用され得、ガイド配列、tracr配列およびtracrメイト配列を含むポリヌクレオチド配列を指す。用語「ガイド配列」は、本明細書において、標的部位を特定するガイドRNA内の約20bpの配列を指し、用語「ガイド」または「スペーサー」または「プロトスペーサー」と同義的に使用することができる。用語「tracrメイト配列」はまた、用語「ダイレクトリピート」と同義的に使用することができる。

## 【0126】

50

本明細書において、「sgRNAガイド配列」は、標的DNA配列の逆鎖と結合し、Cas（例えば、Cas9）ヌクレアーゼ活性をその遺伝子座に向けるsgRNAのヌクレオチド配列を指し得る。いくつかの実施形態では、sgRNAガイド配列は、標的配列と同一である。ハイブリダイゼーションを引き起こし、CRISPR複合体の形成を促進するのに十分な類似性があれば、完全同一性は必ずしも必要ではない。ガイド配列は、DNAまたはRNAポリヌクレオチドなどの任意のポリヌクレオチドを含み得る。

#### 【0127】

本明細書において、「Cas」ポリペプチドは、ガイドRNA、例えば、sgRNAと複合体形成された場合にヌクレアーゼとして機能するポリペプチドである。いくつかの実施形態では、Casポリペプチドは、Cas9ポリペプチド（Csn1としても知られるCRISPR関連9）である。Casポリペプチド（例えば、Cas9）は、crRNA:tracrRNAガイドまたは單一ガイドRNAと結合されると、標的DNAを、sgRNAガイド配列と同一の、PAMモチーフと隣接する配列で切断できる。Cas9ポリペプチドは、その他のCasポリペプチドとは異なり、II型CRISPR-Casシステムに特徴的である（種々のCRISPR-CasシステムのCasタンパク質の説明については、Makarova, K. S.ら（2011）Nat. Rev. Microbiol.第9巻（6号）：467～77頁を参照のこと）。本明細書において、「Cas」は、特に断りのない限り、sgRNAまたは複合体のポリペプチド成分とのリボヌクレオタンパク質複合体を指し得る。

#### 【0128】

用語「CRISPR RNA（crRNA）」は、本明細書において、標的DNA配列に対して切断を導くためにCRISPR-Casシステムによって使用されるガイド配列を含むRNAを指す。用語「トランス活性化crRNA（tracrRNA）」は、本明細書において、DNA切断を媒介するCRISPR-Casエフェクター複合体に必要な構造を形成する配列を含むRNAを指す。内因性細菌性および古細菌性II型CRISPR-Casシステムでは、エフェクターCRISPR-Cas複合体は、2つのポリリボヌクレオチド分子：crRNAおよびtracrRNAと複合体形成されたCasタンパク質（例えば、Cas9タンパク質）を含む。crRNAは、標的認識を媒介する約20ヌクレオチドのガイド配列およびtracrRNAと二本鎖を形成する配列を含有する。crRNA:tracrRNA二本鎖は、Casタンパク質と結合し、CRISPR-Casエフェクター複合体機能に必要である。いくつかの実施形態では、crRNAおよびtracrRNA機能は、標的認識を媒介する配列およびCRISPR-Casエフェクター複合体にとって必要な構造を生成する配列の両方を含有する單一RNA（單一ガイドRNAまたはsgRNA）によって実施される。

#### 【0129】

用語「深部イントロン突然変異」は、本明細書において、野生型スプライス受容配列およびスプライス供与配列の外側の領域のイントロン配列内の突然変異を指す。いくつかの場合には、深部イントロン突然変異は、関連遺伝子のスプライシングの変更、例えば、成熟mRNA中にイントロン配列を含むことにつながり得る。限定されない例では、深部イントロン突然変異は、エキソンの約100bp超下流（すなわち、3'）、エキソンの約100bp超上流（すなわち、5'）または第1のエキソンの約100bp超下流かつ第2のエキソンの約100bp超上流である。

#### 【0130】

用語「レーバー先天黒内障（LCA）」は、本明細書において、視力喪失、網膜機能不全および眼振を特徴とする早期発症型障害の群を指す。種々の突然変異が、LCAと関与しているが、LCAは、通常、常染色体劣性遺伝疾患として遺伝性である。さらなる説明および例示的LCA疾患遺伝子および遺伝子座については、例えば、OMIM Entry 204000を参照のこと。

#### 【0131】

用語「CEP290」は、本明細書において、MKS4、CT87、POC3、rd1

10

20

30

40

50

6、BBS14、LCA10、JBT55、NPHP6、SLSN6および3H11Agとしても知られる、纖毛形成に関する中心体タンパク質をコードする遺伝子を指す。CEP290中の突然変異は、LCAと関与している。このような突然変異の1つの例として、潜在スプライス供与部位を導入し、その結果、未熟な停止コドンを有する異常なエキソンを含むことになるc.2991+1655A>G突然変異がある。例えば、それぞれ、例示的ヒト遺伝子およびタンパク質配列について、NCBI遺伝子番号80184およびUniProt番号O15078を参照のこと。CEP290遺伝子のその他の例として、制限するものではないが、マウスCEP290（例えば、NCBI遺伝子番号216274）、ラットCEP290（例えば、NCBI遺伝子番号314787）、アカゲザルCEP290（例えば、NCBI遺伝子番号708286）、ゼブラフィッシュCEP290（例えば、NCBI遺伝子番号560588）、イヌCEP290（例えば、NCBI遺伝子番号482591）、チンパンジーCEP290（例えば、NCBI遺伝子番号452113）、ネコCEP290（例えば、NCBI遺伝子番号100113471）、ニワトリCEP290（例えば、NCBI遺伝子番号417887）およびウシCEP290（例えば、NCBI遺伝子番号282707）が挙げられる。いくつかの実施形態では、CEP290遺伝子は、配列番号23に示される配列の深部イントロン突然変異を含む。

#### 【0132】

「ベクター」は、本明細書において、in vitroまたはin vivoいずれかにおいて宿主細胞中に送達されるべき核酸を含む組換えプラスミドまたはウイルスを指す。

#### 【0133】

用語「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、本明細書において、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドいずれかの任意の長さのヌクレオチドの多量体型を指す。したがって、この用語は、それだけには限らないが、一本鎖、二本鎖または多重鎖DNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッドまたはプリンおよびピリミジン塩基もしくはその他の天然、化学もしくは生化学的に修飾された非天然もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーを含む。ポリヌクレオチドの主鎖は、糖およびリン酸基（RNAまたはDNA中に通常見られるよう）または修飾されたもしくは置換された糖またはリン酸基を含み得る。あるいは、ポリヌクレオチドの主鎖は、ホスホロアミド酸などの合成サブユニットのポリマーを含むこともあり得、したがって、オリゴデオキシヌクレオシドホスホルアミダート（P-NH<sub>2</sub>）または混合ホスホルアミダート-ホスホジエステルオリゴマーであり得る。さらに、二本鎖ポリヌクレオチドは、相補鎖を合成することおよび適当な条件下で鎖をアニーリングすることまたは適当なプライマーとともにDNAポリメラーゼを使用して相補鎖をde novo合成することによって、化学合成の一本鎖ポリヌクレオチド産物から得ることができる。

#### 【0134】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すように同義的に使用され、最小の長さに制限されない。アミノ酸残基のこのようなポリマーは、天然または非天然アミノ酸残基を含有し得、それだけには限らないが、ペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸残基の二量体、三量体および多量体を含み得る。全長タンパク質およびその断片の両方が、定義によって包含される。用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化などを含む。さらに、本発明の目的上、「ポリペプチド」は、タンパク質が、所望の活性を維持する限り、天然配列に対する欠失、付加および置換（一般的に、天然に保存的）などの修飾を含むタンパク質を指す。これらの修飾は、部位特異的突然変異誘発によってのような意図的なものである場合も、PCR増幅によるタンパク質またはエラーをもたらす宿主の突然変異による偶発的なものである場合もある。

#### 【0135】

「組換えウイルスベクター」は、1つまたはそれ以上の異種配列（すなわち、ウイルス

起源ではない核酸配列)を含む組換えポリヌクレオチドベクターを指す。組換えAAVベクターの場合には、組換え核酸は、少なくとも1つの逆方向末端反復配列(ITS)がその両端に位置する。いくつかの実施形態では、組換え核酸は、2つのITSがその両端に位置する。

【0136】

「組換えAAVベクター(rAAVベクター)」は、少なくとも1つのAAV逆方向末端反復配列(ITS)がその両端に位置する1つまたはそれ以上の異種配列(すなわち、AAV起源ではない核酸配列)を含むポリヌクレオチドベクターを指す。このようなrAAVベクターは、適したヘルパーウイルスに感染しており(または適したヘルパー機能を発現している)ならびにAAV r e pおよびc a p遺伝子産物(すなわち、AAV R e pおよびC a pタンパク質)を発現している宿主細胞中に存在する場合に、複製され、感染性ウイルス粒子中にパッケージングされる。rAAVベクターが、より大きなポリヌクレオチド中に(例えば、染色体中またはクローニングもしくはトランスフェクションのために使用されるプラスミドなどの別のベクター中に)組み込まれる場合には、rAAVベクターは、AAVパッケージング機能および適したヘルパー機能の存在下での複製およびキャプシド封入によって「レスキュー」される「プロベクター」と呼ばれる。rAAVベクターは、それだけには限らないが、プラスミド、線形人工染色体を含む、いくつかの形態のいずれかであり得、脂質と複合体形成され、リポソーム内にカプセル封入され、ウイルス粒子、例えば、AAV粒子中にキャプシド封入される。rAAVベクターを、AAVウイルスキャプシド中にパッケージングし、「組換えアデノ随伴ウイルス粒子(rAAV粒子)」を作製することができる。

【0137】

「rAAVウイルス」または「rAAVウイルス粒子」は、少なくとも1つのAAVキャプシドタンパク質およびキャプシド封入されたrAAVベクターゲノムから構成されるウイルス粒子を指す。

【0138】

「組換えアデノウイルスベクター」は、少なくとも1つのアデノウイルス逆方向末端反復配列(ITS)がその両端に位置する、1つまたはそれ以上の異種配列(すなわち、アデノウイルス起源ではない核酸配列)を含むポリヌクレオチドベクターを指す。いくつかの実施形態では、組換え核酸は、2つの逆方向末端反復配列(ITS)がその両端に位置する。このような組換えウイルスベクターは、組換えウイルスゲノムから欠失された必須アデノウイルス遺伝子(例えば、E1遺伝子、E2遺伝子、E4遺伝子など)を発現している宿主細胞中に存在する場合に、複製され、感染性ウイルス粒子中にパッケージングされる。組換えウイルスベクターが、より大きなポリヌクレオチド中に(例えば、染色体中またはクローニングもしくはトランスフェクションのために使用されるプラスミドなどの別のベクター中に)組み込まれる場合には、組換えウイルスベクターは、アデノウイルスパッケージング機能の存在下での複製およびキャプシド封入によって「レスキュー」される「プロベクター」と呼ばれる。組換えウイルスベクターは、それだけには限らないが、プラスミド、線形人工染色体を含む、いくつかの形態のいずれかであり得、脂質と複合体形成され、リポソーム内にカプセル封入され、ウイルス粒子、例えば、アデノウイルス粒子中にキャプシド封入される。組換えウイルスベクターを、アデノウイルスのウイルスキャプシド中にパッケージングして、「組換えアデノウイルス粒子」を作製することができる。

【0139】

「組換えレンチウイルスベクター」は、少なくとも1つのレンチウイルス末端反復配列(LTR)がその両端に位置する1つまたはそれ以上の異種配列(すなわち、レンチウイルス起源ではない核酸配列)を含むポリヌクレオチドベクターを指す。いくつかの実施形態では、組換え核酸は、2つのレンチウイルス末端反復配列(LTR)がその両端に位置する。このような組換えウイルスベクターは、適したヘルパー機能を有する感染している宿主細胞中に存在する場合に、複製され、感染性ウイルス粒子中にパッケージングされる

10

20

30

40

50

。組換えレンチウイルスベクターを、レンチウイルスキャプシド中にパッケージングし、「組換えレンチウイルス粒子」を作製することができる。

【0140】

「組換え単純ヘルペスベクター（組換えH S Vベクター）」は、H S V末端反復配列がその両端に位置する、1つまたはそれ以上の異種配列（すなわち、H S V起源ではない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを指す。このような組換えウイルスベクターは、適したヘルパー機能を有する感染している宿主細胞中に存在する場合に、複製され、感染性ウイルス粒子中にパッケージングされる。組換えウイルスベクターが、より大きなポリヌクレオチド中に（例えば、染色体中またはクローニングもしくはトランスフェクションのために使用されるプラスミドなどの別のベクター中に）組み込まれる場合には、組換えウイルスベクターは、H S Vパッケージング機能の存在下での複製およびキャプシド封入によって「レスキュー」される「プロベクター」と呼ばれる。組換えウイルスベクターは、それだけには限らないが、プラスミド、線形人工染色体を含む、いくつかの形態のいずれかであり得、脂質と複合体形成され、リポソーム内にカプセル封入され、ウイルス粒子、例えば、H S V粒子中にキャプシド封入される。組換えウイルスベクターを、H S Vキャプシド中にパッケージングして、「組換え単純ヘルペスウイルス粒子」を作製することができる。10

【0141】

「異種」とは、それと比較されるまたはその中に導入されるもしくは組み込まれる実体の残部のものとは遺伝子型的に異なる実体に由来することを意味する。例えば、遺伝子工学技術によって、異なる細胞型中に導入されるポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである（発現されると、異種ポリペプチドをコードし得る）。同様に、ウイルスベクター中に組み込まれる細胞性配列（例えば、遺伝子またはその一部）は、ベクターに対して異種ヌクレオチド配列である。20

【0142】

用語「導入遺伝子」は、細胞中に導入され、適当な条件下で、R N A中に転写され、場合により、翻訳され、および／または発現されることが可能であるポリヌクレオチドを指す。態様では、導入遺伝子は、それが導入された細胞に所望の特性を付与する、もしくはそうでなければ、所望の療法または診断結果につながる。別の態様では、m i R N A、s i R N Aまたはs h R N AなどのR N A干渉を媒介する分子中に転写される。30

【0143】

ウイルス力価に関連して使用されるような、用語「ゲノム粒子（g p）」、「ゲノム等価物」または「ゲノムコピー」は、感染性または機能性にかかわらず、組換えA A V D N Aゲノムを含有するビリオンの数を指す。特定のベクター調製物中のゲノム粒子の数を、本明細書における実施例に、または例えば、C l a r k l a ( 1 9 9 9 ) H u m . G e n e T h e r . 、第10巻：1 0 3 1 ~ 1 0 3 9 頁；V e l d w i j k l a ( 2 0 0 2 ) M o l . T h e r . 、第6巻：2 7 2 ~ 2 7 8 頁に記載されるような手順によって測定することができる。

【0144】

用語「ベクターゲノム（v g）」は、本明細書において、ベクター、例えば、ウイルスベクターのポリヌクレオチド配列のセットを含む1つまたはそれ以上のポリヌクレオチドを指し得る。ベクターゲノムは、ウイルス粒子中にキャプシド封入される。特定のウイルスベクターに応じて、ベクターゲノムは、一本鎖D N A、二本鎖D N Aまたは一本鎖R N Aまたは二本鎖R N Aを含み得る。ベクターゲノムは、特定のウイルスベクターおよび／または組換え技術によって特定のウイルスベクター中に挿入された任意の異種配列と会合する内因性配列を含み得る。例えば、組換えA A Vベクターゲノムは、プロモーターの両端に位置する少なくとも1つのI T R配列、スタッフラー、目的の配列（例えば、R N A i）およびポリアデニル化配列を含み得る。完全ベクターゲノムは、ベクターのポリヌクレオチド配列の完全セットを含み得る。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターの核酸力価を、v g / m Lの単位で測定することができる。この力価を測定するのに適した方4050

法は、当技術分野で公知である（例えば、定量的 P C R）。

【0145】

ウイルス力価に関連して使用されるような、用語「感染単位（i u）」、「感染性粒子」または「複製単位」は、複製中心アッセイとしても知られる、例えば、McLaughlinら（1988）J. Virol.、第62巻：1963～1973頁に記載されるような感染中心アッセイによって測定されるような感染性および複製可能な組換えAAVベクター粒子の数を指す。

【0146】

ウイルス力価に関連して使用されるような、用語「形質導入単位（t u）」は、本明細書における実施例に、または、例えば、Xiaolai（1997）Exp. Neurobiology.、第144巻：113～124頁に；またはFisherら（1996）J. Virol.、第70巻：520～532頁（LFUアッセイ）に記載されるものなどの機能的アッセイにおいて測定されるような、機能的導入遺伝子産物の製造をもたらす感染性組換えAAVベクター粒子の数を指す。

10

【0147】

「逆方向末端反復」または「ITR」配列は、当技術分野で十分に理解されている用語であり、反対の配向にある、ウイルスゲノムの末端に見られる比較的短い配列を指す。

【0148】

当技術分野で十分に理解されている用語である、「AAV逆方向末端反復（ITR）」配列は、天然一本鎖AAVゲノムの両端に存在するおよそ145ヌクレオチドの配列である。最も外側の125ヌクレオチドのITRは、2つの代替配向のいずれかで存在し得、異なるAAVゲノム間および単一AAVゲノムの2つの末端間の不均一性につながる。最も外側の125ヌクレオチドはまた、自己相補性のいくつかのより短い領域（A、A'、B、B'、C、C'およびD領域と表される）を含有し、ストランド内塩基対合がITRのこの部分内に生じることを可能にする。

20

【0149】

「末端解離配列」または「trs」は、ウイルスDNA複製の際にAAV-repタンパク質によって切断されるAAV-ITRのD領域中の配列である。突然変異体末端解離配列は、AAV-repタンパク質による切断に対して抵抗性である。

30

【0150】

AAVの「ヘルパーウイルス」は、AAV（欠陥パルボウイルスである）が、宿主細胞によって複製され、パッケージングされることを可能にするウイルスを指す。いくつかのこのようなヘルパーウイルスは同定されており、アデノウイルス、ヘルペスウイルスおよびワクシニアなどのポックスウイルスが挙げられる。サブグループCのアデノウイルス5型（Ad5）が、最もよく知られているが、アデノウイルスは、いくつかの異なるサブグループを包含する。ヒト、非ヒト哺乳動物および鳥類起源の多数のアデノウイルスが公知であり、ATCCなどの寄託機関から入手可能である。同様に、ATCCなどの寄託機関から入手可能であるヘルペス科のウイルスとして、例えば、単純ヘルペスウイルス（HSV）、エブスタイン-バーウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）および仮性狂犬病ウイルス（PRV）が挙げられる。

40

【0151】

参照ポリペプチドまたは核酸配列と関連する「配列同一性パーセント（%）」は、最大配列同一性パーセントを達成するように、配列をアラインし、必要に応じてギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の部分として考慮せずに、参照ポリペプチドまたは核酸配列中のアミノ酸残基またはヌクレオチドと同一である候補配列中のアミノ酸残基またはヌクレオチドのパーセンテージとして定義される。アミノ酸または核酸配列同一性パーセントを決定する目的のアラインメントは、当業者の範囲内である種々の方法で、例えば、Current Protocols in Molecular Biology（Ausubelら編、1987）、付録30、7.7.18節、表7.7.1に記載されたものおよびBLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegaalign

50

n (DNASTAR) ソフトウェアを含め、例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェアプログラムを使用して達成することができる。アラインメントプログラムの一例として、ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pennsylvania) がある。当業者ならば、比較されている配列の全長にわたって最大アラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含め、アラインメントを測定するための適当なパラメータを決定することができる。本明細書における目的上、所与のアミノ酸配列 B に対しての、との、またはそれに対する、所与のアミノ酸配列 A のアミノ酸配列同一性% (所与のアミノ酸配列 B に対しての、との、またはそれに対する特定のアミノ酸配列同一性%を有する、または含む所与のアミノ酸配列 A と言い換えることができる) は、以下のとおりに算出される：分数 X / Y (式中、X は、A および B のそのプログラムのアラインメントにおいて、配列アラインメントプログラムによって同一マッチとしてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Y は、B 中のアミノ酸残基の総数である) を 100 倍する。アミノ酸配列 A の長さが、アミノ酸配列 B の長さと等しくない場合には、A の B に対するアミノ酸配列同一性% は、B の A に対するアミノ酸配列同一性% と等しくないことが認められよう。本明細書における目的上、所与の核酸配列 D に対しての、との、またはそれに対する所与の核酸配列 C の核酸配列同一性% (所与の核酸配列 D に対しての、との、またはそれに対する特定の核酸配列同一性%を有する、または含む所与の核酸配列 C と言い換えることができる) は、以下のとおりに算出される：分数 W / Z (式中、W は、C および D のそのプログラムのアラインメントにおいて、配列アラインメントプログラムによって同一マッチとしてスコア化されたヌクレオチドの数であり、Z は、D 中のヌクレオチドの総数である) を 100 倍する。核酸配列 C の長さが、核酸配列 D の長さと等しくない場合には、C の D に対する核酸配列同一性% は、D の C に対する核酸配列同一性% と等しくないことが認められよう。

#### 【0152】

「単離された」分子 (例えば、核酸またはタンパク質) または細胞とは、それが同定され、その天然環境の成分から分離および / または回収されていることを意味する。

#### 【0153】

「有効量」とは、臨床結果 (例えば、症状の回復、臨床エンドポイントの達成など) を含む、有益なまたは所望の結果を達成するのに十分な量である。有効量は、1 回またはそれ以上の投与で投与される。疾患状態の点では、有効量とは、疾患を回復させ、安定化させ、またはその発生を遅延するのに十分な量である。

#### 【0154】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物として、それだけには限らないが、家畜化動物 (例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌおよびウマ)、靈長類 (例えば、ヒトおよびサルなどの非ヒト靈長類)、ウサギおよびげっ歯類 (例えば、マウスおよびラット) が挙げられる。特定の実施形態では、個体または対象は、ヒトである。

#### 【0155】

本明細書において、「治療」は、有益なまたは所望の臨床結果を得るためにアプローチである。本発明の目的上、有益なまたは所望の臨床結果として、それだけには限らないが、検出可能であろうと、検出不可能であろうと、症状の軽減、疾患の程度の減少、疾患の安定化された (例えば、悪化しない) 状態、疾患の広がり (例えば、転移) を防ぐこと、疾患進行の遅延または減速、疾患状態の回復または緩和および緩解 (部分的であろうと、全体であろうと) が挙げられる。「治療」はまた、治療を受けていない場合に予測される生存と比較した生存の延長を意味することもある。

#### 【0156】

本明細書において、用語「予防的処置」は、個体が、障害を有すると知られている、または有すると疑われる、または有するリスクがあるが、障害の症状を示していない、または障害の最小症状を示している場合の処置を指す。予防的処置を受けている個体は、症状の発生に先立って治療される。

#### 【0157】

10

20

30

40

50

本明細書において、「治療的」薬剤（例えば、治療的ポリペプチド、核酸または導入遺伝子）は、上記の例示的臨床結果などの有益なまたは所望の臨床結果を提供するものである。したがって、治療的薬剤は、上記のような治療において使用される。

【0158】

用語「中心網膜」は、本明細書において、外部黄斑および/または内部黄斑および/または中心窓を指す。用語「中心網膜細胞種」は、本明細書において、例えば、RPEおよび光受容体細胞などの中心網膜の細胞種を指す。

【0159】

用語「黄斑」は、末梢網膜と比較して高い相対濃度の光受容体細胞、具体的には、桿体および錐体を含有する靈長類における中心網膜の領域を指す。用語「外部黄斑」は、本明細書においてまた、「末梢黄斑」とも呼ばれる。用語「内部黄斑」は、本明細書においてまた、「中心黄斑」とも呼ばれる。

10

【0160】

用語「中心窓」は、末梢網膜および黄斑と比較して高い相対濃度の光受容体細胞、具体的には錐体を含有する直径およそ0.5 mm以下の靈長類の中心網膜中の小さい領域を指す。

【0161】

用語「網膜下空間」は、本明細書において、光受容体細胞および網膜色素上皮細胞の間の網膜中の位置を指す。網膜下空間は、流体の任意の網膜下注射などに先立つ、潜在空間であり得る。網膜下空間はまた、潜在空間中に注射される流体を含有し得る。この場合には、流体は、「網膜下空間と接触して」いる。「網膜下空間と接触して」いる細胞として、RPEおよび光受容体細胞などの網膜下空間と隣接する細胞が挙げられる。

20

【0162】

用語「プレブ」は、本明細書において、眼の網膜下空間内の流体空間を指す。本発明のプレブは、単一空間への流体の単回注射によって、同一空間への1つまたはそれ以上の流体の複数回注射によって、または複数空間への複数回注射によって作製され、これは、再配置されると、網膜下空間の所望の部分にわたる治療効果を達成するのに有用な総流体空間を作製する。

【0163】

本明細書における「約」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（および記載する）。例えば、「約X」を言及する記載は、「X」の記載を含む。

30

【0164】

本明細書において、冠詞「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」の単数形は、特に断りのない限り、複数の言及を含む。

【0165】

本明細書に記載される本発明の態様および実施形態は、態様および実施形態を「含んでいる(comprising)」、「からなる(consisting)」および/または「本質的にからなる(consisting essentially of)」を含むと理解される。

40

【0166】

I I I . C R I S P R - C a s

本開示の特定の態様は、遺伝子操作された、天然に存在しないclustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR関連(Cas) (CRISPR-Cas)システムに関する。これらのシステムは、とりわけ、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害、例えば、深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患または障害を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムは、深部イントロン突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAと、Casタンパク質を

50

コードするヌクレオチド配列とを含み、Casタンパク質は、深部イントロン突然変異の両端に位置する部位で標的DNA分子を切断し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す。

#### 【0167】

上記のように、CRISPR-Casシステムは、細菌および古細菌における外来核酸に対する適応防御として元々発見された。実際、CRISPR遺伝子座は、制限するものではないが、アエロピルム属(*Aeropyrum*)、ピロバキュラム属(*Pyrobaulum*)、スルホロブス属(*Sulfolobus*)、アーケオグロブス属(*Archaeoglobus*)、ハロアーキュラ属(*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(*Methanosaerina*)、メタノピルス属(*Methanopyrus*)、ピロコッカス属(*Pyrococcus*)、ピクロフィルス属(*Picrophilus*)、サーモプラズマ属(*Thermoplasmia*)、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*)、アクウェイフェクス属(*Aquifex*)、ポルフィロモナス属(*Porphyromonas*)、クロロビウム属(*Chlorobium*)、サーマス属(*Thermus*)、バチルス属(*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*)、ナイセリア属(*Neisseria*)、ニトロソモナス属(*Nitrosononas*)、デスルホビブリオ属(*Desulfovibrio*)、ジオバクター属(*Geobacter*)、マイクロコッカス属(*Myrococcus*)、カンピロバクター属(*Campylobacter*)、ウォリネラ属(*Wolinella*)、アシネットバクター属(*Acinetobacter*)、エルウィニア属(*Erwinia*)、エシエリキア属(*Escherichia*)、レジオネラ属(*Legionella*)、メチロコッカス属(*Methylococcus*)、パストレラ属(*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*)を含む、40種を超える原核生物において同定されている(例えば、Janssen, R.ら(2002) *Mol. Microbiol.* 第43巻: 1565~1575頁およびMojica, F. J.ら(2005) *J. Mol. Evol.* 第60巻: 174~182頁を参照のこと)。

#### 【0168】

細菌では、Cas(例えば、Cas9)タンパク質は、2つの異なるガイドRNA:CRISPR RNA(crRNA)およびトランス活性化crRNA(tracrRNA)と結合する。crRNAおよびtracrRNAリボヌクレオチドが塩基対形成し、標的DNAのCas媒介性切断に必要な構造を形成する。しかし、単一ガイドRNA(sgRNA)を、crRNA:tracrRNA構造を形成し、標的DNAのCas媒介性切断を導くように遺伝子操作することができる事が最近実証された(Jinek, M.ら(2012) *Science* 第337巻(6096): 816~21頁)。Casヌクレアーゼ活性の特異性は、ガイドRNAによって決定されるので、CRISPR-Casシステムが、異種細胞における二本鎖DNA切断を導き、カスタマイズ可能なゲノム編集を可能にするツールとして調査された(Mali, P.ら(2013) *Science* 第339巻(6121): 823~6頁)。例示的CRISPR-Casシステムおよびそれに関連する使用の方法のさらなる説明の記載は、とりわけ、米国特許第8,697,359号に見ることができる。いくつかの実施形態では、本明細書において記載されるよう

10

20

30

40

50

ガイドRNA（例えば、第1または第2のガイドRNA）は、CRISPR RNA (c r RNA) およびトランス活性化c r RNA (tracrRNA) を含む單一ガイドRNA (sgRNA) を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるようなガイドRNA（例えば、第1または第2のガイドRNA）は、トランス活性化c r (tracr) 配列と融合されている。いくつかの実施形態では、トランス活性化c r (tracr) 配列は、配列番号25の配列を含む。

#### 【0169】

したがって、本明細書において記載されるCRISPR-Casシステムは、多くの理由のために天然に存在するCRISPR-Casシステムと対照的であり得る。例えば、とりわけ、本開示のCRISPR-Casシステムは、非天然配列（例えば、真核細胞のイントロン）とハイブリダイズする1つまたはそれ以上のガイドRNAを含み得る。天然に存在するCRISPR-Casシステムは、プラスミドまたはファージ配列などの、細菌および古細菌が通常曝露される配列を認識する。また、本開示のCRISPR-Casシステムの多くは、單一ガイドRNAを含むが、天然に存在するCRISPR-Casシステムは、通常、別個のCRISPR RNA (c r RNA) およびトランス活性化c r RNA (tracrRNA) を含む。

#### 【0170】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCRISPR-Casシステムは、自己限定性 (self-limiting) であり得る。例えば、以下に記載されるように、CRISPR-Casシステムは、そのシステム自体内の標的配列（単数または複数）、例えば、その切断が、Casタンパク質などのシステム成分の発現レベルに影響を及ぼす配列（単数または複数）とハイブリダイズする1つまたはそれ以上のガイドRNAを含み得る。理論に捉われることを望むものではないが、CRISPR-Casシステムは、宿主細胞において持続的に発現される必要はないので、システムを「自己限定性」である（例えば、持続および/または発現の低減を特徴とする）ように遺伝子操作することは、例えば、オフターゲット効果を低減し、不要な免疫応答および/または安全性の問題の可能性を低減するなどのために有利であり得ると考えられる。

#### 【0171】

自己限定性CRISPR-Casシステムでは、CRISPR-Cas複合体は、複合体自体の1つまたはそれ以上の成分を発現させるために使用されるベクター中の1つまたはそれ以上の部位を標的とする。したがって、ガイドRNA（単数または複数）およびCasタンパク質の発現の際、CRISPR-Casシステムは、目的の遺伝子座（例えば、本明細書に記載されるような突然変異の部位）ならびにCasベクター中の1つまたはそれ以上の標的（単数または複数）を標的とし、最終的に、Casベクターの切断およびCasタンパク質発現の低減または排除（目的の遺伝子座での切断後）につながる。実施例3は、このような自己限定性CRISPR-Casシステムは、目的の標的配列（単数または複数）での効果的な切断（例えば、深部イントロン突然変異の切除）を依然として可能にしながら、Cas持続時間の低減を特徴とすることを以下で実証する。

#### 【0172】

本開示の特定の態様は、自己限定性CRISPR-Casシステムを使用する、個体の遺伝子における突然変異と関連する疾患または障害を治療するための方法に関する。例えば、突然変異は、CRISPR-Casシステムによって個体の遺伝子から切り出される不要な配列（例えば、深部イントロン突然変異）であり得る。その他の実施形態では、突然変異は、CRISPR-Casシステムによって修正される（例えば、特に、相同性鑄型が含まれる場合には、相同DNAが切断されたDNA配列で修復する）ミスセンス、点またはその他の突然変異であり得る。いくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムは、組成物中にある。いくつかの実施形態では、組成物は、治療有効量で個体に投与される。

#### 【0173】

いくつかの実施形態では、組成物は、a) 目的の突然変異（それだけには限らないが、

10

20

30

40

50

本明細書に記載される深部イントロン突然変異を含む)の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAを含むCRISPR-Casシステムをコードする核酸;およびb)Cas発現力セットを含む。いくつかの実施形態では、Cas発現力セットは、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびガイドRNA標的部位を含む。第1または第2のガイドRNAは、ガイドRNA標的部位とハイブリダイズし、したがって、CRISPR-Casシステムが、ガイドRNA標的部位での切断を触媒することを可能にする。ガイドRNA標的部位はまた、Casタンパク質に特異的な、ガイドRNAとハイブリダイズする配列に隣接するプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を含み得る。Casタンパク質が発現すると、Casタンパク質は、突然変異の両端に位置する標的DNA配列を切断し、それによって、突然変異を含む標的DNAを切り出す。Casタンパク質が発現すると、Casタンパク質はまた、Cas発現力セットをガイドRNA標的部位で切断し、それによって、Casタンパク質の発現を低減する。したがって、Cas発現は、細胞へのCas発現力セットの導入後、最初は増大するが、Casタンパク質が細胞中に蓄積するにつれ、Casタンパク質は、Cas発現力セットを切断する。Cas発現力セットの多くが、Casタンパク質によって妨げられるにつれ、さらなるCasタンパク質の発現が低減される(すなわち、Casは、それ自身の発現力セットの発現を制限し、自己限定性Cas発現力セットと考えられる)。いくつかの実施形態では、Casタンパク質の発現は、最初の増大と、それに続くガイドRNA標的部位での切断後の発現の減少を特徴とする。本明細書において記載されるように、Casタンパク質の発現の低減は、Casタンパク質の量および/または持続の低減を指し得る。いくつかの実施形態では、Casタンパク質の発現は、Cas発現力セットの切断の前と比較して(例えば、Casの最初の発現と比較して)低減される。いくつかの実施形態では、Casタンパク質の発現は、ガイドRNA標的部位を欠くCas発現力セットの使用と比較して低減される。いくつかの実施形態では、自己限定性Cas発現力セットを含む組成物は、標的核酸を切断するために使用される。いくつかの実施形態では、組成物は、in vitroまたはin vivoで標的核酸を切断するために使用される。いくつかの実施形態では、組成物は、突然変異(例えば、深部イントロン突然変異)を含む標的核酸を切断するために使用される。例えば、自己限定性Cas発現力セットは、核酸における突然変異と関連する疾患または障害を治療するために使用される。

#### 【0174】

いくつかの実施形態では、Cas発現力セットは、第2のガイドRNA標的部位をさらに含み、第1のガイドRNAまたは第2のガイドRNAは、第2のガイドRNA標的部位とハイブリダイズし、第2のガイドRNA標的部位は、Casタンパク質に特異的なプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と隣接している。Casタンパク質が発現すると、Casタンパク質は、突然変異の両端に位置する標的DNA配列を切断し、それによって、突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す。さらに、Casタンパク質が発現すると、Casタンパク質は、Cas発現力セットを両ガイドRNA標的部位で切断し、それによって、Casタンパク質の発現を低減する。以下に例示されるように、1つのガイドRNAは、2つのガイドRNA標的部位とハイブリダイズし得、第1のガイドRNAは、第1のガイドRNA標的部位とハイブリダイズし得、第2のガイドRNAは、第2のガイドRNA標的部位とハイブリダイズし得るか、または第2のガイドRNAは、第1のガイドRNA標的部位とハイブリダイズし得る。

#### 【0175】

いくつかの実施形態では、Cas発現力セットは、Casタンパク質の発現を導く/促進するのに有用な、5'または3'非翻訳領域中に存在する、1つまたはそれ以上のプロモーター、エンハンサー、イントロン、ポリアデニル化(ポリA)配列、ターミネーター、調節エレメントなどを含み得る。いくつかの実施形態では、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、プロモーターと作動可能に連結されている。いくつかの実施形

態では、ガイドRNA標的部位は、プロモーターおよびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の間にあり得、その結果、切断の際、Casタンパク質の発現の低減をもたらす。いくつかの実施形態では、Casタンパク質の発現は、プロモーターおよびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の間の作動可能な連結の切断によって低減される。いくつかの実施形態では、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、ポリア配列と作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、ガイドRNA標的部位は、ポリア配列およびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の間にあり得、その結果、切断の際に、Casタンパク質の発現の低減をもたらす。いくつかの実施形態では、Casタンパク質の発現は、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列およびポリアデニル化配列の間の作動可能な連結の切断によって低減される。いくつかの実施形態では、第1のガイドRNA標的部位は、プロモーターおよびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の間にあり得、第2のガイドRNA標的部位は、ポリア配列およびCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の間にあり得、その結果、切断の際、Casタンパク質の発現の低減をもたらす。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、1つまたはそれ以上のNLSとインフレームで融合され、ガイドRNA標的部位は、1つまたはそれ以上のNLSをコードする配列およびポリア配列の間にあり得（特に、NLSが、Casタンパク質のC末端と融合されている場合には）、その結果、切断の際に、NLSが融合しているCasタンパク質の発現の低減をもたらす。

#### 【0176】

本明細書において記載されるように、自己限定性CRISPR-CasシステムなどのCRISPR-Casシステムは、本明細書において記載されるベクターまたはウイルスベクター/粒子のいずれかなどの、1つまたはそれ以上のベクター上にコードされる。いくつかの実施形態では、第1および第2のガイドRNAをコードする核酸は、Cas発現カセットと同一のベクター上にあり得る。その他の実施形態では、第1および第2のガイドRNAをコードする核酸は、Cas発現カセットとは異なるベクターであり得る。例えば、第1および第2のガイドRNAは、第1のrAAVベクターによってコードされ、Cas発現カセットは、第2のrAAVベクターによってコードされる。いくつかの実施形態では、標的細胞は、両ベクターをトランスフェクトされ、ひいては、自己限定性CRISPR-Casシステムの発現につながる。

#### 【0177】

いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、標的DNA分子を突然変異（例えば、深部イントロン突然変異）の両端に位置する部位で切断し、それによって、突然変異を含む標的DNAの部分を切り出す。例えば、非相同末端結合（NHEJ）などのDNA修復プロセスは、切断された末端を結合することによって、切断されたDNA配列を修復し、それによって、深部イントロン突然変異を含む標的DNAの部分を切り出し得る。その他の実施例では、相同DNA修復は、特に、相同性鋳型が含まれる場合に、切断されたDNA配列を修復し得る。本明細書において記載され、例示されるように、標的DNA配列（例えば、深部イントロン突然変異を有する配列）の両端に位置する2つのガイドRNAの使用は、深部イントロン突然変異を有する配列などの標的DNA配列の部分の切り出しを可能にする（また、CRISPR-Casシステムを使用する例示的遺伝子欠失戦略の説明については、Brandl, C.ら(2014) FEBS Open Bio. 第5巻: 26~35頁; Zheng, Q.ら(2014) Biotechniques 第57巻: 115~124頁を参照のこと）。いくつかの実施形態では、標的DNA配列の切り出された部分は、イントロンDNAを含む。いくつかの実施形態では、標的DNA配列の切り出された部分は、イントロンDNAのみからなる。

#### 【0178】

いくつかの実施形態では、第1および/または第2のガイドRNAは、突然変異（例えば、深部イントロン突然変異）の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする。理論に捉われることを望むものではないが、第1および/または第2のガイドRNAは、深部イントロン突然変異から任意の距離離れたイントロン内に位置する標的DNA

10

20

30

40

50

配列の逆鎖とハイブリダイズし得ると考えられる。いくつかの実施形態では、第1および/または第2のガイドRNAは、深部イントロン突然変異から、1塩基対から約10,000塩基対の間の標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、第1および/または第2のガイドRNAは、深部イントロン突然変異から、(ヌクレオチドの単位で)およそ、以下の距離のいずれか未満の距離に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする：10,000；9,500；9,000；8,500；8,000；7,500；7,000；6,500；6,000；5,500；5,000；4,500；4,000；3,500；3,000；2,500；2,000；1,500；1,000；950；900；850；800；750；700；650；600；550；500；450；400；350；300；250；200；150；100；95；90；85；80；75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4；3；2；またはその間の任意の値。いくつかの実施形態では、第1および/または第2のガイドRNAは、深部イントロン突然変異から、(ヌクレオチドの単位で)およそ、以下の距離のいずれかを超える距離に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズする：1；2；3；4；5；6；7；8；9；10；15；20；25；30；35；40；45；50；55；60；65；70；75；80；85；90；95；100；150；200；250；300；350；400；450；500；550；600；650；700；750；800；850；900；950；1,000；1,500；2,000；2,500；3,000；3,500；4,000；4,500；5,000；5,500；6,000；6,500；7,000；7,500；8,000；8,500；9,000；9,500；またはそれらの間の任意の値。すなわち、第1および/または第2のガイドRNAは、10,000；9,500；9,000；8,500；8,000；7,500；7,000；6,500；6,000；5,500；5,000；4,500；4,000；3,500；3,000；2,500；2,000；1,500；1,000；950；900；850；800；750；700；650；600；550；500；450；400；350；300；250；200；150；100；95；90；85；80；75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4；3；2；またはそれらの間の任意の値の上限および1；2；3；4；5；6；7；8；9；10；15；20；25；30；35；40；45；50；55；60；65；70；75；80；85；90；95；100；150；200；250；300；350；400；450；500；550；600；650；700；750；800；850；900；950；1,000；1,500；2,000；2,500；3,000；3,500；4,000；4,500；5,000；5,500；6,000；6,500；7,000；7,500；8,000；8,500；9,000；9,500；またはそれらの間の任意の値の独立して選択された下限を有する距離の範囲(ヌクレオチドの単位で)であって、下限が上限未満である範囲のうちの任意のものであり得る、深部イントロン突然変異からの距離に位置する標的DNA配列の逆鎖とハイブリダイズし得る。

【0179】 40

Casタンパク質の限定されない例として、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(Csn1およびCx12としても知られる)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、CsA5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Cx17、Cx14、Cx10、Cx16、Csax、Cx3、Cx1、Cx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、その相同意またはその修飾されたものが挙げられる。これらの酵素は、当技術分野で一般的に知られている。

【0180】 50

いくつかの実施形態では、Casタンパク質（例えば、CRISPR酵素）は、Cas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9などの未修飾CRISPR酵素は、DNA切断活性を有する。例示的Cas9タンパク質として、制限するものではないが、S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）Cas9（例えば、SwissProtデータベース受託番号Q99ZW2を参照のこと）、S.オーレウス（*S. aureus*）Cas9（例えば、GenBank受託番号CCK74173を参照のこと）、S.サモフィルス（*S. thermophilus*）Cas9（例えば、SwissProtデータベース受託番号G3ECR1を参照のこと）、N.メンギティディス（*N. meningitidis*）Cas9（例えば、UniProt受託番号C9X1G5を参照のこと）およびT.デンティコラ（*T. denticola*）Cas9（例えば、GenBank受託番号EMB41078を参照のこと）が挙げられる。いくつかの実施形態では、Cas9は、S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）またはS.ニューモニエ（*S. pneumoniae*）由来である。いくつかの実施形態では、CRISPR酵素は、標的配列内および／または標的配列の相補体内などの、標的配列の位置での一方の鎖または両鎖の切断を導く。いくつかの実施形態では、CRISPR酵素は、標的配列の第1のまたは最後のヌクレオチドから約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500またはそれ以上の塩基対内の方の鎖または両鎖の切断を導く。  
10

#### 【0181】

いくつかの実施形態では、本開示のCasタンパク質をコードする酵素コード配列は、真核細胞などの特定の細胞における発現のためにコドン最適化される。真核細胞は、それだけには限らないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌまたは非ヒト霊長類を含む、哺乳動物などの特定の生物のものまたはそれに由来するものであります。一般に、コドン最適化とは、天然アミノ酸配列を維持しながら、天然配列の少なくとも1つのコドンを、その宿主細胞の遺伝子においてより頻繁にもしくは最も頻繁に使用されるコドンで置換することによって、目的の宿主細胞における増強された発現のために核酸配列を修飾するプロセスを指す。種々の種は、特定のアミノ酸の特定のコドンについて特定のバイアスを示す。コドン使用表は、例えば、「コドン使用データベース」で容易に入手可能であり、これらの表は、いくつかの方法で適応させることができる（例えば、Nakamura, Y.ら（2000）*Nucleic Acids Res.* 第28巻：292頁）。特定の宿主細胞における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、Gene Forge（Aptagen；Jacobus, Pa.）なども入手可能である。  
20  
30

#### 【0182】

いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、1つまたはそれ以上の異種タンパク質ドメイン（CRISPR酵素に加えて、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上のドメインまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上を超えるドメイン）を含む融合タンパク質である。Cas融合タンパク質は、任意のさらなる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ク配列を含み得る。Casタンパク質と融合されるタンパク質ドメインの例として、制限するものではないが、エピトープタグ、リポーター遺伝子配列および以下の活性：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切断活性および核酸結合活性のうちの1つまたはそれ以上を有するタンパク質ドメインが挙げられる。エピトープタグの例として、制限するものではないが、ヒスチジン（His）タグ、V5タグ、FLAGタグ、インフルエンザ血球凝集素（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。リポーター遺伝子の例として、制限するものではないが、グルタチオン-5-トランスフェラーゼ（GST）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）-ガラクトシダーゼ、-グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼおよび蛍光タンパク質（例えば、GFP、CFP、YFP、BFPなど  
40  
50

) が挙げられる。Casタンパク質は、それだけには限らないが、マルトース結合タンパク質(MBP)、S-タグ、LexA-DNA結合ドメイン(DBD)融合物、GAL4A-DNA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含む、DNA分子と結合するか、またはその他の細胞性分子と結合するタンパク質またはタンパク質の断片をコードする遺伝子配列と融合される。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、機能の増強のために修飾される。

#### 【0183】

いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、突然変異体Casタンパク質である。いくつかの実施形態では、Casタンパク質(例えば、Cas9タンパク質)は、ニッカーゼ突然変異体である(Ranら、2013 Cell第156巻(6):1380~9頁)。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼ突然変異体は、ターゲッティングされた二本鎖切断を導入し、オフターゲットDNA切断を低減するために、ガイドRNAの対とともに使用される。

#### 【0184】

いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、アミノ酸変更を有し、頑強なオントーゲット活性を示すが、オフターゲット切断は無視できる正確性が高いCasタンパク質変異体である(Slaymaker, I. M. ら(2016)Science第351巻(6268):84~88頁; Kleinstiver, B. P. ら(2016)Nature第529巻:490~495頁)。

#### 【0185】

いくつかの実施形態では、CRISPR-Casシステムは、1つまたはそれ以上の核局在性シグナル(NLS)をさらに含む。例えば、Casタンパク質(例えば、Cas9タンパク質)は、1つまたはそれ以上のNLSを含み得る。NLSとともにCas9を含む例示的プラスミドは、Ran, F. A. ら(2013)Nat. Protoc.第8巻:2281~2308頁に見ることができる。さまざまな宿主細胞に適した種々のNLSが、当技術分野で公知である。例えば、制限するものではないが、NLSは、SV40 NLS(例えば、Mali, P. ら(2013)Science第339巻(6121):823~6頁に記載されるような)、SV40ラージT抗原単節型(monopartite)NLS、ヌクレオプラスミンNLSおよびhnRNP A1 NLSであり得る。使用される例示的NLS配列として、制限するものではないが、PKKKRKV(配列番号26)またはPKKKRKVEDPKKKRKVD(配列番号27)が挙げられる(例えば、Jinek, M. ら(2013)eLife 2:e00471を参照のこと)。

#### 【0186】

CRISPR複合体(標的配列の逆鎖とハイブリダイズし、1つまたはそれ以上のCasタンパク質と複合体形成されたガイド配列を含む)の形成は、通常、内因性CRISPRシステム中の標的配列中またはその付近の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50またはそれ以上の塩基対内の)一方の鎖または両鎖の切断をもたらす。野生型tracr配列のすべてまたは一部を含み得るtracr配列もまた、tracr配列の少なくとも一部に沿った、tracrメイト配列のすべてまたは一部、例えば、ガイド配列と作動可能に連結されているtracrメイト配列とのハイブリダイゼーションなどによって、CRISPR複合体の一部を形成することができると考えられる。

#### 【0187】

一般に、tracrメイト配列は、対応するtracr配列を含有する細胞における、tracrメイト配列がその両端に位置するガイド配列の切り出し;標的配列でのtracr配列とハイブリダイズしたtracrメイト配列を含むCRISPR複合体の形成;またはその両方を促進するのに十分な、tracr配列との相補性を有する任意の配列を含み得る。いくつかの実施形態では、tracr配列は、tracrメイト配列にハイブリダイズし、CRISPR複合体の形成に加わるのに十分な相補性を有する。標的配列に関して以下に記載されるように、少なくとも機能的であるために十分な相補性が必要であ

10

20

30

40

50

る（すなわち、`tracr` および `tracr` メイト配列の間の完全相補性は必要ではない）と考えられる。

#### 【0188】

一般に、相補性の程度は、2つの配列の短い方の長さに沿った `tracr` メイト配列および `tracr` 配列の最適アラインメントを指す。最適アラインメントは、任意の適したアラインメントアルゴリズム（例えば、本明細書に記載されるような）によって決定され、`tracr` 配列または `tracr` メイト配列のいずれか内の自己相補性などの二次構造をさらに構成し得る。いくつかの実施形態では、`tracr` 配列は、約 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50 もしくはそれ以上のヌクレオチド長または約 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50 もしくはそれ以上を超えるヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、`tracr` 配列は、最適にアラインされた場合に `tracr` メイト配列の長さに沿って、少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95% または 99% の配列相補性を有する（例えば、本明細書において記載される例示的アラインメント方法のいずれかによって決定されるような）。

#### 【0189】

理論に捉われることを望むものではないが、任意の目的とする所望の標的 DNA 配列が、`sgRNA` ガイド配列によってターゲッティングされ、標的 DNA 配列の唯一の必要条件は、`sgRNA` 標的配列に隣接するプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の存在であると考えられる（Malai, P.ら（2013）Science 第339巻（6121）：823～6頁）。異なる Cas 複合体は、異なる PAM モチーフを有すると知られている。例えば、化膿性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）由来の Cas9 は、GGジヌクレオチド PAM モチーフを有する。さらなる例を挙げると、*S. aureus* (*S. aureus*) Cas9 の PAM モチーフは、G R R T (式中、R は、プリン (A または G) である) であり、*N. meningitidis* (*N. meningitidis*) Cas9 の PAM モチーフは、G A T T であり、*S. thermophilus* (*S. thermophilus*) Cas9 の PAM モチーフは、A G A A であり、*T. dentiscoli* (*T. dentiscoli*) Cas9 の PAM モチーフは、A A A A C である。

#### 【0190】

一般に、ガイド配列は、標的配列の逆鎖とハイブリダイズし、CRISPR 複合体の標的配列との配列特異的結合を導くのに十分な、標的ポリヌクレオチド配列との類似性を有する任意のポリヌクレオチド配列であり得る。いくつかの実施形態では、ガイド配列とその対応する標的配列との間の同一性度は、適した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に、約 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99% もしくはそれ以上または約 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99% もしくはそれ以上を超える。最適アラインメントは、配列をアラインするための任意の適したアルゴリズムを使用して決定される；限定されない例として、Smith-Waterman アルゴリズム、Needleman-Wunsch アルゴリズム、Burrows-Wheeler Transform (例えば、Burrows Wheeler Aligner) に基づくアルゴリズム、ClustalW、ClustalX、BLAT、Novoalign (Novocraft Technologies、ELAND (Illumina、San Diego、Calif.))、SOAP (soap.genomics.org.cn で入手可能)、Maq (maq.sourceforge.net で入手可能) などが挙げられる。

#### 【0191】

いくつかの実施形態では、ガイド配列は、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 もしくはそれ以上のうちいずれか 1 つのヌクレオチド長または約 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もしくはそれ以上のうちいずれか1つのヌクレオチド長を超える。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12もしくはそれ以下のうちいずれか1つのヌクレオチド長未満である。C R I S P R 複合体の標的配列との配列特異的結合を導くガイド配列の能力を調べるためのアッセイは、当技術分野で公知である。例えば、試験されるべきガイド配列を含むC R I S P R 複合体を形成するのに十分なC R I S P R システムの成分が、例えば、米国特許第8,697,359号に記載されるように、C R I S P R 配列の成分をコードするベクターのトランスフェクションと、それに続く、標的配列内の好ましい切断の評価などによって、対応する標的配列を有する宿主細胞に提供される。

10

#### 【0192】

いくつかの実施形態では、本開示のガイドRNA（例えば、第1のガイドRNA）は、配列番号41（S p C a s 9の）、配列番号45（S a C a s 9の）、配列番号46（S a C a s 9の）または配列番号47（S a C a s 9の）の配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示のガイドRNA（例えば、第1のガイドRNA）は、配列番号19（S p C a s 9の）、配列番号50（S a C a s 9の）、配列番号51（S a C a s 9の）または配列番号52（S a C a s 9の）の配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、C E P 2 9 0 遺伝子のC a s 切断のガイドRNAとしてのその機能を維持しながら、配列番号41（S p C a s 9の）、配列番号45（S a C a s 9の）、配列番号46（S a C a s 9の）、配列番号47（S a C a s 9の）、配列番号19（S p C a s 9の）、配列番号50（S a C a s 9の）、配列番号51（S a C a s 9の）または配列番号52（S a C a s 9の）の配列の1、2、3、4または5つの置換、欠失または挿入を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、C E P 2 9 0 遺伝子のC a s 切断のためのガイドRNAとしての機能が増強した、配列番号41（S p C a s 9の）、配列番号45（S a C a s 9の）、配列番号46（S a C a s 9の）、配列番号47（S a C a s 9の）、配列番号19（S p C a s 9の）、配列番号50（S a C a s 9の）、配列番号51（S a C a s 9の）または配列番号52（S a C a s 9の）のガイドRNAの変異体である。

20

#### 【0193】

いくつかの実施形態では、本開示のガイドRNA（例えば、第2のガイドRNA）は、配列番号42（S p C a s 9の）、配列番号43（S p C a s 9の）、配列番号44（S p C a s 9の）、配列番号48（S a C a s 9の）または配列番号49（S a C a s 9の）の配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示のガイドRNA（例えば、第2のガイドRNA）は、配列番号20（S p C a s 9の）、配列番号21（S p C a s 9の）、配列番号22（S p C a s 9の）、配列番号53（S a C a s 9の）または配列番号54（S a C a s 9の）の配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、C E P 2 9 0 遺伝子のC a s 切断のためのガイドRNAとしてのその機能を維持しながら、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17または配列番号18の配列の1、2、3、4または5つの置換、欠失または挿入を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、C E P 2 9 0 遺伝子のC a s 切断のためのガイドRNAとしての機能が増強した、配列番号42（S p C a s 9の）、配列番号43（S p C a s 9の）、配列番号44（S p C a s 9の）、配列番号48（S a C a s 9の）、配列番号49（S a C a s 9の）、配列番号20（S p C a s 9の）、配列番号21（S p C a s 9の）、配列番号22（S p C a s 9の）、配列番号53（S a C a s 9の）または配列番号54（S a C a s 9の）のガイドRNAの変異体である。

30

#### 【0194】

いくつかの実施形態では、t r a c r 配列およびt r a c r メイト配列は、これら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）を有する転写物をもたらすように、単一転写物内に含有される。いくつかの実施形態では、ヘアピン構造において使用するためのループ形成配列は、4ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態

40

50

では、ループ形成配列は、配列 G A A A を有する。しかし、代替配列のように、より長いまたはより短いループ配列が使用される。その他のループ形成配列の例として、制限するものではないが、C A A A および A A A G が挙げられる。いくつかの実施形態では、転写物または転写されたポリヌクレオチド配列は、少なくとも 2 以上のヘアピン、例えば、2、3、4 または 5 つのヘアピンを有する。いくつかの実施形態では、単一転写物は、転写終結配列、例えば、6 つの T ヌクレオチドなどのポリ T 配列をさらに含む。

#### 【0195】

##### I V . 深部イントロン突然変異

本開示のある特定の態様は、深部イントロン突然変異に関する。上記のように、深部イントロン突然変異によって、成熟（例えば、スプライスされた）mRNA に異常にイントロン配列を含めることが起こりうる。例えば、深部イントロン突然変異は、遺伝子にスプライス供与部位、スプライス受容部位、またはスライシングエンハンサー部位を導入しうる。その結果、イントロン配列が潜在性エキソンとして含められる。これによって典型的に、特に潜在性エキソンがフレームシフト突然変異または未成熟終止コドンを含む場合は、突然変異したポリペプチドが起こる。

#### 【0196】

上記のように、深部イントロン突然変異は、内因性のスプライス受容部またはスプライス供与部での突然変異とは対照的に、野生型スプライス受容配列およびスプライス供与配列の外側の突然変異を指す。典型的に、深部イントロン突然変異は、内因性のスプライス受容部位 / スプライス供与部位からある程度の距離で起こる。

#### 【0197】

いくつかの実施形態において、深部イントロン突然変異は、遺伝子の 5' スプライス供与部位から少なくとも約 100 ヌクレオチドに位置する。いくつかの実施形態において、深部イントロン突然変異は、遺伝子の 3' スプライス受容部位から少なくとも約 100 ヌクレオチドに位置する。いくつかの実施形態において、深部イントロン突然変異は、遺伝子の 5' スプライス供与部位から少なくとも約 100 ヌクレオチド、かつ 3' スプライス受容部位から少なくとも約 100 ヌクレオチドに位置する。いくつかの実施形態において、深部イントロン突然変異は、内因性のスプライス受容部位および / またはスプライス供与部位（例えば、5' スプライス供与部位および / または 3' スプライス受容部位）から約 100 ヌクレオチド超、約 150 ヌクレオチド超、約 200 ヌクレオチド超、約 250 ヌクレオチド超、300 ヌクレオチド超、約 350 ヌクレオチド超、約 400 ヌクレオチド超、約 450 ヌクレオチド超、約 500 ヌクレオチド超、約 550 ヌクレオチド超、約 600 ヌクレオチド超、約 650 ヌクレオチド超、約 700 ヌクレオチド超、約 750 ヌクレオチド超、約 800 ヌクレオチド超、約 850 ヌクレオチド超、約 900 ヌクレオチド超、約 950 ヌクレオチド超、約 1,000 ヌクレオチド超、約 1,500 ヌクレオチド超、約 2,000 ヌクレオチド超、約 2,500 ヌクレオチド超、約 3,000 ヌクレオチド超、約 3,500 ヌクレオチド超、約 4,000 ヌクレオチド超、約 4,500 ヌクレオチド超、約 5,000 ヌクレオチド超、約 5,500 ヌクレオチド超、約 6,000 ヌクレオチド超、約 6,500 ヌクレオチド超、約 7,000 ヌクレオチド超、約 7,500 ヌクレオチド超、約 8,000 ヌクレオチド超、約 8,500 ヌクレオチド超、約 9,000 ヌクレオチド超、約 9,500 ヌクレオチド超、約 10,000 ヌクレオチド超、約 10,500 ヌクレオチド超、約 11,000 ヌクレオチド超、約 11,500 ヌクレオチド超、約 12,000 ヌクレオチド超、約 12,500 ヌクレオチド超、約 13,000 ヌクレオチド超、約 13,500 ヌクレオチド超、約 14,000 ヌクレオチド超、約 14,500 ヌクレオチド超、約 15,000 ヌクレオチド超、約 15,500 ヌクレオチド超、約 16,000 ヌクレオチド超、約 16,500 ヌクレオチド超、約 17,000 ヌクレオチド超、約 17,500 ヌクレオチド超、約 18,000 ヌクレオチド超、約 18,500 ヌクレオチド超、約 19,000 ヌクレオチド超、約 19,500 ヌクレオチド超、約 20,000 ヌクレオチド超、約 20,500 ヌクレオチド超、約 21,000 ヌクレオチド超、約 21,500 ヌクレオチド超、約 22,000 ヌクレオチド超、約 22,500 ヌクレオチド超、約 23,000 ヌクレオチド超、約 23,500 ヌクレオチド超、約 24,000 ヌクレオチド超、約 24,500 ヌクレオチド超、約 25,000 ヌクレオチド超、約 25,500 ヌクレオチド超、約 26,000 ヌクレオチド超、約 26,500 ヌクレオチド超、約 27,000 ヌクレオチド超、約 27,500 ヌクレオチド超、約 28,000 ヌクレオチド超、約 28,500 ヌクレオチド超、約 29,000 ヌクレオチド超、約 29,500 ヌクレオチド超、約 30,000 ヌクレオチド超、約 30,500 ヌクレオチド超、約 31,000 ヌクレオチド超、約 31,500 ヌクレオチド超、約 32,000 ヌクレオチド超、約 32,500 ヌクレオチド超、約 33,000 ヌクレオチド超、約 33,500 ヌクレオチド超、約 34,000 ヌクレオチド超、約 34,500 ヌクレオチド超、約 35,000 ヌクレオチド超、約 35,500 ヌクレオチド超、約 36,000 ヌクレオチド超、約 36,500 ヌクレオチド超、約 37,000 ヌクレオチド超、約 37,500 ヌクレオチド超、約 38,000 ヌクレオチド超、約 38,500 ヌクレオチド超、約 39,000 ヌクレオチド超、約 39,500 ヌクレオチド超、約 40,000 ヌクレオチド超で起こる。

#### 【0198】

いくつかの実施形態において、深部イントロン突然変異は、内因性のスプライス受容部位および / またはスプライス供与部位（例えば、5' スプライス供与部位または 3' スプ

10

20

30

40

50

ライス受容部)から、(ヌクレオチドの単位で)およそ、以下の距離のいずれか未満の距離で起こる: 約 85,000; 80,000; 75,000; 70,000; 65,000; 60,000; 55,000; 50,000; 45,000; 40,000; 35,000; 30,000; 25,000; 20,000; 15,000; 10,000; 9,500; 9,000; 8,500; 8,000; 7,500; 7,000; 6,500; 6,000; 5,500; 5,000; 4,500; 4,000; 3,500; 3,000; 2,500; 2,000; 1,500; 1,000; 950; 900; 850; 800; 750; 700; 650; 600; 550; 500; 450; 400; 350; 300; 250; 200; または 150。いくつかの実施形態において、深部イントロン突然変異は、内因性のスライス受容部位および/またはスライス供与部位から、(ヌクレオチドの単位で)およそ、以下の距離のいずれかを超える距離で起こる: 約 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900; 950; 1,000; 1,500; 2,000; 2,500; 3,000; 3,500; 4,000; 4,500; 5,000; 5,500; 6,000; 6,500; 7,000; 7,500; 8,000; 8,500; 9,000; 9,500; 10,000; 15,000; 20,000; 25,000; 30,000; 35,000; 40,000; 45,000; 50,000; 55,000; 60,000; 65,000; 70,000; 75,000; または 80,000。すなわち、深部イントロン突然変異から内因性のスライス受容部位および/またはスライス供与部位(例えば、5'スライス供与部位)までの距離は、85,000; 80,000; 75,000; 70,000; 65,000; 60,000; 55,000; 50,000; 45,000; 40,000; 35,000; 30,000; 25,000; 20,000; 15,000; 10,000; 9,500; 9,000; 8,500; 8,000; 7,500; 7,000; 6,500; 6,000; 5,500; 5,000; 4,500; 4,000; 3,500; 3,000; 2,500; 2,000; 1,500; 1,000; 950; 900; 850; 800; 750; 700; 650; 600; 550; 500; 450; 400; 350; 300; 250; 200; または 150 の上限と、独立して選択される、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900; 950; 1,000; 1,500; 2,000; 2,500; 3,000; 3,500; 4,000; 4,500; 5,000; 5,500; 6,000; 6,500; 7,000; 7,500; 8,000; 8,500; 9,000; 9,500; 10,000; 15,000; 20,000; 25,000; 30,000; 35,000; 40,000; 45,000; 50,000; 55,000; 60,000; 65,000; 70,000; 75,000; または 80,000 の下限を有する距離の範囲(ヌクレオチドの単位で)であって、下限が上限未満である範囲のうちの任意のものである。

### 【0199】

本開示のある特定の態様は、例えば中でも個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療するために使用することができる方法、キット、組成物、およびウイルス粒子に関する。多様な深部イントロン突然変異が当技術分野で公知である。疾患と関連する例示的な深部イントロン突然変異を、以下の表1に提供する(表1に提供される特異的突然変異、遺伝子、およびイントロンサイズは、参照としてヒトDNA配列を指すことに注意されたい)。

### 【0200】

【表1】

表1. 深部イントロン突然変異と関連する例示的な疾患

表現型	遺伝子	突然変異	イントロン サイズ	公表された 医学論文#
無フィブリノーゲン血症	<i>FGB</i>	IVS1+2076A>G	2675	18853456
アルポート症候群	<i>COL4A5</i>	IVS6+1873G>A	2591	12436246
アルポート症候群	<i>COL4A5</i>	IVS29+2750A>G	8019	12436246
筋萎縮性側索硬化症	<i>SOD1</i>	IVS4+792C>G	1095	19847927
毛細血管拡張性運動失調症	<i>ATM</i>	IVS26+2968A>G	3126	15643608
毛細血管拡張性運動失調症	<i>ATM</i>	IVS37+1126A>G	2175	8755918
常染色体劣性多発性囊胞腎	<i>PKHD1</i>	IVS46+653A>G	12453	19021639
ベース症候群	<i>TAZ</i>	IVS3+110G>A	229	11735032
ベータサラセミア	<i>HBB</i>	IVS2+645C>T	850	6585831
ベータサラセミア	<i>HBB</i>	IVS2+705T>G	850	6298782
ベータサラセミア	<i>HBB</i>	IVS2+745C>G	850	6188062
先天性無フィブリノーゲン 血症	<i>FGG</i>	IVS6+660A>T	979	17854317
先天性白内障・顔貌異常・ ニューロパチー症候群	<i>CTDPI</i>	IVS6+389C>T	2505	14517542
先天性グリコシル化異常症 Ia型	<i>PMM2</i>	IVS7+19139C>T	34617	17307006
先天性グリコシル化異常症 II型	<i>SLC35A1</i>	IVS6+286insCACT	444	15576474
囊胞性線維症	<i>CFTR</i>	IVS12+1634A>G	2519	7534040
囊胞性線維症	<i>CFTR</i>	IVS19+11505C>G	12808	11134243
囊胞性線維症	<i>CFTR</i>	IVS22+12191C>T	14967	1384328
ジヒドロブテリジンレダク ターゼ欠乏症	<i>QDPR</i>	IVS3+2552A>G	9078	9341885
ファブリー病	<i>GLA</i>	IVS4+919G>A	1719	11828341
家族性黒色腫	<i>CDKN2A</i>	IVS2-105A>G	2659	11726555
急性骨髓性白血病の素因を 有する家族性血小板異常症	<i>CYBB</i>	IVS5+979G>T	2140	11566256

10

20

30

40

【0201】

【表2】

表現型	遺伝子	突然変異	イントロン サイズ	公表された 医学論文#
急性骨髓性白血病の素因を有する家族性血小板異常症	<i>CYBB</i>	IVS6+1657A>G	2803	16516412
ファンコニ貧血	<i>BRIP1</i>	IVS11+2767A>T	3264	16116423
ギテルマン症候群	<i>SLC12A3</i>	IVS13+1361C>T	1551	19668106
成長ホルモン不応症	<i>GHR</i>	IVS6+792A>G	11204	11468686
フリードライヒ運動失調症	<i>FXN</i>	GAAトリプレット リピート	10437	9259271
難聴	<i>MYO6</i>	IVS23+2321T>G	4185	18212818
血友病A	<i>F8</i>	IVS1+1567A>G	22809	18160816
血友病A	<i>F8</i>	IVS10+325A>G	3903	15284851
血友病A	<i>F8</i>	IVS18+530C>T	1738	23809411
血友病A	<i>F8</i>	IVS18+941C>T	1738	23809411
遺伝性巨赤芽球性貧血1	<i>CUBN</i>	IVS23+881C>G	1320	10080186
ヘルマンスキー・パドラーク症候群	<i>HPS3</i>	IVS16+2499G>A	4111	7901342
ホモシスチン尿症	<i>MTRR</i>	IVS6+469T>C	2420	20120036
メープルシロップ尿症	<i>DBT</i>	IVS8-550A>G	4057	9621512
マルファン症候群	<i>FBNI</i>	IVS63+375G>T	2793	18795226
メチオニンシントーゼ 欠乏症	<i>MTR</i>	IVS3+2305A>G	2470	9683607
メチオニンシントーゼ 欠乏症	<i>MTR</i>	IVS6+1088G>A	2759	9683607
メチルマロン酸血症	<i>MUT</i>	IVS11+3691C>A	7582	17966092
ミトコンドリア三機能 タンパク質欠乏症	<i>HADHB</i>	IVS7+615A>G	1453	18693053
ムコ多糖症II型	<i>IDS</i>	IVS7+3083A>G	3215	8940265
マルチミニコア病	<i>RYR1</i>	IVS100+2990A>G	4438	12719381
筋ジストロフィー	<i>DMD</i>	IVS1+36846G>A	191081	14659407
筋ジストロフィー	<i>DMD</i>	IVS1+36947G>A	191081	17041906
筋ジストロフィー	<i>DMD</i>	IVS2+5591T>A	170318	12522557
筋ジストロフィー	<i>DMD</i>	IVS9+46806C>T	52717	14659407
筋ジストロフィー	<i>DMD</i>	IVS25+2036A>G	8606	12754707
筋ジストロフィー	<i>DMD</i>	IVS25+2240A>G	8606	10094556
筋ジストロフィー	<i>DMD</i>	IVS27+6298C>A	7141	20485447

10

20

30

40

【表3】

表現型	遺伝子	突然変異	イントロン サイズ	公表された 医学論文#
筋ジストロフィー	<i>DMD</i>	IVS60+80228G>T	95846	14659407
筋ジストロフィー	<i>DMD</i>	IVS62+62296A>G	62581	12754707
筋ジストロフィー	<i>DMD</i>	IVS65+1215A>G	2830	17041906
筋ジストロフィー	<i>DMD</i>	IVS67+2714C>T	21056	20485447
神経線維腫症I型	<i>NFI</i>	IVS3+2025T>G	4092	19241459
神経線維腫症I型	<i>NFI</i>	IVS39+332A>G	4339	8829638
神経線維腫症I型	<i>NFI</i>	IVS39+4060A>G	4339	16470740
神経線維腫症I型	<i>NFI</i>	IVS54+790C>G	1110	19241459
ニーマン・ピック病C型	<i>NPC1</i>	IVS9+2021G>A	3030	19718781
眼白子症I型	<i>GPR143</i>	IVS7+748G>A	1618	16550551
オルニチンデルタアミノトランスフェラーゼ欠損症	<i>OAT</i>	IVS3+303C>G	3007	1992472
全身性エリテマトーデスの素因	<i>IRF5</i>	IVS1+198G>T	4021	16642019
プロピオン酸血症	<i>PCCA</i>	IVS14+2778A>G	4193	17966092
プロピオン酸血症	<i>PCCB</i>	IVS6+462A>G	9808	17966092
ラブドイド腫瘍	<i>SNF5/INI1</i>	IVS1+559A>G	4493	10556283
シュワルツ・ヤンペル症候群	<i>HSPG2</i>	IVS6+481C>T	1914	16927315
スティックラー症候群	<i>COL2A1</i>	IVS23+135G>A	371	16752401
全身性エリテマトーデス	<i>MFGE8</i>	IVS6+936A>G	1739	20213738
結節性硬化症	<i>TSC2</i>	IVS8+281C>T	1568	11068191
ウェルナー症候群	<i>WRN</i>	IVS18+7636A>G	10659	17478382
X連鎖高免疫グロブリンM血症	<i>CD40L</i>	IVS3+1011A>T	1925	15358621
X連鎖低リン酸血症	<i>PHEX</i>	IVS7+1268G>T	2855	11502821

## 【0203】

いくつかの実施形態において、深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害は、無フィブリノーゲン血症、アルポート症候群、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、常染色体劣性多発性囊胞腎、バース症候群、ベータサラセミア、先天性無フィブリノーゲン血症、先天性白内障・顔貌異常・ニューロパチー症候群、先天性グリコシル化異常症Ia型、先天性グリコシル化異常症II型、囊胞性線維症、ジヒドロプロテリジンレダクターゼ欠乏症、ファブリー病、急性骨髓性白血病の素因を有する家族性血小板異常症、ファンコニ貧血、ギテルマン症候群、成長ホルモン不応症、フリードライヒ運動失調症、血友病A、遺伝性巨赤芽球性貧血1、ヘルマンスキー・パドラック症候群、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症、マルファン症候群、メチオニンシントーゼ欠乏症、メチルマロン酸血症、ミトコンドリア三機能タンパク質欠乏症、ムコ多糖症II型、マルチミニコア病、筋ジストロフィー、神経線維腫症I型、ニーマン・ピック病C型、眼白子症I型、オルニチンデルタアミノトランスフェラーゼ欠損症、全身性エリテマトーデスの素因

10

20

30

40

50

、プロピオン酸血症、ラブドイド腫瘍、シュワルツ・ヤンペル症候群、スティックラー症候群、全身性エリテマトーデス、結節性硬化症、ウェルナー症候群、X連鎖高免疫グロブリンM血症、またはX連鎖低リン酸血症である。いくつかの実施形態において、深部イントロン突然変異は、表1に示される深部イントロン突然変異である。

【0204】

いくつかの実施形態において、深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害は、眼の疾患である。本明細書において使用される用語「眼の疾患」は、最も広い意味で使用され、角膜、光彩、水晶体、網膜、視神経、房水、結膜、1つまたはそれ以上の眼筋、強膜、硝子体、黄斑、中心窩、毛様体、1つまたはそれ以上の鞕帯または水晶体支持鞕帯小帯、瞳孔、前眼房、および/または後眼房を含むがこれらに限定されるわけではない、眼の任意の構造の病的状態を起源とする、または起因する疾患を指しうる。眼の疾患と関連する例示的な深部イントロン突然変異を、以下の表2に提供する（表2に提供される特異的突然変異、遺伝子、およびイントロンサイズは、参照としてヒトDNA配列を指すことに注意されたい）

【0205】

【表4】

表2. 深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患

表現型	遺伝子	突然変異	イントロン サイズ	公表された 医学論文#
レーバー先天黒内障	<i>CEP290</i>	IVS26+1655A>G	5838	16909394
視神経萎縮症	<i>OPA1</i>	IVS4b+364G>A	1031	24970096
網膜色素変性症	<i>PRPF31</i>	IVS13+654C>G	1992	19618371
網膜芽細胞腫	<i>RB1</i>	IVS23+6594A>G	7991	17299438
シュタルガルト病	<i>ABCA4</i>	IVS30+2001G>A	4396	23918662
アッシャー症候群	<i>USH1C</i>	イントロン5における VNTR	182	10973247
アッシャー症候群	<i>USH2A</i>	IVS40+8877A>G	11020	23924366
X連鎖網膜色素変性症	<i>OFD1</i>	IVS9+706A>G	1715	22619378
X連鎖網膜色素変性症	<i>RPGR</i>	IVS9+363G>A	2105	17405150

【0206】

いくつかの実施形態において、眼の疾患は、レーバー先天黒内障、視神経萎縮症、網膜色素変性症、網膜芽細胞腫、シュタルガルト病、アッシャー症候群、またはX連鎖網膜色素変性症である。いくつかの実施形態において、深部イントロン突然変異は、表2に示される深部イントロン突然変異である。

【0207】

いくつかの実施形態において、眼の疾患は、レーバー先天黒内障である。レーバー先天黒内障（LCA）は、重度の視力喪失、眼振、網膜機能障害、羞明、眼指兆候（例えば、眼をこする、突く、および押すこと）、および円錐角膜のような症状によって特徴付けられる眼の障害群を指す。LCAは、典型的に出生時に重度の視力喪失および眼振と共に現れる。LCAの症例は、典型的に常染色体劣性障害として遺伝するが、多様な遺伝子座の突然変異が関係している。例えば、表3はLCAの型に関係する座のいくつかを記載する。

【0208】

10

20

30

40

## 【表5】

表3. LCA疾患座

LCAの型	突然変異した遺伝子	ヒトにおける遺伝子座
LCA1	<i>GUCY2D</i>	17p13.1
LCA2	<i>RPE65</i>	1p31
LCA3	<i>SPATA7</i>	14q31.3
LCA4	<i>AIPL1</i>	17p13.1
LCA5	<i>LCA5</i>	6q14.1
LCA6	<i>RPGRIP1</i>	14q11
LCA7	<i>CRX</i>	19q13.3
LCA8	<i>CRB1</i>	1q31-32
LCA9	<i>NMNNAT1</i>	1p36
LCA10	<i>CEP290</i>	12q21
LCA11	<i>IMPDH1</i>	7q31.3-q32
LCA12	<i>RD3</i>	1q32.3
LCA13	<i>RDH12</i>	14q24.1
LCA14	<i>LRAT</i>	4q31
LCA15	<i>TULP1</i>	6p21.3
LCA16	<i>KCNJ13</i>	4q31
LCA17	<i>GDF6</i>	8q22
LCA18	<i>PRPH2</i>	6p21

10

20

## 【0209】

LCAの最も頻繁な型は、中心体および纖毛の発達において重要な役割を果たす中心体タンパク質をコードする C E P 2 9 0 の突然変異によって引き起こされる（例えば、例示的なヒト遺伝子およびタンパク質配列に関してはそれぞれ、N C B I G e n e I D N o . 8 0 1 8 4 および U n i P r o t I D N o . 0 1 5 0 7 8 を参照されたい）。C E P 2 9 0 は、網膜後部の光受容体、ならびに体の腎臓、脳、および他の多くの臓器において重要な役割を果たす細胞膜上的一次纖毛の形成において必須である。C E P 2 9 0 はまた、M K S 4 、C T 8 7 、P O C 3 、r d 1 6 、B B S 1 4 、L C A 1 0 、J B T S 5 、N P H P 6 、S L S N 6 、および 3 H 1 1 A g としても知られる。いくつかの実施形態において、原因となる突然変異は、潜在性スプライス供与部位を導入する c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異であり、それによって未成熟終止コドンと共に異常なエキソンを含めることが起こる。いくつかの実施形態において、第1のガイドR N A および第2のガイドR N A のガイド配列は、中心体タンパク質 2 9 0 k D a ( C E P 2 9 0 ) 遺伝子の深部イントロン突然変異の両端に位置する標的D N A配列の逆鎖にハイブリダイズする。ある特定の実施形態において、深部イントロン突然変異は、c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異である。いくつかの実施形態において、C E P 2 9 0 は、ヒトC E P 2 9 0 である（例えば、N C B I 参照配列 N G \_ 0 0 8 4 1 7 に従うヒトC E P 2 9 0 配列を参照されたい）。いくつかの実施形態において、C E P 2 9 0 は、配列番号 2 3 に記載の配列の深部イントロン突然変異を含む。

30

## 【0210】

本開示のある特定の態様はさらに、遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患の *i n v i t r o* モデルを作製する方法に関する。いくつかの実施形態において、方法は、真核細胞に、i ) 遺伝子におけるイントロンの標的D N A配列への单一ガイドR N A 、i i ) C a s タンパク質をコードするヌクレオチド配列、i i i ) 所望のイントロン突然変異およびプロトスペーサー隣接モチーフ ( P A M ) の両端に位置する相同性アームを含む相同性組換え修復 ( H D R ) 鑄型を含む一本鎖オリゴヌクレオチド、を含むC R I S P R - C a s システムをコードする核酸を導入することと、遺伝子に組み込まれた突然変異を含む細胞を単離することとを含む。このアプローチと関連する例示的な方法を以下の実施例に例証する。上記のように、C R I S P R - C a s 媒介D N A 切断は、N H E J によって修復され、それによって例えば標的D N A配列の切り出しが起こりうる。

40

50

しかし、C R I S P R - C a s 媒介D N A切断はまた、相同性組換え修復（H D R）によつても修復され、それによつて例えばH D R 鑄型に存在する配列の導入（例えば、深部イントロン突然変異の導入）が起こる。例えば、R a n , F . A . e t a l . ( 2 0 1 3 ) N a t . P r o t o c . 8 : 2 2 8 1 ~ 2 3 0 8 頁を参照されたい。これらの方法は、治療方法、ウイルス粒子、組成物、およびキットに関して本明細書において記述される任意の特徴、態様、または要素を含みうる。

#### 【 0 2 1 1 】

相同性組換え修復（H D R）鑄型は、二本鎖D N A ポリヌクレオチド、または一本鎖D N A オリゴヌクレオチド（s s O D N ）のような多様な形態をとることができ。H D R 鑄型は、所望のイントロン突然変異の両端に位置する1つまたはそれ以上の相同性アームを含みうる。これらの相同性アームは、標的座と比較してセンスまたはアンチセンス方向でありうる。いくつかの実施形態において、1つまたはそれ以上の相同性アームは、標的座から少なくとも約40塩基対、少なくとも約50塩基対、少なくとも約60塩基対、少なくとも約70塩基対、少なくとも約80塩基対、少なくとも約90塩基対、または少なくとも約100塩基対離れうる。

10

#### 【 0 2 1 2 】

H D R 鑄型はまた、プロトスペーサー隣接モチーフ（P A M ）も含みうる。いくつかの実施形態において、P A M は、細胞中の発現されたC a s タンパク質による一本鎖オリゴヌクレオチドの切断を回避するために突然変異を含む。例えば、P A M は、特定の発現されたC a s タンパク質がH D R 鑄型を切断しないように突然変異させてもよく、またはゲノム座のC R I S P R - C a s 媒介編集時に、識別配列（例えば、以下の実施例に例証される独自の制限部位）が、導入されるように突然変異させてもよい。

20

#### 【 0 2 1 3 】

任意の適した真核細胞をi n v i t r o モデルのために使用してもよい。いくつかの実施形態において、真核細胞は哺乳動物またはヒト細胞である。いくつかの実施形態において、真核細胞は、ヒト細胞株（例えば、H e L a 、A 5 4 9 、2 9 3 等）、哺乳動物細胞株、脊椎動物細胞株、または昆虫細胞株（例えば、S f 9 、またはS 2 ）のような細胞株である。いくつかの実施形態において、真核細胞は、光受容細胞のような網膜細胞（例えば、W E R I 細胞）である。

#### 【 0 2 1 4 】

30

#### V . 送達方法

本開示のある特定の態様は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療することに関する。いくつかの態様において、本発明は、個体の遺伝子における深部イントロン突然変異と関連する疾患または障害を治療する方法であつて、個体に本開示の組成物、例えば本開示の遺伝子操作された、天然に存在しないC R I S P R - C a s システムをコードする核酸を含む組成物の治療有効量を投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、遺伝子操作された、天然に存在しないC R I S P R - C a s システムをコードする核酸は、D N A またはR N A でありうる。いくつかの実施形態において、C a s タンパク質はタンパク質として送達される。

#### 【 0 2 1 5 】

40

#### ベクター

いくつかの実施形態において、1つまたはそれ以上の第1のガイドR N A 、第2のガイドR N A 、またはC a s タンパク質をコードする核酸は、システムの同じまたは異なるベクターに位置する。いくつかの実施形態において、C R I S P R システムの1つまたはそれ以上のエレメントの発現を駆動する（d r i v i n g ）1つまたはそれ以上のベクターは、C R I S P R システムのエレメントの発現が、1つまたはそれ以上の標的部位でC R I S P R 複合体の形成を導くように、細胞に導入される。例えば、C a s 酵素、t r a c r メイト配列に連結したガイド配列、およびt r a c r 配列をそれぞれ、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連結することができる。あるいは、2つまたはそれ以上の上記のエレメントを、同じもしくは異なる調節エレメントから発現させてもよく

50

、および／または場合により第1のベクターに含まれないC R I S P Rシステムの任意の構成要素を提供する1つもしくは複数の追加のベクターと共に単一のベクターにおいて組み合わせてもよい。ベクターにおいて組み合わせたC R I S P Rシステムのエレメントを、任意の適した方向に配置してもよい。例えば、1つの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じもしくは逆の鎖に位置してもよく、および／または同じもしくは逆方向を向いてもよい。

【0216】

いくつかの実施形態において、1つのプロモーターが、C a sタンパク質と、1つまたはそれ以上のガイド配列、t r a c rメイト配列（場合によりガイド配列に作動可能に連結された）、および1つまたはそれ以上のイントロン配列内に埋もれたt r a c r配列（例えば、それぞれが異なるイントロン、少なくとも1つのイントロンのうちの2つもしくはそれ以上、または単一のイントロンにおける全て）をコードする転写物の発現を駆動する。いくつかの実施形態において、C a sタンパク質、ガイド配列、t r a c rメイト配列、およびt r a c r配列は、同じプロモーターに作動可能に連結され、同じプロモーターから発現される。いくつかの実施形態において、第1のガイドR N A、第2のガイドR N A、および／またはC a sタンパク質をコードする核酸は、1つまたはそれ以上の調節制御エレメントおよび／またはプロモーターに作動可能に連結される。

【0217】

いくつかの実施形態において、ベクターはプラスミドである。

【0218】

いくつかの実施形態において、第1のガイドR N A、第2のガイドR N A、およびC a sタンパク質は、真核細胞において発現される。いくつかの実施形態において、第1のガイドR N A、第2のガイドR N A、およびC a sタンパク質は、真核細胞における発現を可能にする1つまたはそれ以上のプロモーターに作動可能に連結される。真核細胞において発現される多様なプロモーターが当技術分野で公知である。限定されない例示的なプロモーターを以下に提供する。

【0219】

いくつかの実施形態において、第1のガイドR N Aおよび／または第2のガイドR N Aは、R N AポリメラーゼI I Iプロモーターに作動可能に連結される。R N AポリメラーゼI I Iプロモーターは、R N AポリメラーゼI I Iによる転写を駆動するために十分な完全長のプロモーターまたはその断片を含みうる。R N AポリメラーゼI I Iプロモーターの型、構造特徴、およびR N AポリメラーゼI I Iとの相互作用、ならびに適したR N AポリメラーゼI I Iプロモーターのより詳細な説明に関しては、S c h r a m m , L . and Hernández , N . ( 2 0 0 2 ) G e n e s D e v . 1 6 : 2 5 9 3 ~ 6 2 0 頁を参照されたい。t R N A、5 S R N A、U 6 s n R N A、H 1、7 S K、R N AーゼP、シグナル認識粒子のR N A構成要素、およびs n o R N Aを含むがこれらに限定されるわけではない、当技術分野で公知の任意の適したR N AポリメラーゼI I Iプロモーターを使用してもよい（例えば、M a , H . e t a l . ( 2 0 1 4 ) M o l . T h e r . N u c l e i c A c i d s 3 : e 1 6 1を参照されたい）。いくつかの実施形態において、R N AポリメラーゼI I IプロモーターはU 6、H 1、または7 S Kプロモーターである。いくつかの実施形態において、第1のガイドR N Aおよび／または第2のガイドR N Aは、R N AポリメラーゼI I Iターミネーターに作動可能に連結する。R N AポリメラーゼI I Iターミネーターの例には、長さが少なくとも5 ~ 6 塩基の一連のウリジンヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されるわけではない（R N AポリメラーゼI I Iターミネーターに関するより詳細な情報に関しては、M a r c k , C . , e t a l . ( 2 0 0 6 ) N u c l e i c A c i d s R e s 3 4 ( 6 ) : 1 8 1 6 ~ 3 5 頁を参照されたい）。

【0220】

いくつかの実施形態において、C a sタンパク質をコードする核酸は、R N AポリメラーゼI Iプロモーターに作動可能に連結する。R N AポリメラーゼI Iプロモーターは、

10

20

30

40

50

R N A ポリメラーゼ I I による転写を駆動するために十分な完全長のプロモーターまたはその断片を含みうる。当技術分野で公知の任意の適した R N A ポリメラーゼ I I プロモーターを使用してもよく、これらにはサイトメガロウイルス ( C M V ) 最初期プロモーター、 C M V プロモーター由来の最小プロモーター断片 ( m i n C M V プロモーター ) 、 R S V L T R 、 M o M L V L T R 、ホスホグリセリン酸キナーゼ - 1 ( P G K ) プロモーター、サルウイルス 4 0 ( S V 4 0 ) プロモーター、および C K 6 プロモーター、トランスサイレチンプロモーター ( T T R ) 、 T K プロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター ( T R E ) 、 H B V プロモーター、 h A A T プロモーター、 L S P プロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター ( L S P ) 、 E 2 F プロモーター、テロメラーゼ ( h T E R T ) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー / ニワトリベータ - アクチン / ウサギベータ - グロビンプロモーター ( C A G プロモーター ; Niwa et al. , Gene , 1991 , 108 ( 2 ) : 193 ~ 9 頁 ) 、および伸長因子 1 - アルファプロモーター ( E F 1 - アルファ ) プロモーター ( Kim et al. , Gene Ther. , 1990 , 91 ( 2 ) : 217 ~ 23 頁および Guo et al. , Gene Ther. , 1996 , 3 ( 9 ) : 802 ~ 10 頁 ) が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。いくつかの実施形態において、プロモーターは、ヒトベータ - グルクロニダーゼプロモーター、またはニワトリベータ - アクチン ( C B A ) プロモーターに連結したサイトメガロウイルスエンハンサーを含む。プロモーターは、構成的、誘導可能、または抑制可能なプロモーターでありうる。いくつかの実施形態において、プロモーターは、眼の細胞において異種核酸を発現することができる。いくつかの実施形態において、プロモーターは、光受容細胞または R P E において異種核酸を発現することができる。実施形態において、プロモーターは、ロドブシンキナーゼ ( R K ) プロモーター、例えばヒト R K プロモーターである。いくつかの実施形態において、プロモーターはオプシンプロモーター、例えばヒトオプシンプロモーターまたはマウスオプシンプロモーターである。いくつかの実施形態において、プロモーターは、桿体オプシンプロモーター、錐体オプシンプロモーター、ベータホスホジエステラーゼ ( P D E ) プロモーター、網膜色素変性症 ( R P 1 ) プロモーター、または光受容体間レチノイド結合タンパク質遺伝子 ( I R B P ) プロモーターである。

#### 【 0 2 2 1 】

誘導可能なプロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にし、外部から供給された化合物、温度のような環境要因、もしくは特異的生理状態、例えば急性期、細胞の特定の分化状態の存在によって、または複製中の細胞に限って調節することができる。誘導可能なプロモーターおよび誘導可能なシステムは、 I n v i t r o g e n 、 C l o n t e c h 、および A r i a d を含むがこれらに限定されるわけではない、多様な販売元から入手可能である。他の多くのシステムが記載されており、当業者が容易に選択することができる。外部から供給されるプロモーターによって調節される誘導可能なプロモーターの例には、亜鉛で誘導可能なヒツジメタロチオネイン ( M T ) プロモーター、デキサメタゾン ( D e x ) で誘導可能なマウス乳腺腫瘍ウイルス ( M M M V ) プロモーター、 T 7 ポリメラーゼプロモーターシステム ( 国際公開第 9 8 / 1 0 0 8 8 号 ) 、エクジソン昆虫プロモーター ( N o et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. U S A , 93 : 3346 ~ 3351 頁 ( 1996 ) ) 、テトラサイクリン発現抑制可能なシステム ( G o s s e n et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. U S A , 89 : 5547 ~ 5551 頁 ( 1992 ) ) 、テトラサイクリンで誘導可能なシステム ( G o s s e n et al. , S c i e n c e , 268 : 1766 ~ 1769 頁 ( 1995 ) ) 、同様に H a r v e y et al. , Curr. Opin. Chem. Biol. , 2 : 512 ~ 518 頁 ( 1998 ) も参照されたい ) 、 R U 4 8 6 で誘導可能なシステム ( W a n g et al. , Nat. Biotech. , 15 : 239 ~ 243 頁 ( 1997 ) ) 、および W a n g et al. , Gene Ther. , 4 : 432 ~ 441 頁 ( 1997 ) ) ならびにラバマイシンで誘導可能なシステム ( M a g a r i et al. , J. Clin. Invest. , 100 : 2865 ~ 2872 頁 ( 1997 ) ) が挙げられる。本文にお

いて有用でありうるさらに他の型の誘導可能なプロモーターは、特異的生理状態、例えば温度、急性期、細胞の特定の分化状態によって、または複製中の細胞に限って調節されるプロモーターである。

【0222】

別の実施形態において、トランスジーンのネイティブプロモーターまたはその断片が使用される。ネイティブプロモーターは、トランスジーンの発現がネイティブの発現を模倣することが望ましいときに使用することができる。トランスジーンの発現を時間的もしくは発達的に、または組織特異的に、または特異的転写刺激に応答して調節しなければならないとき、ネイティブプロモーターを使用してもよい。さらなる実施形態において、エンハンサー要素、ポリアデニル化部位、またはコザックコンセンサス配列のような他のネイティブ発現制御エレメントもまた、ネイティブ発現を模倣するために使用してもよい。

10

【0223】

いくつかの実施形態において、調節配列は、組織特異的遺伝子発現能を付与する。一部の場合において、組織特異的調節配列は、組織特異的に転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。そのような組織特異的調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー等）は、当技術分野で周知である。例示的な組織特異的調節配列には、以下の組織特異的プロモーターが挙げられるがこれらに限定されるわけではない：ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター（Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13: 503~15頁（1993））、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子プロモーター（Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5611~5頁（1991））、およびニューロン特異的v<sub>g</sub>f遺伝子プロモーター（Piccioli et al., Neuron, 15: 373~84頁（1995））のようなニューロン特異的プロモーター。いくつかの実施形態において、組織特異的プロモーターは、神経核（NeuN）、グリア原線維酸性タンパク質（GFAP）、腺腫性大腸ポリポーラス（APC）、およびイオン化カルシウム結合アダプター分子1（Iba-1）から選択される遺伝子のプロモーターである。他の適切な組織特異的プロモーターは、当業者に明らかであろう。いくつかの実施形態において、プロモーターはニワトリベータ-アクチングリオブロモーターである。

20

【0224】

30

本発明は、ウイルス粒子、例えば以下に記述されるウイルス粒子にパッケージングするために、1つまたはそれ以上の核酸配列（例えば、ガイドRNAおよび/またはCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列）を導入するための組み換え型ウイルスゲノムの使用を企図する。組換えウイルスゲノムは、ガイドRNAおよび/またはCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現を確立するための任意のエレメント、例えば、プロモーター、ITR、リボソーム結合エレメント、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、イントロン、ポリAシグナル、および/または複製開始点を含みうる。例示的なウイルスゲノムエレメントおよび多様なウイルス粒子の送達方法を以下により詳細に説明する。

【0225】

40

非ウイルス送達システム

通常の非ウイルス遺伝子移入方法もまた、細胞または標的組織に核酸を導入するために使用することができる。非ウイルスベクター送達システムは、DNAプラスミド、RNA（例えば、ガイドRNAまたはCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列）、裸の核酸（例えば、DNAまたはRNA）、および送達システムと複合体形成した核酸（例えば、DNAまたはRNA）を含む。例えば、ベクターは、脂質（例えば、カチオン性または中性脂質）、リボソーム、ポリカチオン、ナノ粒子、または核酸の細胞取り込みを増強する試剤と複合体形成してもよい。ベクターは、本明細書において記述されるいかなる送達方法にも適した試剤と複合体を形成することができる。

【0226】

50

核酸の非ウイルス送達方法は、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリストイック、ナノ粒子（例えば、Jin, S. et al. (2009) *Methods Mol. Biol.* 544: 547~557頁）、ピロゾーム、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、裸のDNA、人工ビリオン、および試剤によるDNAの取り込みの増強を含む。リポフェクションは、例えば米国特許第5,049,386号、第4,946,787号；および第4,897,355号に記述され、リポフェクション試薬は市販されている（例えば、*Lipofectamine*（登録商標）、*Transfectam*（商標）、および*Lipofection*（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とって適したカチオン性および中性の脂質は、*Felgner*、国際公開第91/17424号；国際公開第91/16024号に記載の脂質を含む。  
10

#### 【0227】

免疫脂質複合体のような標的化リポソームを含む、脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、*Crystal, Science* 270: 404~410頁（1995）；*Blaese et al.*, *Cancer Gene Ther.* 2: 291~297頁（1995）；*Behr et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5: 382~389頁（1994）；*Remy et al.*, *Bioconjugate Chem.* 5: 647~654頁（1994）；*Gao et al.*, *Gene Therapy* 2: 710~722頁（1995）；*Ahmad et al.*, *Cancer Res.* 52: 4817~4820頁（1992）；米国特許第4,186,183号、第4,217,344号、第4,235,871号、第4,261,975号、第4,485,054号、第4,501,728号、第4,774,085号、第4,837,028号、および第4,946,787号を参照されたい）。  
20

#### 【0228】

本開示のベクターと複合体形成することができる他の化合物には、カチオン性ペプチド（例えば、ポリL-リシン）、塩（例えば、リン酸カルシウム）、DEAEデキストラン、デンドリマー（例えば、ポリアミドアミンまたはPAMAM）、ポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン（PEI）、およびそのコンジュゲート等が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。そのような試剤のより詳細な考察に関しては、例えば、*Lu, D. and Saltzman, W. M.* (2000) *Nature Biotechnology* 18: 33~37頁を参照されたい。  
30

#### 【0229】

いくつかの実施形態において、核酸は医薬製剤中にある。いくつかの実施形態において、医薬製剤は、薬学的に許容される担体を含む。そのような担体は当技術分野で周知である（例えば、*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15th Edition, 1035~1038頁および1570~1580頁を参照されたい）。いくつかの実施形態において、本明細書において記述される核酸と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物は、眼の注射にとって適している。そのような薬学的に許容される担体は、滅菌液体、例えば水、および石油、動物、植物、または合成起源の油を含む油、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油等を含む油でありうる。食塩水溶液およびデキストロース水溶液、ポリエチレングリコール（PEG）およびグリセロール溶液もまた、特に注射用溶液のための液体担体として使用することができる。医薬組成物はさらに、追加の成分、例えば保存剤、緩衝剤、等張剤、抗酸化剤および安定剤、非イオン性湿润剤または清澄剤、増粘剤等を含みうる。本明細書において記述される医薬組成物は、単回単位用量または複数回単位用量に包装することができる。組成物は一般的に、無菌的で実質的に等張の溶液として製剤化される。  
40

#### 【0230】

ウイルス粒子

いくつかの実施形態において、ベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクター、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクター、または組換え  
50

単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターである。

【0231】

rAAV粒子

いくつかの実施形態において、ベクターは、組換えAAV（rAAV）ベクターである。いくつかの実施形態において、第1のガイドRNA、第2のガイドRNA、またはCasタンパク質の1つまたはそれ以上をコードする核酸は、1つまたはそれ以上のAAV逆方向末端反復（ITR）配列がその両端に位置する。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は、1つまたは2つのITRが両端に位置するトランスジーンを含む核酸を含む組換えAAV粒子である。いくつかの実施形態において、第1のガイドRNA、第2のガイドRNA、またはCasタンパク質の1つまたはそれ以上をコードする核酸は2つのAAV IT Rがその両端に位置する。

【0232】

いくつかの実施形態において、核酸は、転写の方向に構成要素が作動可能に連結された、本開示の1つまたは2つのガイドRNA、および/または本開示のCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列、転写開始および終止配列を含む制御配列を含み、それによって発現カセットを形成する。発現カセットは、5'および3'末端上で少なくとも1つの機能的AAV IT R配列が両端に位置する。「機能的AAV IT R配列」とは、IT R配列がAAVビリオンのレスキュー、複製、およびパッケージングに関して意図されるように機能することを意味する。その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Davidson et al., PNAS, 2000, 97(7):3428~32頁；P 20  
assini et al., J. Virol., 2003, 77(12):7034~40頁；およびPechan et al., Gene Ther., 2009, 16:10~16頁を参照されたい。本発明のいくつかの態様の実施に関して、組換えベクターは、キャプシド封入に必須のAAVの配列およびrAAVによる感染のための物理的構造の少なくとも全てを含む。本発明のベクターにおいて使用するためのAAV IT Rは、野生型ヌクレオチド配列（例えば、Kotin, Hum. Gene Ther., 1994, 5:793~801頁に記述されるように）を有する必要はなく、ヌクレオチドの挿入、欠失、もしくは置換によって変化してもよく、またはAAV IT RはいくつかのAAV血清型のいずれに由来してもよい。AAVの40超の血清型が現在公知であり、新規血清型および既存の血清型の変異体が絶えず同定されている。Gao et al., P 30  
NAS, 2002, 99(18):11854~6頁；Gao et al., PNAS, 2003, 100(10):6081~6頁；およびBossis et al., J. Virol., 2003, 77(12):6799~810頁を参照されたい。

【0233】

任意のAAV血清型の使用が本発明の範囲内で検討される。いくつかの実施形態において、rAAVベクターは、以下を含むがこれらに限定されるわけではないAAV血清型に由来するベクターである。AAV IT Rは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV IT Rなどである。いくつかの実施形態において、AAV中の核酸は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAVなどである、AAV IT RのIT Rを含む。ある特定の実施形態において、AAV IT RsはAAV2 IT Rである。

【0234】

いくつかの実施形態において、ベクターは、スタッファー核酸を含みうる。いくつかの実施形態において、スタッファー核酸は、緑色蛍光タンパク質をコードしうる。いくつかの実施形態において、スタッファー核酸は、プロモーターと、1つまたはそれ以上の本開示の1つもしくは2つのガイドRNAおよび/または本開示のCasタンパク質をコード

10

20

30

40

50

するヌクレオチド配列との間に位置しうる。

【0235】

いくつかの態様において、本発明は、組換え自己相補的ゲノムを含むウイルス粒子を提供する。いくつかの実施形態において、ベクターは自己相補的ベクターである。自己相補的ゲノムを有する AAV ウィルス粒子および自己相補的 AAV ゲノムを使用する方法は、その全体が参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第 6,596,535 号；第 7,125,717 号；第 7,765,583 号；第 7,785,888 号；第 7,790,154 号；第 7,846,729 号；第 8,093,054 号；および第 8,361,457 号；ならびに Wang Z., et al., (2003) Gene Ther 10: 2105~2111 頁に記述されている。自己相補的ゲノムを含む rAAV は、その部分的に相補的な配列（例えば、トランスジーンの相補的なコードおよび非コード鎖）のために、急速に二本鎖 DNA 分子を形成する。いくつかの実施形態において、本発明は、AAV ゲノムを含む AAV ウィルス粒子を提供し、rAAV ゲノムは、第 1 の異種ポリヌクレオチド配列（例えば、本開示の 1 つまたは 2 つのガイド RNA および / または本開示の Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列）と、第 2 の異種ポリヌクレオチド配列（例えば、本開示の 1 つまたは 2 つのガイド RNA の非コードまたはアンチセンス鎖および / または本開示の Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列）とを含み、第 1 の異種ポリヌクレオチド配列は、その長さのほとんどまたは全てに沿って、第 2 のポリヌクレオチド配列と鎖内塩基対を形成することができる。

【0236】

いくつかの実施形態において、第 1 の異種ポリヌクレオチド配列および第 2 の異種ポリヌクレオチド配列は、鎖内塩基対形成、例えばヘアピン DNA 構造を促進する配列によって連結される。例えば siRNA 分子におけるヘアピン構造は、当技術分野で公知である。いくつかの実施形態において、第 1 の異種ポリヌクレオチド配列および第 2 の異種ポリヌクレオチド配列は、突然変異 ITR（例えば、右の ITR）によって連結される。突然変異 ITR は、末端解離配列を含む D 領域の欠失を含む。その結果、AAV ウィルスゲノムが複製すると、rep タンパク質は、突然変異 ITR でウィルスゲノムを切断せず、そのため、以下を 5' から 3' の順に含む組換えウィルスゲノムが、ウィルスキャプシドにパッケージングされる：AAV ITR、調節配列を含む第 1 の異種ポリヌクレオチド配列、突然変異 AAV ITR、第 1 の異種ポリヌクレオチドとは逆方向の第 2 の異種ポリヌクレオチド、および第 3 の AAV ITR。

【0237】

いくつかの実施形態において、第 1 の異種核酸配列および第 2 の異種核酸配列は、突然変異 ITR（例えば、右の ITR）によって連結される。いくつかの実施形態において、ITR は、ポリヌクレオチド配列 5' - C A C T C C C T C T C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C C A C G C C C G G G C T T G C C C G G G C G - 3'（配列番号 24）を含む。突然変異 ITR は、末端解離配列を含む D 領域の欠失を含む。その結果、AAV ウィルスゲノムが複製すると、rep タンパク質は、突然変異 ITR でウィルスゲノムを切断せず、そのため、以下を 5' から 3' の順に含む組換えウィルスゲノムが、ウィルスキャプシドにパッケージングされる：AAV ITR、調節配列を含む第 1 の異種ポリヌクレオチド配列、突然変異 AAV ITR、第 1 の異種ポリヌクレオチドとは逆方向の第 2 の異種ポリヌクレオチド、および第 3 の AAV ITR。

【0238】

いくつかの実施形態において、ベクターはウイルス粒子にキャプシド封入される。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は、組換え AAV ベクターを含む組換え AAV ウィルス粒子である。異なる AAV 血清型を使用して、特定の標的細胞の形質導入を最適化する、または特定の標的組織（例えば、眼の組織）内の特異的細胞型を標的とすることができます。rAAV 粒子は、同じ血清型または混合血清型のウイルスタンパク質およびウイルス核酸を含みうる。例えば、いくつかの実施形態において、rAAV 粒子は、本発明の

10

20

30

40

50

AAV2キャプシドタンパク質と少なくとも1つのAAV2-ITRとを含むことができ、またはAAV2キャプシドタンパク質と少なくとも1つのAAV1-ITRとを含むことができる。rAAV粒子の産生のためのAAV血清型のいかなる組み合わせも、それぞれの組み合わせが本明細書において明白に述べられていたかのように本明細書において提供される。いくつかの実施形態において、本発明は、本発明のAAV2キャプシドを含むrAAV粒子を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、本発明のAAVrh8Rキャプシドを含むrAAV粒子を提供する。

#### 【0239】

いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、AAV1キャプシド、AAV2キャプシド、AAV3キャプシド、AAV4キャプシド、AAV5キャプシド、AAV6キャプシド（例えば、野生型AAV6キャプシド、または米国特許付与前公報第2012/0164106号に記述されるShH10のような変異体AAV6キャプシド）、AAV7キャプシド、AAV8キャプシド、AAVrh8キャプシド、AAVrh8Rキャプシド、AAV9キャプシド（例えば、野生型AAV9キャプシド、または米国特許付与前公報第2013/0323226号に記述される改変されたAAV9キャプシド）、AAV10キャプシド、AAVrh10キャプシド、AAV11キャプシド、AAV12キャプシド、チロシンキャプシド突然変異体、ヘアピン結合キャプシド突然変異体、AAV2R471Aキャプシド、AAVAAV2/2-7m8キャプシド、AAV-DJキャプシド（例えば、AAV-DJ/8キャプシド、AAV-DJ/9キャプシド、または米国特許付与前公報第2012/0066783号に記述される他の任意のキャプシド）、AAV2N587Aキャプシド、AAV2E548Aキャプシド、AAV2N708Aキャプシド、AAV-V708Kキャプシド、ヤギAAVキャプシド、AAV1/AAV2キメラキャプシド、ウシAAVキャプシド、マウスAAVキャプシド、rAAV2/HBoV1キャプシド、または米国特許第8,283,151号もしくは国際出願国際公開第2003/042397号に記述されるAAVキャプシドを含む。いくつかの実施形態において、突然変異体キャプシドタンパク質は、AAVキャプシドの形成能を維持する。いくつかの実施形態において、rAAV粒子はAAV5チロシン突然変異体キャプシドを含む（Zhong L. et al. (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105(22):7827~7832頁）。さらなる実施形態において、rAAV粒子は、クレードA~FのAAV血清型のキャプシドタンパク質を含む（Gao, et al., J. Virol. 2004, 78(12): 6381頁）。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、AAV1キャプシドタンパク質またはその突然変異体を含む。他の実施形態において、rAAVウイルス粒子は、AAV2キャプシドタンパク質またはその突然変異体を含む。いくつかの実施形態において、AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、またはAAVrh10である。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、AAV血清型1(AAV1)キャプシドを含む。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、AAV血清型2(AAV2)キャプシドを含む。いくつかの実施形態において、組換えAAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9、および/またはAAVrh10キャプシドを含む。いくつかの実施形態において、AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9、および/またはAAVrh10キャプシドは、例えば以下に記述されるチロシン突然変異またはヘパラン結合突然変異を含む。

#### 【0240】

AAV（例えば、AAV2、AAVrh8R等）のキャプシドは、3つのキャプシドタンパク質：VP1、VP2、およびVP3を含むことが知られている。これらのタンパク質は、有意な量の重なり合うアミノ酸配列および独自のN末端配列を含む。AAV2キャプシドは、正二十面体の対称性で配置される60のサブユニットを含む（Xie, Q., et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99(16): 10405~1050頁）。VP1、VP2、およびVP3は、1:1:10の比率で存在するこ

とが見出されている。

【0241】

AAV2キャプシドタンパク質とHSPGの間の結合は、塩基性のAAV2キャプシドタンパク質残基と陰性荷電のグリコサミノグリカン残基との間の静電気相互作用を介して起こることが知られている(Opie, S R et al., (2003) J. Virol. 77: 6995~7006頁; Kern, A et al., (2003) J. Virol. 77: 11072~11081頁)。これらの相互作用に関する特異的キャプシド残基は、R484、R487、K532、R585、およびR588を含む。これらの残基における突然変異は、HeLa細胞およびヘパランそのものに対するAAV2の結合を低減させることが示されている(Opie, S R et al., (2003) J. Virol. 77: 6995~7006頁; Kern, A et al., (2003) J. Virol. 77: 11072~11081頁; 国際公開第2004/027019

A2号、米国特許第7,629,322号)。さらに、理論に捉われることを望むものではないが、AAV2のVP1ナンバリングに基づくナンバリングのアミノ酸484、487、532、585、または588位に対応する1つまたはそれ以上の残基でのアミノ酸置換は、HSPGに結合しないAAVキャプシド型の形質導入特性を調節し得るか、またはそのHSPGの結合能とは無関係にAAVキャプシド型の形質導入特性を調節し得ると考えられている。

【0242】

いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、HSPGと相互作用する残基で、またはAAV2のVP1ナンバリングに基づくナンバリングのアミノ酸484、487、532、585、または588位に対応する1つまたはそれ以上の残基で、キャプシドタンパク質において突然変異を有する。したがって、いくつかの実施形態において、送達時に、rAAVベクターによってコードされる異種核酸は、参照rAAVキャプシドタンパク質(例えば、野生型rAAVキャプシドタンパク質)を含むrAAVキャプシドを含むrAAV粒子の異種核酸の発現レベルと比較して、増加した発現レベルで発現される。いくつかの実施形態において、核酸の発現は、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、または少なくとも約100%増加する。いくつかの実施形態において、送達時に、rAAV粒子は、参照rAAVキャプシドタンパク質(例えば、野生型rAAVキャプシドタンパク質)を含むrAAV粒子と比較して、低減された神経炎症を引き起こす。いくつかの実施形態において、神経炎症は、なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、または少なくとも約100%低減される。適した参照rAAVキャプシドタンパク質は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンと相互作用する1つまたはそれ以上の位置で1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を欠如する任意のキャプシドタンパク質を含みうる(このため、参照キャプシドは、HSPGに対する結合を変化させない1つまたはそれ以上の「バックグラウンド」置換を含みうる)。

【0243】

いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、a)ヘパラン硫酸プロテオグリカンと相互作用する1つまたはそれ以上の位置で1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含むrAAVキャプシドタンパク質を含むrAAVキャプシド、およびb)異種核酸と少なくとも1つのAAV逆方向末端反復配列とを含むrAAVベクターを含む。

【0244】

いくつかの実施形態において、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換により、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに対するrAAV粒子の結合は、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、または少なくとも約100%低減する。いくつかの実施形態において、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換により、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに対するrAAV粒子の結合は、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも

約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 1 0 0 % (野生型キャプシドを含む r A A V 粒子の結合と比較して) 低減する。いくつかの実施形態において、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換により、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに対する r A A V 粒子の結合は、約 1 0 % ~ 約 1 0 0 %、約 2 0 % ~ 約 1 0 0 %、約 3 0 % ~ 約 1 0 0 %、約 4 0 % ~ 約 1 0 0 %、約 5 0 % ~ 約 1 0 0 %、約 6 0 % ~ 約 1 0 0 %、約 7 0 % ~ 約 1 0 0 %、約 8 0 % ~ 約 1 0 0 %、約 9 0 % ~ 約 1 0 0 %、約 1 0 % ~ 約 9 0 %、約 2 0 % ~ 約 9 0 %、約 3 0 % ~ 約 9 0 %、約 4 0 % ~ 約 9 0 %、約 5 0 % ~ 約 9 0 %、約 6 0 % ~ 約 9 0 %、約 7 0 % ~ 約 9 0 %、約 8 0 % ~ 約 9 0 %、約 1 0 % ~ 約 8 0 %、約 2 0 % ~ 約 8 0 %、約 3 0 % ~ 約 8 0 %、約 4 0 % ~ 約 8 0 %、約 5 0 % ~ 約 8 0 %、約 6 0 % ~ 約 8 0 %、約 7 0 % ~ 約 8 0 %、約 1 0 % ~ 約 7 0 %、約 2 0 % ~ 約 7 0 %、約 3 0 % ~ 約 7 0 %、約 4 0 % ~ 約 7 0 %、約 5 0 % ~ 約 7 0 %、約 6 0 % ~ 約 7 0 %、約 1 0 % ~ 約 6 0 %、約 2 0 % ~ 約 6 0 %、約 3 0 % ~ 約 6 0 %、約 4 0 % ~ 約 6 0 %、約 5 0 % ~ 約 6 0 %、約 1 0 % ~ 約 5 0 %、約 2 0 % ~ 約 5 0 %、約 3 0 % ~ 約 5 0 %、約 4 0 % ~ 約 5 0 %、約 1 0 % ~ 約 4 0 %、約 2 0 % ~ 約 4 0 %、約 3 0 % ~ 紦 4 0 %、約 1 0 % ~ 紺 3 0 %、約 2 0 % ~ 紺 3 0 %、または約 1 0 % ~ 紺 2 0 % のうちの任意の割合だけ (野生型キャプシドを含む r A A V 粒子の結合と比較して) 低減する。いくつかの実施形態において、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換によって、野生型 r A A V 粒子の結合と比較して、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに対する r A A V 粒子の検出可能な結合が起こらない。H S P G に対する A A V 粒子の結合、例えば、ヘパラン硫酸クロマトグラフィー培地に対する結合、またはその表面上に H S P G を発現することが知られている細胞に対する結合を測定する手段は、当技術分野で公知である。例えば、Opie, S R et al., (2003) J. Virol. 77: 6995 ~ 7006 頁および Kern, A et al., (2003) J. Virol. 77: 11072 ~ 11081 頁を参照されたい。  
10  
20

## 【0245】

いくつかの実施形態において、r A A V 粒子は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに対する r A A V 粒子の結合を低減または消失させるキャプシドタンパク質の1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、および / または1つまたはそれ以上のアミノ酸置換は、A A V 2 の V P 1 ナンバリングに基づくナンバリングのアミノ酸 4 8 4、4 8 7、5 3 2、5 8 5、または 5 8 8 位に存在する。本明細書において使用される「A A V 2 の V P 1 に基づくナンバリング」とは、A A V 2 の V P 1 の列挙されたアミノ酸に対応する列挙されたキャプシドタンパク質のアミノ酸を指す。例えば、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換が、A A V 2 の V P 1 に基づくナンバリングの 3 4 7、3 5 0、3 9 0、3 9 5、4 4 8、4 5 1、4 8 4、4 8 7、5 2 7、5 3 2、5 8 5、および / または 5 8 8 位に存在する場合、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換は、A A V 2 の V P 1 のアミノ酸 3 4 7、3 5 0、3 9 0、3 9 5、4 4 8、4 5 1、4 8 4、4 8 7、5 2 7、5 3 2、5 8 5、および / または 5 8 8 に対応する列挙されたキャプシドタンパク質のアミノ酸におけるものである。いくつかの実施形態において、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換は、A A V 2 の V P 1 の 4 8 4、4 8 7、5 3 2、5 8 5、または 5 8 8 位に存在する。いくつかの実施形態において、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換は、A A V 2 の V P 1 に基づくナンバリングの、A A V 3 の V P 1 の 4 8 4、4 8 7、5 3 2、5 8 5、または 5 8 8 位に存在する。いくつかの実施形態において、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換は、A A V r h 8 R の V P 1 ナンバリングに基づくナンバリングの 4 8 5、4 8 8、5 2 8、5 3 3、5 8 6、または 5 8 9 位に存在する。いくつかの実施形態において、アミノ酸 5 8 5 および / または 5 8 8 (A A V 2 の V P 1 に基づくナンバリング) に対応する位置の1つまたはそれ以上のアミノ酸は、アルギニン残基で置換されている (例えば、A A V 1 または A A V 6 に関して S 5 8 6 および / または T 5 8 9 ; A A V 9 に関して S 5 8 6 および / または A 5 8 9 ; A A V r h 8 R に関して A 5 8 6 および / または T 5 8 9 ; A A V 8 に関して Q 5 8 8 および / または T 5 9 1 ; ならびに A A V r h 1 0 に関して Q 5 8 8 および / または T 5 9 2 )。  
30  
40  
50

たは A 5 9 1 )。他の実施形態において、アミノ酸 4 8 4 、 4 8 7 、 5 2 7 、および / または 5 3 2 ( A A V 2 の V P 1 に基づくナンバリング ) に対応する位置の 1 つまたはそれ以上のアミノ酸 ( 例えば、アルギニンまたはリシン ) は、アラニンのような非陽性荷電アミノ酸で置換されている ( 例えば、 A A V 1 または A A V 6 に関して R 4 8 5 、 R 4 8 8 、 K 5 2 8 、および / または K 5 3 3 ; A A V 9 または A A V r h 8 R に関して R 4 8 5 、 R 4 8 8 、 K 5 2 8 、および / または R 5 3 3 ; ならびに A A V 8 または A A V r h 1 0 に関して R 4 8 7 、 R 4 9 0 、 K 5 3 0 、および / または R 5 3 5 ) 。

#### 【 0 2 4 6 】

他のウイルス粒子

いくつかの実施形態において、ベクターは組換えアデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子はアデノウイルス粒子である。いくつかの実施形態において、アデノウイルス粒子は組換えアデノウイルス粒子、例えば本開示の 1 つまたは 2 つのガイド R N A および / または 2 つの I T R の間に本開示の C a s タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドベクターである。いくつかの実施形態において、アデノウイルス粒子は、アデノウイルスを複製欠損にする 1 つまたはそれ以上の E 1 遺伝子を欠如するか、または欠損コピーを含む。アデノウイルスは、大きい ( 約 9 5 0 ) 非エンベロープの正二十面体キャップシド内に直線状の二本鎖 D N A ゲノムを含む。アデノウイルスは、 3 0 k b 超の異種配列を組み込むことができる大きいゲノムを有し ( 例えば、 E 1 および / または E 3 領域の代わりに ) 、それによって、それらはより大きい異種遺伝子と共に使用するために独自に適している。それらはまた、分裂中および非分裂細胞に感染することが知られており、宿主ゲノムに本来組み込まれない ( ハイブリッド変異体はこの能力を保有しうる ) 。いくつかの実施形態において、アデノウイルスベクターは、 E 1 の代わりに異種配列を有する第一世代アデノウイルスベクターでありうる。いくつかの実施形態において、アデノウイルスベクターは、 E 2 A 、 E 2 B 、および / または E 4 に追加の突然変異または欠失を有する第二世代アデノウイルスベクターでありうる。いくつかの実施形態において、アデノウイルスベクターは、全てのウイルスコード遺伝子を欠如するが、 I T R およびパッケージングシグナルのみを保持し、複製およびパッケージングのためにヘルパーアデノウイルスをトランスで必要とする第三世代または g u t t e d アデノウイルスベクターでありうる。アデノウイルス粒子は、哺乳動物細胞の一過性のトランスフェクションのためのベクターとしてならびに遺伝子治療ベクターとしての使用が研究されている。詳しい説明に関しては、 D a n t h i n n e , X . a n d I m p e r i a l e , M . J . ( 2 0 0 0 ) G e n e T h e r . 7 : 1 7 0 7 ~ 1 4 頁および T a t s i s , N . a n d E r t l , H . C . ( 2 0 0 4 ) M o l . T h e r . 1 0 : 6 1 6 ~ 2 9 頁を参照されたい。

#### 【 0 2 4 7 】

いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は、本開示の 1 つまたは 2 つのガイド R N A および / または本開示の C a s タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えアデノウイルス粒子である。任意のアデノウイルス血清型の使用が、本発明の範囲内で検討される。いくつかの実施形態において、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型 2 、 1 、 5 、 6 、 1 9 、 3 、 1 1 、 7 、 1 4 、 1 6 、 2 1 、 1 2 、 1 8 、 3 1 、 8 、 9 、 1 0 、 1 3 、 1 5 、 1 7 、 1 9 、 2 0 、 2 2 、 2 3 、 2 4 ~ 3 0 、 3 7 、 4 0 、 4 1 、 A d H u 2 、 A d H u 3 、 A d H u 4 、 A d H u 2 4 、 A d H u 2 6 、 A d H u 3 4 、 A d H u 3 5 、 A d H u 3 6 、 A d H u 3 7 、 A d H u 4 1 、 A d H u 4 8 、 A d H u 4 9 、 A d H u 5 0 、 A d C 6 、 A d C 7 、 A d C 6 9 、 ウシ A d 3 型、イヌ A d 2 型、ヒツジ A d 、またはブタ A d 3 型を含むがこれらに限定されるわけではない、アデノウイルス血清型に由来するベクターである。いくつかの実施形態において、組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルス血清型 2 またはアデノウイルス血清型 5 の変異体に由来する。

#### 【 0 2 4 8 】

いくつかの実施形態において、ベクターは、ウイルス粒子にキャップシド封入されている

10

20

30

40

50

。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は、組換えアデノウイルスベクターをキャプシド封入する組換えアデノウイルス粒子である。いくつかの実施形態において、組換えウイルス粒子は、1つまたはそれ以上の外来のウイルスキャプシドタンパク質と組み合わせてアデノウイルス粒子を含む。そのような組み合わせを、偽型化された組換えアデノウイルス粒子と呼ぶ。いくつかの実施形態において、偽型化された組換えアデノウイルス粒子において使用される外来のウイルスキャプシドタンパク質は、外来のウイルスまたはもう一つのアデノウイルスの血清型に由来する。いくつかの実施形態において、外来のウイルスキャプシドタンパク質は、レオウイルス3型を含むがこれらに限定されるわけではないウイルスに由来する。偽型化されたアデノウイルス粒子において使用されるベクターとキャプシドタンパク質の組み合わせの例は、以下の参考文献に見出すことができる (Tatsis, N. et al. (2004) Mol. Ther. 10 (4) : 616 ~ 629 頁、および Ahi, Y. et al. (2011) Curr. Gene Ther. 11 (4) : 307 ~ 320 頁)。異なるHSV血清型を使用して、特定の標的細胞の形質導入を最適化する、または特定の標的組織(例えば、疾患組織)内の特異的細胞型を標的とすることができます。特異的アデノウイルス血清型が標的とする組織または細胞には、肺(例えば、HuAd3)、脾臓および肝臓(例えば、HuAd37)、平滑筋、滑膜細胞、樹状細胞、心血管細胞、腫瘍細胞株(例えば、HuAd11)、および樹状細胞(例えば、レオウイルス3型によって偽型化されたHuAd5、HuAd30、またはHuAd35)が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。詳しい説明に関しては、Ahi、Y. et al. (2011) Curr. Gene Ther. 11 (4) : 307 ~ 320 頁、Kay, M. et al. (2001) Nat. Med. 7 (1) : 33 ~ 40 頁、および Tatsis, N. et al. (2004) Mol. Ther. 10 (4) : 616 ~ 629 頁を参照されたい。いくつかの実施形態において、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd、またはブタAd3型を含むがこれらに限定されるわけではない、アデノウイルス血清型からのキャプシドを含みうる。いくつかの実施形態において、組換えアデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2キャプシドまたはアデノウイルス血清型5キャプシドの変異体を含む。

#### 【0249】

いくつかの実施形態において、ベクターは、組換えレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子はレンチウイルス粒子である。いくつかの実施形態において、レンチウイルス粒子は、組換えレンチウイルス粒子、例えば2つのLTRの間に本開示の1つまたは2つのガイドRNAおよび/または本開示のCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドベクターである。レンチウイルスは、およそ10kbのゲノムを有するプラスセンスのssRNAレトロウイルスである。レンチウイルスは、分裂中および非分裂細胞のゲノムに組み込まれることが知られている。レンチウイルス粒子は、例えば、多数のプラスミド(典型的に、レンチウイルスゲノムと、複製および/またはパッケージングのために必要な遺伝子とは、ウイルス複製を防止するために分離される)を、改変されたレンチウイルスゲノムをレンチウイルス粒子にパッケージングするパッケージング細胞株にトランスフェクトすることによって产生することができる。いくつかの実施形態において、レンチウイルス粒子は、エンベロープタンパク質を欠如する第一世代ベクターを指しうる。いくつかの実施形態において、レンチウイルス粒子は、gag/polおよびtat/rev領域を除く全ての遺伝子を欠如する第二世代ベクターを指しうる。いくつかの実施形態において、レンチウイルス粒子は、内因性のrev、gag、およびpol遺伝子のみを含み、tat遺伝子を有しない形質導入のためのキメラLTRを有する第三世代ベクターを指しうる(Duill, T. et al 50

. (1998) *J. Virol.* 72: 8463~71頁を参照されたい)。詳しい説明に関しては、Durand, S. and Cimarelli, A. (2011) *Viruses* 3: 132~59頁を参照されたい。

【0250】

いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は、本開示の1つまたは2つのガイドRNAおよび/または本開示のCasタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む組換えレンチウイルス粒子である。任意のレンチウイルスベクターの使用が、本発明の範囲内において検討される。いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)、ヒト免疫不全ウイルス-2(HIV-2)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、ウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)、ウシ免疫不全ウイルス(BIV)、ジェンブラナ病ウイルス(JDV)、ビスナウイルス(VV)、およびヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)を含むがこれらに限定されるわけではないレンチウイルスに由来する。

【0251】

いくつかの実施形態において、ベクターは、ウイルス粒子にキャプシド封入される。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は、組換えレンチウイルスベクターをキャプシド封入する組換えレンチウイルス粒子である。いくつかの実施形態において、組換えウイルス粒子は、1つまたはそれ以上の外来のウイルスキャプシドタンパク質と組み合わせてレンチウイルスベクターを含む。そのような組み合わせを、偽型化された組換えレンチウイルス粒子と呼ぶ。いくつかの実施形態において、偽型化された組換えレンチウイルス粒子に使用される外来ウイルスキャプシドタンパク質は、外来ウイルスに由来する。いくつかの実施形態において、偽型化された組換えレンチウイルス粒子に使用される外来ウイルスキャプシドタンパク質は、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質(VSV-GP)である。VSV-GPは、遍在する細胞受容体と相互作用して、偽型化された組換えレンチウイルス粒子に対して広い組織向性を提供する。加えて、VSV-GPは、偽型化された組換えレンチウイルス粒子に対してより高い安定性を提供すると考えられる。他の実施形態において、外来のウイルスキャプシドタンパク質は、チャンディプラウイルス、狂犬病ウイルス、モコラウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス(SFV)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、エボラウイルスレストン株、エボラウイルスザイール株、マールブルグウイルス、ラッサウイルス、トリ白血病ウイルス(ALV)、ヤーグジークテヒツジレトロウイルス(JSRV)、モロニーマウス白血病ウイルス(MLV)、テナガザル白血病ウイルス(GALV)、ネコ内在性レトロウイルス(RD114)、ヒトT-リンパ好性ウイルス(HTLV-1)、ヒトフォーミーウイルス、マエディ・ビスナウイルス(MVV)、SARS-CoV、センダイウイルス、RSウイルス(RSV)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型、C型肝炎ウイルス(HCV)、インフルエンザウイルス、トリペストウイルス(FPV)、またはカイコ核多角体病ウイルス(ACMNPV)を含むがこれらに限定されるわけではないウイルスに由来する。

【0252】

いくつかの実施形態において、組換えレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114、またはその変異体によって偽型化されたレンチウイルスに由来する。偽型化されたレンチウイルス粒子において使用されるベクターとキャプシドタンパク質の組み合わせの例は、例えば、Cronin, J. et al. (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4): 387-398に見出すことができる。異なる偽型化された組換えレンチウイルス粒子を使用して、特定の標的細胞の形質導入を最適化する、または特定の標的組織(例えば、疾患組織)内の特異的細胞型を標的とすることができる。例えば、特異的偽型化された組換えレンチウイルス粒子が標的とする組織には、肝臓(例えば、VSV-G、LCMV、RRV、またはSeV-Fタンパク質によって偽型化される)、肺(

10

20

30

40

50

例えば、エボラ、マールブルグ、S e V F および H N、または J S R V タンパク質によって偽型化される）、脇島細胞（例えば、L C M V タンパク質によって偽型化される）、中枢神経系（例えば、V S V - G、L C M V、狂犬病、またはモカラタンパク質によって偽型化される）、網膜（例えば、V S V - G またはモカラタンパク質によって偽型化される）、単球または筋肉（例えば、モカラまたはエボラタンパク質によって偽型化される）、造血系（例えば、R D 1 1 4 または G A L V タンパク質によって偽型化される）、またはがん細胞（例えば、G A L V または L C M V タンパク質によって偽型化される）が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。詳しい説明に関しては、C r o n i n , J . e t a l . ( 2 0 0 5 ) . C u r r . G e n e T h e r . 5 ( 4 ) : 3 8 7 ~ 3 9 8 頁およびK a y , M . e t a l . ( 2 0 0 1 ) N a t . M e d . 7 ( 1 ) : 3 3 ~ 4 0 頁を参照されたい。いくつかの実施形態において、組換えレンチウイルス粒子は、水疱性口内炎ウイルス（V S V）、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス（L C M V）、ロスリバーウィルス（R R V）、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス、狂犬病ウイルス、R D 1 1 4、またはその変異体によって偽型化されたキャプシドを含む。

#### 【 0 2 5 3 】

いくつかの実施形態において、ベクターは、r H S V ベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は単純ヘルペスウイルス（H S V）粒子である。いくつかの実施形態において、H S V 粒子は、r H S V 粒子、例えば、2つのT R の間に本開示の1つまたは2つのガイドR N A および / または本開示のC a s タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドベクターである。H S V は、およそ1 5 2 k b のゲノムを有するエンベロープを有する二本鎖D N A ウイルスである。有利なことには、その遺伝子のおよそ半数が非必須であり、異種配列に適合させるために欠失させてもよい。H S V 粒子は非分裂細胞に感染する。加えて、それらは、本来ニューロンに潜伏して定着し、逆行性輸送によって移動し、シナプスを越えて運ばれることから、神経系を巻き込むニューロンのトランスフェクションおよび / または遺伝子治療アプローチにとって有用となる。いくつかの実施形態において、H S V 粒子は、複製欠損または複製コンピテント（例えば、1つまたはそれ以上の後期遺伝子の不活性化を通して单一の複製サイクルに関してコンピテント）でありうる。詳しい説明に関しては、M a n s e r v i g i , R . e t a l . ( 2 0 1 0 ) O p e n V i r o l . J . 4 : 1 2 3 ~ 5 6 頁を参照されたい。

#### 【 0 2 5 4 】

いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は、本開示の1つまたは2つのガイドR N A および / または本開示のC a s タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むr H S V 粒子である。任意のH S V ベクターの使用が、本発明の範囲内において考慮される。いくつかの実施形態において、H S V ベクターは、H S V - 1 およびH S V - 2 を含むがこれらに限定されるわけではないH S V 血清型に由来する。

#### 【 0 2 5 5 】

いくつかの実施形態において、ベクターはウイルス粒子にキャプシド封入される。いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は、組換えH S V ベクターをキャプシド封入する組換えH S V 粒子である。いくつかの実施形態において、組換えウイルス粒子は、1つまたはそれ以上の外来のウイルスキャプシドタンパク質と組み合わせたH S V ベクターを含む。そのような組み合わせを、偽型化されたr H S V 粒子と呼ぶ。いくつかの実施形態において、偽型化されたr H S V 粒子に使用される外来ウイルスキャプシドタンパク質は、外来ウイルスまたはもう一つのH S V 血清型に由来する。いくつかの実施形態において、偽型化されたr H S V 血清型に使用される外来ウイルスキャプシドタンパク質は、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質（V S V - G P ）である。V S V - G P は、遍在する細胞受容体と相互作用し、偽型化されたr H S V 粒子に対して広い組織向性を提供する。いくつかの実施形態において、V S V - G P は、偽型化されたr H S V 粒子に対してより高い安定性を提供すると考えられる。他の実施形態において、外来ウイルスキャプシドタンパク質は、異なるH S V 血清型に由来しうる。例えば、H S V - 1 ベクターは、1つまたはそれ以上のH S V - 2 キャプシドタンパク質を含みうる。異なるH S V 血清型を使用して、

10

20

30

40

50

特定の標的細胞の形質導入を最適化する、または特定の標的組織（例えば、疾患組織）内の特異的細胞型を標的とすることができる。特異的アデノウイルス血清型が標的とする組織または細胞には、中枢神経系およびニューロン（例えば、HSV-1）が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。詳しい説明に関しては、Manservig i, R. et al. (2010) *Open Virol J* 4: 123~156頁, Kay, M. et al. (2001) *Nat. Med.* 7(1): 33~40頁、およびMeignier, B. et al. (1987) *J. Infect. Dis.* 155(5): 921~930頁を参照されたい。いくつかの実施形態において、組換えHSV粒子は、rHSV-1粒子、またはrHSV-2ウイルス粒子である。

## 【0256】

10

## ウイルス粒子の產生

アデノウイルスベクター粒子の產生に関して、多数の方法が当技術分野で公知である。例えば、guttedアデノウイルスベクターに関して、アデノウイルスベクターゲノムおよびヘルパーアデノウイルスゲノムを、パッケージング細胞株（例えば、293細胞株）にトランスフェクトしてもよい。いくつかの実施形態において、ヘルパーアデノウイルスゲノムは、そのパッケージングシグナルの両端に位置する組換え部位を含み、両方のゲノムを、目的のアデノウイルスベクターがヘルパーアデノウイルスより効率的にパッケージングされるように、リコンビナーゼ（例えば、Cre/loxPシステムを使用してもよい）を発現するパッケージング細胞株にトランスフェクトしてもよい（例えば、Alb a, R. et al. (2005) *Gene Ther.* 12 Suppl 1: S18~27頁を参照されたい）。アデノウイルスベクターは、本明細書において記述される方法のような標準的な方法を使用して回収および精製してもよい。

20

## 【0257】

レンチウイルスベクター粒子の產生に関して、多数の方法が当技術分野で公知である。例えば、第3世代のレンチウイルスベクターに関して、gagおよびpol遺伝子を有する目的のレンチウイルスゲノムを含むベクターを、rev遺伝子を含むベクターと共に、パッケージング細胞株（例えば、293細胞株）に同時トランスフェクトしてもよい。目的のレンチウイルスゲノムはまた、Tatの非存在下で転写を促進するキメラLTRも含む（Dull, T. et al. (1998) *J. Virol.* 72: 8463~71頁を参照されたい）。レンチウイルスベクターは、本明細書において記述される方法（例えば、Segura MM, et al., (2013) *Expert Opin Biol Ther.* 13(7): 987~1011頁）を使用して回収および使用してもよい。

30

## 【0258】

HSV粒子の產生に関して、多数の方法が当技術分野で公知である。HSVベクターは、本明細書において記述される方法のような標準的な方法を使用して回収および精製してもよい。例えば、複製欠損HSVベクターに関して、最初期（IE）遺伝子の全てを欠如する目的のHSVゲノムを、ICP4、ICP27、およびICP0のような、ウイルス產生に必要な遺伝子を提供する相補的細胞株にトランスフェクトしてもよい（例えば、Samaniego, L. A. et al. (1998) *J. Virol.* 72: 3307~20頁を参照されたい）。HSVベクターは、記述の方法を使用して回収および精製してもよい（例えば、Goins, WF et al., (2014) *Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology* 1144: 63~79頁）。

40

## 【0259】

rAAVベクターの產生に関して、トランスフェクション、安定な細胞株產生、およびアデノウイルス-AAVハイブリッド、ヘルペスウイルス-AAVハイブリッド（Conway, JE et al., (1997) *J. Virology* 71(11): 8780~8789頁）およびバキュロウイルス-AAVハイブリッドを含む感染性ハイブリッドウイルス產生系を含む多数の方法が当技術分野で公知である。rAAVウイルス粒

50

子を產生するための r A A V 產生培養は全て、 1 ) 適した宿主細胞、 2 ) 適したヘルパー ウィルス機能、 3 ) A A V r e p および c a p 遺伝子および遺伝子産物、 4 ) 少なくとも 1 つの A A V I T R 配列 ( 例えは、 サイズ超過の r A A V ベクターゲノム ) が両端に位置する核酸 ( 例えは、 治療核酸 ) 、 および 5 ) r A A V 產生を支持するために適した培地および培地成分、 を必要とする。いくつかの実施形態において、 適した宿主細胞は 犬類の宿主細胞である。いくつかの実施形態において、 適した宿主細胞は、 H e L a 、 A 5 4 9 、 2 9 3 、 または P e r c . 6 細胞のようなヒト由来の細胞株である。いくつかの実施形態において、 適したヘルパー ウィルス機能は、 野生型または突然変異体アデノウイルス ( 温度感受性アデノウイルスのような ) 、 ヘルペスウイルス ( H S V ) 、 バキュロウイルス、 またはヘルパー機能を提供するプラスミド構築物によって提供される。いくつかの実施形態において、 A A V r e p および c a p 遺伝子産物は、 任意の A A V 血清型に由来しうる。一般的に、 しかし必須ではないが、 A A V r e p 遺伝子産物は、 r e p 遺伝子産物が r A A V ゲノムを複製およびパッケージングするように機能しうる限り、 r A A V ベクターゲノムの I T R と同じ血清型の遺伝子産物である。当技術分野で公知の適した培地を、 r A A V ベクターの產生のために使用してもよい。これらの培地には、 改変イーグル培地 ( M E M ) 、 ダルベッコ改変イーグル培地 ( D M E M ) を含む、 H y c l o n e L a b o r a t o r i e s および J R H が製造する培地、 米国特許第 6 , 5 6 6 , 1 1 8 号に記述される配合のようなカスタム配合、 および米国特許第 6 , 7 2 3 , 5 5 1 号に記述される S f - 9 0 0 I I S F M 培地が挙げられるがこれらに限定されるわけではなく、 これらの特許文献は、 特に組換え A A V ベクターの產生に使用するためのカスタム培地配合に関して、 そのそれぞれの全体が参照により本明細書に組み入れられる。いくつかの実施形態において、 A A V ヘルパー機能は、 アデノウイルスまたは H S V によって提供される。いくつかの実施形態において、 A A V ヘルパー機能は、 バキュロウイルスによって提供され、 宿主細胞は昆虫細胞 ( 例えは、 ツマジロクサヨトウ ( Spodoptera frugiperda ) ( S f 9 ) 細胞 ) である。 A A V の複製に関するアデノウイルスヘルパー機能の例には、 E 1 A 機能、 E 1 B 機能、 E 2 A 機能、 V A 機能、 および E 4 o r f 6 機能が挙げられる。 寄託所から入手可能なバキュロウイルスには、 カイコ核多角体病ウイルスが挙げられる。

#### 【 0 2 6 0 】

r A A V 粒子は、 当技術分野で公知の方法を使用して產生することができる。 例えは、 米国特許第 6 , 5 6 6 , 1 1 8 号； 第 6 , 9 8 9 , 2 6 4 号； および第 6 , 9 9 5 , 0 0 6 号を参照されたい。 本発明の実践において、 r A A V 粒子を產生するための宿主細胞には、 哺乳動物細胞、 昆虫細胞、 植物細胞、 微生物および酵母が挙げられる。宿主細胞はまた、 A A V r e p および c a p 遺伝子が宿主細胞において安定に維持されるパッケージング細胞、 または A A V ベクターゲノムが安定に維持される產生細胞でありうる。 例示的なパッケージングおよび產生細胞は、 2 9 3 、 A 5 4 9 、 または H e L a 細胞に由来する。 A A V ベクターは、 当技術分野で公知の標準的な技術を使用して精製および製剤化される。

#### 【 0 2 6 1 】

いくつかの実施形態において、 r A A V 粒子は、 以下に提供される例示的なトリプルトランスフェクション法のようなトリプルトランスフェクション法によって產生することができる。 簡単に説明すると、 r e p 遺伝子およびキャプシド遺伝子を含むプラスミドをヘルパーアデノウイルスプラスミドと共に、 細胞株 ( 例えは、 H E K 2 9 3 細胞 ) にトランスフェクトして ( 例えは、 リン酸カルシウム法を使用して ) 、 ウィルスを収集して、 場合により精製してもよい。

#### 【 0 2 6 2 】

いくつかの実施形態において、 r A A V 粒子は、 產生細胞株法によって產生してもよい ( 例えは、 M a r t i n e t a l . , ( 2 0 1 3 ) H u m a n G e n e T h e r a p y M e t h o d s 2 4 : 2 5 3 ~ 2 6 9 頁を参照されたい ) 。 簡単に説明すると、 細胞株 ( 例えは、 H e L a 細胞株 ) に、 r e p 遺伝子、 キャプシド遺伝子、 およびプロ

モーター - トランスジーン配列を含むプラスミドを安定にトランスフェクトしてもよい。細胞株をスクリーニングして、r A A V 產生のためのリードクローンを選択して、次に、これを產生バイオリアクターにおいて増殖させて、r A A V 產生を開始するためのヘルパーとしてのアデノウイルス（例えば、野生型アデノウイルス）を感染させてもよい。次に、ウイルスを回収して、アデノウイルスを不活化（例えば、熱によって）および／または除去し、r A A V 粒子を精製してもよい。いくつかの実施形態において、產生細胞株は、HeLa、293、A549、またはPeric.6細胞に由来する。いくつかの実施形態において、產生細胞株は、浮遊培養での増殖に適合させる。いくつかの実施形態において、A A V ヘルパー機能は、アデノウイルス、HSV、またはバキュロウイルスによって提供される。

10

### 【0263】

いくつかの実施形態において、r A A V 粒子は、ヘルパー機能の提供後約48時間～約96時間の間に回収される。例えば、いくつかの実施形態において、r A A V 粒子は、ヘルパー機能の提供の約48時間後、約60時間後、約72時間後、約84時間後、または約96時間後に回収される。いくつかの実施形態において、r A A V 粒子は、ヘルパー機能の提供の、約48時間および約96時間後、約48時間および約84時間後、約48時間および約72時間後、約48時間および約60時間後、約60時間および約96時間後、約60時間および約84時間後、約60時間および約72時間後、約72時間および約84時間後、または約84時間および約96時間後に回収される。

20

### 【0264】

本発明の適したr A A V 產生培養培地に、0.5%～20%（v/vまたはw/v）のレベルで血清または血清由来組換えタンパク質を補充してもよい。あるいは、当技術分野で公知であるように、r A A V ベクターを、動物由来産物を有しない培地とも呼ばれる無血清条件で產生してもよい。当業者は、產生培養物におけるr A A V の力価を増加させるために、r A A V ベクターの產生を支持するように設計された市販のまたはカスタム培地に、グルコース、ビタミン、アミノ酸、および／または増殖因子を含むがこれらに限定されるわけではない、当技術分野で公知の1つまたはそれ以上の細胞培養構成要素を補充してもよいことを認識し得る。

30

### 【0265】

r A A V 產生培養物は、利用される特定の宿主細胞にとって適した多様な条件（広い温度範囲、多様な期間等）で増殖させることができる。当技術分野で公知であるように、r A A V 產生培養物は、例えばローラーボトル、中空纖維フィルター、マイクロキャリア、および充填床または流動床バイオリアクターのような適した付着依存的容器中で培養することができる、付着依存的培養物を含む。r A A V ベクター產生培養物はまた、例えばスピナーフラスコ、攪拌タンクバイオリアクター、およびWaveバッグシステムのような使い捨てシステムを含む多様な方法で培養することができるHeLa、293、およびSF-9細胞のような浮遊培養に適合させた宿主細胞を含みうる。

### 【0266】

本発明のr A A V ベクター粒子は、米国特許第6,566,118号により詳しく記述されているように、インタクト細胞からの培地にr A A V 粒子を放出させるために細胞を当技術分野で公知の条件で培養することを条件として、產生培養物の宿主細胞の溶解によって、または產生培養物から消費された培地を回収することによってr A A V 產生培養物から回収することができる。細胞の適した溶解方法もまた当技術分野で公知であり、例えば多数の凍結／融解サイクル、超音波処理、マイクロフルイダイゼーション、ならびに洗浄剤および／またはプロテアーゼのような化学物質による処理が挙げられる。

40

### 【0267】

さらなる実施形態において、ウイルス粒子は精製される。本明細書において使用される用語「精製」は、ウイルス粒子が本来存在するまたは当初そこから調製される場所に同様に存在しうる他の構成要素の少なくとも一部を含まないウイルス粒子の調製を含む。この

50

ため、例えば、単離ウイルス粒子は、培養物ライセートまたは產生培養物上清のような起源混合物からそれを濃縮するための精製技術を使用して調製することができる。濃縮は、例えば溶液中に存在するDNアーゼ抵抗性粒子(DRP)もしくはゲノムコピー(gc)の割合、もしくは感染度のような多様な方法で測定することができ、またはヘルパーウィルス、培地構成要素等を含む產生培養混入物質または処理中の混入物質を含む混入物質のような、起源混合物に存在する第2の場合によっては干渉性の物質に関連して測定することができる。

#### 【0268】

いくつかの実施形態において、ウイルス產生培養回収物は、宿主細胞破片を除去するために清澄化される。いくつかの実施形態において、產生培養回収物は、例えばグレードD OHC Millipore Millistak+HC Podフィルター、グレードA1HC Millipore Millistak+HC Podフィルター、および0.2μmフィルターOpticap XL10 Millipore Express SHC親水性メンブレンフィルターを含む一連の深さのフィルターを通した濾過によって清澄化される。清澄化はまた、遠心分離または当技術分野で公知の孔サイズ0.2μmもしくはそれ以上の任意の酢酸セルロースフィルターを通しての濾過のような、当技術分野で公知の多様な他の標準的な技術によって得ることができる。

#### 【0269】

いくつかの実施形態において、ウイルス產生培養回収物を、產生培養物に存在する任意の高分子量DNAを消化するためにBenzonase(登録商標)によってさらに処理する。いくつかの実施形態において、Benzonase(登録商標)の消化は、例えば最終濃度1~2.5単位/mlのBenzonase(登録商標)を、周囲温度から37の範囲の温度で30分間から数時間の期間を含む、当技術分野で公知の標準的な条件下で実施される。

#### 【0270】

rAAV粒子は、1つまたはそれ以上の以下の精製工程を使用して単離または精製することができる：平衡遠心分離；フロースルー陰イオン交換濾過；rAAV粒子を濃縮するための接線流濾過(TFF)；アバタイトクロマトグラフィーによるrAAVの捕捉；ヘルパーウィルスの熱不活化；疎水性相互作用クロマトグラフィーによるrAAVの捕捉；サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)による緩衝液交換；ナノフィルトレーション；および陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、またはアフィニティクロマトグラフィーによるrAAV捕捉。これらの工程は、単独で、様々な組み合わせで、または異なる順序で使用してもよい。rAAV粒子を精製する方法は、例えばXiao et al. (1998) Journal of Virology 72: 2224~2232頁；米国特許第6,989,264号および第8,137,948号；ならびに国際公開第2010/148143号に見出される。アデノウイルス粒子を精製する方法は、例えばBo, H et al. (2014) Eur. J. Pharm. Sci. 67C: 119~125頁に見出される。レンチウイルス粒子を精製する方法は、例えばSegura MM, et al. (2013) Expert Opin Biol Ther. 13(7): 987~1011頁に見出される。HSV粒子を精製する方法は、例えばGoins, WF et al. (2014) Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology 1144: 63~79頁に見出される。

#### 【0271】

いくつかの実施形態において、ウイルス粒子は医薬製剤中にある。いくつかの実施形態において、医薬製剤は、薬学的に許容される担体を含む。そのような担体は当技術分野で周知である(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, 1035~1038頁および1570~1580頁を参照されたい)。いくつかの実施形態において、本明細書において記述されるウイルス粒子と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物は、眼の注射に適している。その

10

20

30

40

50

ような薬学的に許容される担体は、滅菌液体、例えば水、および石油、動物、植物、または合成起源の油を含めた油、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油等でありうる。食塩水溶液およびデキストロース水溶液、ポリエチレンギリコール(PEG)およびグリセロール溶液もまた、特に注射用溶液のための液体担体として使用することができる。医薬組成物はさらに、追加の成分、例えば保存剤、緩衝剤、等張剤、抗酸化剤および安定剤、非イオン性湿潤剤または清澄剤、増粘剤等を含みうる。本明細書において記述される医薬組成物は、単回単位用量または複数回単位用量に包装することができる。組成物は一般的に、無菌的で実質的に等張の溶液として製剤化される。

【0272】

V I . 治療方法

10

本開示のある特定の態様は、例えば上記のような、本開示の遺伝子操作された、天然に存在しないCRISPR-Casシステムをコードする核酸を含む組成物の治療有効量を個体に投与することを含む。

【0273】

いくつかの実施形態において、本開示の態様は、本開示のCasタンパク質と、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAを含む1つまたはそれ以上の核酸とを含む組成物の治療有効量を個体に投与することを含み、第1のガイドRNAおよび第2のガイドRNAは、例えば上記の深部イントロン突然変異を含む突然変異の両端に位置する標的DNA配列の逆鎖にハイブリダイズする。すなわち、本開示の方法、組成物、およびキットのいずれに関しても、Casタンパク質は、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列として、またはポリペプチドとして供給することができる。非制限的な例として、Casタンパク質は、カチオン性脂質媒介送達(例えば、Zuris, J. A. et al. Nat Biotechnol. 33: 73~80頁を参照されたい)を使用して、1つまたはそれ以上のガイドRNA(例えば、sgRNA)と共に投与することができる。いくつかの実施形態において、Casタンパク質を、例えばCRISPR-Casエフェクター複合体として1つまたはそれ以上のガイドRNAとの複合体として投与してもよい。以下に記述される送達および/または投与方法のいずれも、1つまたはそれ以上のガイドRNAと共に投与されるCasタンパク質の送達のために使用してもよいと認識される。いくつかの実施形態において、Casタンパク質は、上記の自己限定性発現力セットから発現される。

20

【0274】

いくつかの実施形態において、本開示の遺伝子操作された、天然に存在しないCRISPR-Casシステムをコードする核酸を含む組成物(または本開示のCasタンパク質と本開示の1つまたはそれ以上のガイドRNAとを含む組成物)は、静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、植え込み、吸入、髄腔内、脳室内、または鼻腔内投与される。

30

【0275】

いくつかの実施形態において、本開示の遺伝子操作された、天然に存在しないCRISPR-Casシステムをコードする核酸を含む組成物(または本開示のCasタンパク質と本開示の1つまたはそれ以上のガイドRNAとを含む組成物)は、網膜下または硝子体内に投与される。深部イントロン突然変異と関連する眼の疾患のような網膜疾患の遺伝子治療プロトコールは、網膜の細胞への核酸の局所送達を必要とする。これらの疾患における治療標的である細胞は、網膜の光受容細胞または網膜神経感覚上皮の下にあるRPEの細胞のいずれかである。これらの細胞に対する核酸の送達は、網膜とRPEとの間の網膜下腔への注射を必要とする。

40

【0276】

いくつかの態様において、本発明は、場合により薬学的に許容される賦形剤中に本明細書に記述される任意の核酸を含む組成物を提供する。当技術分野において周知であるように、薬学的に許容される賦形剤は、薬理学的に有効な物質の投与を促進する比較的不活性な物質であり、液体溶液もしくは懸濁液、乳剤、または使用前に液体に溶解もしくは懸濁

50

するために適した固体剤形として供給することができる。例えば、賦形剤は、形もしくはコンシンテンシーを与えることができ、または希釈剤として作用することができる。適した賦形剤には、安定剤、湿潤剤および乳化剤、浸透圧を変化させるための塩、カプセル化剤、pH緩衝物質、および緩衝剤が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。そのような賦形剤は、過度の毒性を示すことなく投与される、眼に直接送達するために適した任意の薬剤を含む。薬学的に許容される賦形剤には、ソルビトール、様々なTWEEN化合物のいずれか、および水、食塩水、グリセロールおよびエタノールのような液体が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。薬学的に許容される賦形剤には、薬学的に許容される塩、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等のような無機酸の塩；ならびに酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等のような有機酸の塩を含めることができる。薬学的に許容される賦形剤の詳しい考察は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991)において利用可能である。

#### 【0277】

一般的に、これらの組成物は、網膜下注射によって投与されるように製剤化される。したがって、これらの組成物は、食塩水、リングル緩衝塩類溶液 (pH 7.4) 等のような薬学的に許容されるビヒクリと組み合わせることができる。必要ではないが、組成物は場合により、正確な量を投与するために適した単位投与剤形で供給してもよい。

#### 【0278】

##### 網膜下送達方法

20

網膜下送達方法は当技術分野において公知である。例えば、参照により本明細書に組み入れられる、国際公開第2009/105690号を参照されたい。簡単に説明すると、組成物（例えば、上記のウイルス送達または非ウイルス送達を通して送達してもよい、本開示の遺伝子操作された、天然に存在しないCRISP-Casシステムをコードする核酸）を黄斑および中心窓の網膜下に送達する一般的な方法を、以下の簡単な概要によつて例証する。この例は、単に方法の特定の特徴を例証することを意味しており、決して制限的であることを意味しない。

#### 【0279】

一般的に、ベクターは、手術用顕微鏡を使用して直接観察下で眼内（網膜下）に注射される組成物の形態で送達することができる。この技法は、硝子体切除後に、細いカニューレを使用して1つまたはそれ以上の小さい網膜切開部を通してベクター懸濁液の網膜下腔への注射を伴う。

30

#### 【0280】

簡単に説明すると、手術の間を通して、輸注（例えば、食塩水の）によって正常な眼球の体積を維持するために、輸注カニューレを留置して縫合することができる。硝子体切除を、適切な孔径（例えば、20～27ゲージ）のカニューレを使用して実施し、除去される硝子体ゲルの体積を、輸注カニューレから食塩水または他の等張溶液を輸注することによって交換する。硝子体切除は、（1）その皮質（後部硝子体膜）の除去により、カニューレによる網膜の貫通が容易となる；（2）その除去および流体（例えば、食塩水）との交換により、ベクターの眼内注射に適合する空間が作製される、および（3）その制御された除去により、網膜裂傷および計画外の網膜剥離の可能性が低減することから、実施することが都合がよい。

40

#### 【0281】

いくつかの実施形態において、ベクター組成物は、適切な孔サイズ（例えば27～45ゲージ）のカニューレを利用することによって中心網膜外部の網膜下腔に直接注射され、このようにして網膜下腔にブレブを作製する。他の実施形態において、ベクター組成物の網膜下注射の前に、適切な流体（食塩水またはリングル液のような）の少量（例えば、約0.1～約0.5ml）を、中心網膜外の網膜下腔に網膜下注射する。網膜下腔へのこの初回注射により、網膜下腔内に最初の流体ブレブが確立され、最初のブレブの位置で局所網膜剥離を引き起こす。この最初の流体ブレブにより、網膜下腔へのベクター組成物の標

50

的化送達が促進され（ベクター送達の前に注射平面を定義することにより）、脈絡膜への起こりうるベクター投与、および硝子体腔への注射または逆流の可能性を最小限にすることができる。いくつかの実施形態において、この最初の流体プレブにさらに、1つまたはそれ以上のベクター組成物および/または1つまたはそれ以上の追加の治療剤を含む流体を、同じまたは追加の細孔（fine bore）カニューレのいずれかによって、これらの流体を最初の流体プレブに直接投与することによって注射することができる。

#### 【0282】

ベクター組成物および/または最初の少量の流体の眼内投与は、シリングに取り付けた細孔カニューレ（例えば、27~45ゲージ）を使用して実施することができる。いくつかの実施形態において、このシリングのプランジャーは、フットペダルを押すことのような、機械的装置によって駆動することができる。細孔カニューレを、強膜切除術を通して硝子体腔を越えて、標的となる網膜の領域（しかし、中心網膜の外部）に従ってそれぞれの対象において予め決定された網膜の部位まで前進させる。直接可視下で、ベクター懸濁液を、自己閉鎖非拡大網膜切除術によって局所網膜剥離を引き起こす神經感覚上皮の下に機械的に注射する。上記のように、ベクター組成物を、中心網膜外部のプレブを作製する網膜下腔に直接注射するか、またはベクターを中心網膜外の最初のプレブに注入して、それを拡大させる（および網膜剥離領域を拡大させる）ことができる。いくつかの実施形態において、ベクター組成物の注射後に、別の流体のプレブへの注射を行う。

#### 【0283】

理論に捉われることを望むものではないが、網膜下注射の速度および位置によって、黄斑、中心窩、および/またはその下のRPE細胞の損傷を引き起こしうる局所剪断力が起こりうる。網膜下注射は剪断力を最小限にするまたは回避する速度で実施することができる。いくつかの実施形態において、ベクター組成物を約15~17分間かけて注射する。いくつかの実施形態において、ベクターを約17~20分間かけて注射する。いくつかの実施形態において、ベクター組成物を約20~22分間かけて注射する。いくつかの実施形態において、ベクター組成物を約35~約65μl/分の速度で注射する。いくつかの実施形態において、ベクター組成物を約35μl/分の速度で注射する。いくつかの実施形態において、ベクター組成物を約40μl/分の速度で注射する。いくつかの実施形態において、ベクター組成物を約45μl/分の速度で注射する。いくつかの実施形態において、ベクター組成物を約50μl/分の速度で注射する。いくつかの実施形態において、ベクター組成物を約55μl/分の速度で注射する。いくつかの実施形態において、ベクター組成物を約60μl/分の速度で注射する。いくつかの実施形態において、ベクター組成物を約65μl/分の速度で注射する。当業者は、プレブの注射速度および時間が例えば、中心網膜の細胞に近づくために十分な網膜剥離を作製するために必要な、ベクター組成物の体積またはプレブのサイズ、ベクター組成物を送達するために使用されるカニューレのサイズ、および本発明のカニューレの位置を安全に維持する能力によって指示されることを認識するであろう。

#### 【0284】

本発明のいくつかの実施形態において、網膜の網膜下腔に注射される組成物の体積は、約1μl、2μl、3μl、4μl、5μl、6μl、7μl、8μl、9μl、10μl、15μl、20μl、25μl、50μl、75μl、100μl、200μl、300μl、400μl、500μl、600μl、700μl、800μl、900μl、もしくは1mL、またはその間の任意の量のいずれか1つより多い。

#### 【0285】

いくつかの実施形態において、方法は、本開示のベクターを含む組換えウイルス粒子の有効量の眼への投与（例えば、網膜下および/または硝子体内投与によって）を含む。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約 $5 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12}$ 、 $11 \times 10^{12}$ 、 $15 \times 10^{12}$ 、 $20 \times 10^{12}$ 、 $25 \times 10^{12}$ 、 $30 \times 10^{12}$ 、または $50 \times 10^{12}$ ゲノムコピー/mLの少なくともいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物の

10

20

30

40

50

ウイルス力価は、約  $5 \times 10^{12} \sim 6 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12} \sim 7 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12} \sim 8 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12} \sim 9 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12} \sim 11 \times 10^{12}$ 、 $11 \times 10^{12} \sim 15 \times 10^{12}$ 、 $15 \times 10^{12} \sim 20 \times 10^{12}$ 、 $20 \times 10^{12} \sim 25 \times 10^{12}$ 、 $25 \times 10^{12} \sim 30 \times 10^{12}$ 、 $30 \times 10^{12} \sim 50 \times 10^{12}$ 、または  $50 \times 10^{12} \sim 100 \times 10^{12}$  ゲノムコピー / mL のいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12} \sim 25 \times 10^{12}$ 、または  $25 \times 10^{12} \sim 50 \times 10^{12}$  ゲノムコピー / mL のいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9$ 、 $11 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9$ 、 $20 \times 10^9$ 、 $25 \times 10^9$ 、 $30 \times 10^9$ 、または  $50 \times 10^9$  形質導入単位 / mL の少なくともいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^9 \sim 6 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9 \sim 7 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9 \sim 8 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9 \sim 9 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9 \sim 10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9 \sim 11 \times 10^9$ 、 $11 \times 10^9 \sim 15 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9 \sim 20 \times 10^9$ 、 $20 \times 10^9 \sim 25 \times 10^9$ 、 $25 \times 10^9 \sim 30 \times 10^9$ 、 $30 \times 10^9 \sim 50 \times 10^9$ 、または  $50 \times 10^9 \sim 100 \times 10^9$  形質導入単位 / mL のいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^9 \sim 10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9 \sim 15 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9 \sim 25 \times 10^9$ 、または  $25 \times 10^9 \sim 50 \times 10^9$  形質導入単位 / mL のいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10}$ 、 $11 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10}$ 、 $20 \times 10^{10}$ 、 $25 \times 10^{10}$ 、 $30 \times 10^{10}$ 、 $40 \times 10^{10}$ 、または  $50 \times 10^{10}$  感染単位 / mL の少なくともいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^{10} \sim 6 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10} \sim 7 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10} \sim 8 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10} \sim 9 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10} \sim 10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10} \sim 11 \times 10^{10}$ 、 $11 \times 10^{10} \sim 15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10} \sim 20 \times 10^{10}$ 、 $20 \times 10^{10} \sim 25 \times 10^{10}$ 、 $25 \times 10^{10} \sim 30 \times 10^{10}$ 、 $30 \times 10^{10} \sim 40 \times 10^{10}$ 、 $40 \times 10^{10} \sim 50 \times 10^{10}$ 、または  $50 \times 10^{10} \sim 100 \times 10^{10}$  感染単位 / mL の少なくともいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^{10} \sim 10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10} \sim 15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10} \sim 25 \times 10^{10}$ 、または  $25 \times 10^{10} \sim 50 \times 10^{10}$  感染単位 / mL の少なくともいずれかである。

#### 【0286】

いくつかの実施形態において、方法は、本開示のベクターを含む組換えウイルス粒子の有効量の個体（例えば、ヒト）の眼（例えば、網膜下および / または硝子体内投与）への投与を含む。いくつかの実施形態において、個体に投与されるウイルス粒子の用量は、約  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{13}$  ゲノムコピー / kg 体重の少なくともいずれかである。いくつかの実施形態において、個体に投与されるウイルス粒子の用量は、約  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{13}$  ゲノムコピー / kg 体重のいずれかである。

#### 【0287】

1つまたはそれ以上（例えば、2、3、またはそれ以上）のプレブを作製することができる。一般的に、本発明の方法およびシステムによって作製されるプレブまたは複数のプレブの総体積は、眼の流体体積、例えば典型的なヒト対象において約 4 mL を超えてはならない。それぞれの個々のプレブの総体積は、中心網膜の細胞型を露出するため、および最適な操作のために十分な依存性のプレブを作製するために十分なサイズの網膜剥離を促進するため、少なくとも約 0.3 mL、または少なくとも約 0.5 mL でありうる。当業者は、眼の構造に対する損傷を回避するために、本発明の方法およびシステムに従うプレブの作製において、適切な眼内圧を維持しなければならないことを認識する。それぞれの個々のプレブのサイズは、例えば、約 0.5 ~ 約 1.2 mL、約 0.8 ~ 約 1.2 mL、約 0.9 ~ 約 1.2 mL、約 0.9 ~ 約 1.0 mL、約 1.0 ~ 約 2.0 mL、約 1.0

～約3.0mlでありうる。このように、一例において、ベクター組成物懸濁液の全量3mlを注射するために、各約1mlのプレブ3個を確立することができる。組み合わせた全てのプレブの総体積は、例えば、約0.5～約3.0ml、約0.8～約3.0ml、約0.9～約3.0ml、約1.0～約3.0ml、約0.5～約1.5ml、約0.5～約1.2ml、約0.9～約3.0ml、約0.9～約2.0ml、約0.9～約1.0mlでありうる。

#### 【0288】

プレブの当初の位置の端部の外側の標的網膜（例えば、中心網膜）の領域に安全かつ効率的に形質導入するために、形質導入の標的領域にプレブを再配置するようにプレブを操作してもよい。プレブの操作は、プレブの体積によって作製されるプレブの依存性、プレブを含む眼の再配置、1つまたはそれ以上のプレブを含む眼または複数の眼を有するヒトの頭部の再配置、および／または流体-空気交換によって行うことができる。これは特に、中心網膜が典型的に網膜下注射による剥離に耐えることから、中心網膜に特に適切である。いくつかの実施形態において、流体-空気交換は、プレブを再配置するために利用され、輸注カニューレからの流体を、例えば網膜の表面上に空気を流れさせることによって、一時的に空気に交換する。空気の体積が、網膜の表面から硝子体腔の流体を押しのけると、硝子体腔内の流体がカニューレから流れ出ることがある。硝子体腔の流体からの圧の一時的な欠如により、プレブが、眼の依存部分へと移動して引き寄せられる。眼球を適切に配置することによって、網膜下ベクター組成物のプレブを、隣接する領域（例えば、黄斑および／または中心窩）を巻き込むように操作する。一部の例において、プレブの質量は、流体-空気交換を使用しない場合であっても、それを引き寄せるために十分である。プレブの所望の位置への移動は、プレブを眼の中の所望の位置に引き寄せるために、対象の頭部の位置を変更することによってさらに促進することができる。プレブの所望の形状が達成されると、流体を硝子体腔に戻す。流体は適切な流体、例えば、新鮮な食塩水である。一般的に、網膜下ベクター組成物は、網膜切除に対する網膜復位を行わなくとも、および眼内タンポナーデを行わなくともその場に留まり、網膜は約48時間位内に自然に再接着するであろう。

#### 【0289】

眼の細胞（例えば、黄斑および／または中心窩の、例えばRPEおよび／または光受容細胞）に本開示のベクターを安全かつ有効に形質導入することによって、本発明の方法は、深部イントロン突然変異と関連する眼の障害を有する個体、例えばヒトを治療するために使用することができ、形質導入細胞は、眼の障害を治療するために十分量のCRISP R-Casシステムを產生する。

#### 【0290】

ベクター（いくつかの実施形態において、ウイルス粒子の形状）の有効量を、治療的目的に応じて投与する。例えば、低い百分率の形質導入が所望の治療効果を達成することができる場合、治療の目的は一般的に、形質導入のこのレベルに合致するか、または超えることである。一部の例において、このレベルの形質導入は、標的細胞のわずか約1～5%、いくつかの実施形態において、所望の組織型の細胞の少なくとも約20%、いくつかの実施形態において少なくとも約50%、いくつかの実施形態において少なくとも約80%、いくつかの実施形態において少なくとも約95%、いくつかの実施形態において少なくとも約99%の形質導入によって達成することができる。手引きとして、注射あたりに投与されるウイルス粒子の数は、一般的に $1 \times 10^6$ ～約 $1 \times 10^{14}$ 個の粒子の間、約 $1 \times 10^7$ ～ $1 \times 10^{13}$ 個の粒子の間、約 $1 \times 10^9$ ～ $1 \times 10^{12}$ 個の粒子の間、または約 $1 \times 10^{11}$ 個の粒子である。ベクター組成物は、同じ技法の間に、または数日、数週間、数ヶ月、もしくは数年の間隔を空けて1回または複数回の網膜下注射によって投与してもよい。いくつかの実施形態において、多数のベクターをヒトを治療するために使用してもよい。

#### 【0291】

いくつかの実施形態において、本開示のベクターまたは核酸の有効量の網膜への投与は

10

20

30

40

50

、投与部位またはその近傍の光受容細胞に形質導入する。いくつかの実施形態において、光受容細胞の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、または100%超のいずれかが形質導入される。いくつかの実施形態において、光受容細胞の約5%～約100%、約10%～約50%、約10%～約30%、約25%～約75%、約25%～約50%、または約30%～約50%が形質導入される。形質導入された光受容細胞を同定する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、免疫組織化学または増強緑色蛍光タンパク質のようなマークターを使用して形質導入を検出することができる。

#### 【0292】

本発明のいくつかの実施形態において、方法は、眼の障害を有する個体、例えば深部イントロン突然変異と関連する眼の障害を有するヒトを治療するために、本開示のベクターまたは核酸の有効量を、哺乳動物の網膜下（例えば、網膜下腔）に投与することを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、光受容細胞において核酸を発現させるために網膜下の1つまたはそれ以上の位置に注射される。いくつかの実施形態において、組成物は、網膜下の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または10超の位置のいずれか1つに注射される。

#### 【0293】

いくつかの実施形態において、組成物は、1つ超の位置に同時または連続的に投与される。いくつかの実施形態において、複数回注射はわずか1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、9時間、12時間、または24時間の間隔である。いくつかの実施形態において、複数回の注射は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、10日、15日、20日、25日、または30日の間隔である。いくつかの実施形態において、複数回注射は、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、8カ月、10カ月、または11カ月の間隔である。いくつかの実施形態において、複数回の注射は、1年、2年、3年、4年、5年、6年、8年、10年、15年、20年、25年、30年、35年、40年、45年、55年、または60年の間隔である。

#### 【0294】

##### 硝子体内注射方法

一般的な硝子体内注射方法を以下の簡単な概要によって例証する。本実施例は、方法のある特定の特徴を例証することを意味しており、決して制限することを意味していない。硝子体内注射の技法は当技術分野で公知である（例えば、Peyman, G. A., et al. (2009) *Retina* 29(7): 875～912頁およびFagan, X. J. and Al-Qureshi, S. (2013) *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 41(5): 500～7頁を参照されたい）。

#### 【0295】

簡単に説明すると、硝子体内注射の対象に、瞳孔散大、眼の消毒、および麻酔薬の投与によって技法の準備を行う。当技術分野で公知の任意の適した散瞳剤を瞳孔散大のために使用することができる。瞳孔散大が適切であるかを治療前に確認することができる。眼の消毒処置剤、例えばポビドンヨード（BETADINE（登録商標））のようなヨウ化物含有溶液を適用することによって、消毒を行ってもよい。類似の溶液を使用して、眼瞼、まつげ、および他の任意の近傍の組織（例えば、皮膚）を清浄にする。リドカインまたはプロパラカインのような任意の適した麻酔薬を、任意の適した濃度で使用してもよい。麻酔薬は、局所用滴剤、ジェル、またはゼリー、および麻酔薬の結膜下適用を含むがこれらに限定されるわけではない当技術分野で公知の任意の方法によって投与してもよい。

#### 【0296】

注射前に、滅菌眼瞼用検鏡を使用して、領域のまつげをきれいにしてもよい。注射部位にシリングで印をつけてもよい。注射部位は、患者の水晶体に基づいて選択される。例えば、注射部位は、偽水晶体眼または無水晶体眼の患者では辺縁部から3～3.5mmであり、有水晶体眼の患者では辺縁部から3.5～4mmでありうる。患者は、注射部位と反対方向を見ていてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0297】

いくつかの実施形態において、方法は、本開示のベクターを含む組換えウイルス粒子の有効量を、眼（例えば、網膜下および／または硝子体内投与によって）に投与することを含む。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12}$ 、 $11 \times 10^{12}$ 、 $15 \times 10^{12}$ 、 $20 \times 10^{12}$ 、 $25 \times 10^{12}$ 、 $30 \times 10^{12}$ 、または  $50 \times 10^{12}$  ゲノムコピー／mL の少なくともいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^{12} \sim 6 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12} \sim 7 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12} \sim 8 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12} \sim 9 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12} \sim 11 \times 10^{12}$ 、 $11 \times 10^{12} \sim 15 \times 10^{12}$ 、 $15 \times 10^{12} \sim 20 \times 10^{12}$ 、 $20 \times 10^{12} \sim 25 \times 10^{12}$ 、 $25 \times 10^{12} \sim 30 \times 10^{12}$ 、 $30 \times 10^{12} \sim 50 \times 10^{12}$ 、または  $50 \times 10^{12} \sim 100 \times 10^{12}$  ゲノムコピー／mL のいずれかである。<sup>10</sup> いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12} \sim 25 \times 10^{12}$ 、または  $25 \times 10^{12} \sim 50 \times 10^{12}$  ゲノムコピー／mL のいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9$ 、 $11 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9$ 、 $20 \times 10^9$ 、 $25 \times 10^9$ 、 $30 \times 10^9$ 、または  $50 \times 10^9$  形質導入単位／mL の少なくともいずれかである。<sup>20</sup> いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^9 \sim 6 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9 \sim 7 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9 \sim 8 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9 \sim 9 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9 \sim 10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9 \sim 11 \times 10^9$ 、 $11 \times 10^9 \sim 15 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9 \sim 20 \times 10^9$ 、 $20 \times 10^9 \sim 25 \times 10^9$ 、 $25 \times 10^9 \sim 30 \times 10^9$ 、 $30 \times 10^9 \sim 50 \times 10^9$ 、または  $50 \times 10^9 \sim 100 \times 10^9$  形質導入単位／mL のいずれかである。<sup>30</sup> いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^9 \sim 10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9 \sim 15 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9 \sim 25 \times 10^9$ 、または  $25 \times 10^9 \sim 50 \times 10^9$  形質導入単位／mL のいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10}$ 、 $11 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10}$ 、 $20 \times 10^{10}$ 、 $25 \times 10^{10}$ 、 $30 \times 10^{10}$ 、 $40 \times 10^{10}$ 、または  $50 \times 10^{10}$  感染単位／mL の少なくともいずれかである。<sup>40</sup> いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^{10} \sim 6 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10} \sim 7 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10} \sim 8 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10} \sim 9 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10} \sim 10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10} \sim 11 \times 10^{10}$ 、 $11 \times 10^{10} \sim 15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10} \sim 20 \times 10^{10}$ 、 $20 \times 10^{10} \sim 25 \times 10^{10}$ 、 $25 \times 10^{10} \sim 30 \times 10^{10}$ 、 $30 \times 10^{10} \sim 40 \times 10^{10}$ 、 $40 \times 10^{10} \sim 50 \times 10^{10}$ 、または  $50 \times 10^{10} \sim 100 \times 10^{10}$  感染単位／mL の少なくともいずれかである。いくつかの実施形態において、組成物のウイルス力価は、約  $5 \times 10^{10} \sim 10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10} \sim 15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10} \sim 25 \times 10^{10}$ 、または  $25 \times 10^{10} \sim 50 \times 10^{10}$  感染単位／mL の少なくともいずれかである。

## 【0298】

いくつかの実施形態において、方法は、本開示のベクターを含む組換えウイルス粒子の有効量の個体（例えば、ヒト）の眼（例えば、網膜下および／または硝子体内投与）への投与を含む。いくつかの実施形態において、個体に投与されるウイルス粒子の用量は、約  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{13}$  ゲノムコピー／kg 体重の少なくともいずれかである。いくつかの実施形態において、個体に投与されるウイルス粒子の用量は、約  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{13}$  ゲノムコピー／kg 体重のいずれかである。

## 【0299】

注射の間、針を強膜に垂直に挿入して、眼の中心を指してもよい。針を、先端が、網膜下腔ではなくて硝子体で終わるように挿入してもよい。注射に関して当技術分野で公知の任意の適した量を使用してもよい。注射後、針を抗生物質のような消毒剤によって処置し

てもよい。また、過剰量の消毒剤を除去するために眼をすすいでもよい。

### 【0300】

網膜の構造および核酸送達の有効性を決定する手段

網膜は多数の層を含むことが知られている。網膜の細胞層は、内境界膜、神経線維、神経節細胞、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、外境界膜、光受容体、および網膜色素上皮層を含みうる。硝子体に対して最も近位の層は、内境界膜である。この層は、神経膠細胞の一層であるミュラー細胞を含みうる。神経線維層は、視神経を形成する神経節細胞からの軸索を含みうる。神経節細胞層は、神経節細胞およびアマクリン細胞を含みうる。内網状層は、神経節およびアマクリン細胞の樹状突起と、双極細胞の軸索との間のシナプスを含みうる。内顆粒層はアマクリン、双極、および水平細胞の細胞核を含みうる。外網状層は、水平細胞樹状突起と光受容細胞の突起との間のシナプスを含みうる。外顆粒層は、光受容細胞体を含みうる。外または内境界膜は、ミュラー細胞の先端突起における接着結合およびデスマゾームのような、ならびにこれらの突起と光受容細胞の内部セグメントとの間の細胞接続部を含みうる。光受容体層は、桿錐状体層およびヤコブ膜としても知られ、桿体および椎体を含む光受容細胞を含みうる。硝子体に対して最も遠位の網膜層は、網膜色素上皮（RPE）であり、これは色素顆粒を含む六角形の上皮細胞の層を含みうる。

10

### 【0301】

網膜はまた、多くの異なる細胞型を含むことが知られている。網膜ニューロンは、光受容細胞、双極細胞、神経節細胞、アマクリン細胞、および水平細胞を含みうる。光受容細胞は、光に対して感受性である。光受容細胞は、光を感じて、双極細胞および神経節細胞を通して、シグナルを視神経に伝達することによって応答しうる。光受容細胞は、一般的に弱い光の条件で光を感じる桿体細胞と、一般的に色およびより明るい光の認識を感じる椎体細胞とを含みうる。双極細胞は、光受容細胞からの入力を受容して、シナプスを介してアマクリンまたは神経節細胞へと伝達する。神経節細胞は、アマクリン細胞または水平細胞からの情報を受容し得、その軸索は視神経を形成する。水平細胞は、多数の光受容体からの入力を統合し得、光のレベルの調節を助ける。アマクリン細胞は、双極細胞を調節するために役立ち、神経節細胞に入力を提供する介在ニューロンである。網膜の神経膠細胞は、ミュラー細胞、星状膠細胞、および小膠細胞を含みうる。

20

### 【0302】

網膜下または硝子体内注射による核酸送達の有効性は、本明細書において記述されるいくつかの基準によってモニターすることができる。いくつかの実施形態において、有効性は、核酸が送達された1つまたはそれ以上の細胞を含む試料における深部イントロン突然変異および/または両端に位置する配列の欠失を検出することによってアッセイされる。欠失は、サンプルティング、PCR、qPCR、DNAシークエンシング（例えば、サンガーシークエンシングおよび次世代シークエンシング）、in situハイブリダイゼーション、DNAマイクロアレイ、およびSurveyorヌクレアーゼアッセイ（例えば、Ran, F. A. et al. (2013) Nat. Protoc. 8: 2281 ~ 2308頁を参照されたい）を含むがこれらに限定されるわけではない当技術分野で公知の任意の手段によって検出することができる。例示的な方法を以下の実施例に例証する。

30

### 【0303】

いくつかの実施形態において、有効性は機能的にアッセイされる。例えば、本発明の方法を使用する対象の治療の後、対象を、例えば、1つまたはそれ以上の臨床パラメータによって疾患状態の1つまたはそれ以上の兆候または症状の改善、および/または安定化、および/または進行の遅延に関して評価してもよい。そのような試験の例は、当技術分野で公知であり、客観的測定ならびに主観的測定（例えば、対象が報告する）を含む。例えば、対象の視機能に及ぼす治療の有効性を測定するために、以下の1つまたはそれ以上を評価してもよい：対象の主観的な見え方の質または中心視機能の改善（例えば、対象が流ちょうに読む能力および顔を認識する能力の改善）、対象の眼のモビリティ（例えば、迷

40

50

路を通り抜けるのに要する時間の減少)、視力(例えば、対象のLogMARスコアの改善)、マイクロ視野計(例えば、対象のdBスコアの改善)、暗順応視野計(例えば、対象のdBスコアの改善)、ファインマトリックスのマッピング(例えば、対象のdBスコアの改善)、ゴルドマン視野計(例えば、暗点領域(すなわち盲点)のサイズの低減およびより小さい視標の解像能の改善)、フリッカー感受性(例えば、ヘルツの改善)、自発蛍光、および電気生理学測定(例えば、ERGの改善)。いくつかの実施形態において、視機能は、対象の視覚モビリティによって測定される。いくつかの実施形態において、視機能は、対象の視力によって測定される。いくつかの実施形態において、視機能は、マイクロ視野計によって測定される。いくつかの実施形態において、視機能は、暗順応視野計によって測定される。いくつかの実施形態において、視機能はERGによって測定される。いくつかの実施形態において、視機能は、対象の主観的な見え方の質によって測定される。

#### 【0304】

進行性の視機能変性が起こる疾患の場合、対象を若年齢で治療すれば、疾患の進行を遅延または停止させるのみならず、後天性の弱視による視機能喪失を改善または予防することができる。弱視には2つの型がある。出生後数カ月まで完全な暗闇に置いた非ヒト霊長類および仔ネコの研究において、動物をその後光に曝露すると、網膜が機能的シグナルを送っているにもかかわらず、機能的に非可逆的盲目である。この盲目は、皮質の神経接続および「教育」が、刺激停止により出生後から発達時に停止しているために起こる。この機能が回復するか否かは不明である。網膜変性疾患の場合、通常の視覚野の回路は、当初、変性により有意な機能障害が引き起こされる時点までは、「学習した」かまたは発達上適切であった。機能障害の眼におけるシグナル伝達という観点での視覚刺激の喪失は、「後天性」または「学習性」の機能障害(「後天性弱視」)を生じ、それによって脳がシグナルを解釈できなくなるか、またはその眼を「使用する」ことができなくなる。これらの「後天性弱視」の場合、弱視の眼の遺伝子治療の結果としての網膜からのシグナル伝達の改善によって、疾患状態の進行の遅延または安定化に加えて、より正常な機能の獲得がさらに起こるか否かは不明である。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは年齢30歳未満である。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは年齢20歳未満である。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは年齢18歳未満である。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは年齢15歳未満である。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは年齢14歳未満である。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは年齢13歳未満である。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは年齢12歳未満である。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは年齢10歳未満である。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは年齢8歳未満である。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは年齢6歳未満である。

#### 【0305】

一部の眼の障害では、1つの細胞型の機能の改善が別の機能を改善する「ナース細胞」現象が存在する。例えば、中心網膜のRPEに本発明の核酸を形質導入すると、桿体の機能を改善し、次に改善された桿体機能により椎体機能の改善が起こる。したがって、1つの細胞型の治療によって、別の細胞型の機能の改善が起こりうる。

#### 【0306】

特定のベクターおよび組成物の選択は、個々のヒトの病歴、ならびに治療される状態および個体の特徴を含むがこれらに限定されるわけではない、多数の異なる要因に依存する。そのような特徴の評価および適切な治療レジメンの設計は、最終的には、主治医の責任である。

#### 【0307】

いくつかの実施形態において、治療されるヒトは、遺伝性の眼の障害(例えば、深部イントロン突然変異と関連する)を有するが、まだ臨床徴候または症状を発現していない。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは、眼の障害(例えば、深部イントロン突然変異と関連する)を有する。いくつかの実施形態において、治療されるヒトは、眼の障

10

20

30

40

50

害（例えば、深部イントロン突然変異と関連する）の1つまたはそれ以上の兆候または症状を発現している。いくつかの実施形態において、深部イントロン突然変異は、治療されるヒトにおいて同定されている。

#### 【0308】

本発明の組成物は、単独で、または眼の障害を治療するための1つもしくは複数の追加の治療剤との併用のいずれかで使用することができる。連続的投与の間の間隔は、少なくとも数分、数時間、または数日（またはあるいはそれ未満）でありうる。

#### 【0309】

いくつかの実施形態において、1つまたはそれ以上の追加の治療剤を、網膜下または硝子体に投与してもよい（例えば、硝子体内投与を通して）。追加の治療剤の非制限的な例には、ポリペプチド神経栄養因子（例えば、GDNF、CNTF、BDNF、FGF2、PEDF、EPO）、ポリペプチド抗血管新生因子（例えば、sFlt、アンジオスタチン、エンドスタチン）、抗血管新生核酸（例えば、siRNA、miRNA、リボザイム）、例えばVEGFに対する抗血管新生核酸、抗血管新生モルホリノ、例えばVEGFに対する抗血管新生モルホリノ、抗血管新生抗体、および/または抗体断片（例えば、Fab断片）、例えばVEGFに対する抗血管新生抗体および/または抗体断片が挙げられる。

10

#### 【0310】

##### VII. キット

本明細書において記述される組成物、核酸、およびウイルス粒子は、本明細書において記述される本発明の方法の1つにおいて使用するために設計されたキットに含めることができる。

20

#### 【0311】

本発明の組成物、核酸、およびウイルス粒子を、さらにキットにパッケージしてもよく、キットはさらに使用説明書を含みうる。いくつかの実施形態において、使用説明書は、本明細書に記述される方法の1つに従う説明書を含む。

#### 【0312】

いくつかの実施形態において、キットはさらに、緩衝液および/または薬学的に許容される賦形剤を含む。当技術分野で周知であるように、薬学的に許容される賦形剤は、薬理学的に有効な物質の投与を促進する比較的不活性な物質であり、液体溶液もしくは懸濁液、乳液、または使用前に液体に溶解または懸濁させるために適した固体剤形として供給することができる。例えば、賦形剤は、形状もしくはコンステンシーを生じることができ、または希釈剤として作用することができる。適した賦形剤には、安定剤、湿潤剤および乳化剤、浸透圧を変化させるための塩、カプセル化剤、pH緩衝物質、および緩衝剤を含むがこれらに限定されるわけではない。そのような賦形剤は、過度の毒性を起こすことなく投与することができる、眼に直接送達するために適した任意の医薬剤を含みうる。薬学的に許容される賦形剤には、ソルビトール、様々なTWEEN化合物のいずれか、および水、食塩水、グリセロールおよびエタノールのような液体が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。薬学的に許容される賦形剤には、薬学的に許容される塩、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等のような無機酸の塩、ならびに酢酸塩、プロピオノ酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等のような有機酸の塩を含めることができる。薬学的に許容される賦形剤の詳しい考察は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991)において利用可能である。

30

#### 【0313】

いくつかの実施形態において、薬学的に許容される賦形剤は、薬学的に許容される担体を含みうる。そのような薬学的に許容される担体は、滅菌液体、例えば水、および石油、動物、植物、または合成起源の油、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油等を含む油でありうる。食塩水溶液およびデキストロース水溶液、ポリエチレングリコール(PEG)およびグリセロール溶液もまた、特に注射用溶液のための液体担体として使用することができる。

40

50

。追加の成分、例えば保存剤、緩衝剤、等張剤、抗酸化剤および安定化剤、非イオン性湿润剤または清澄剤、増粘剤等も同様に使用することができる。本明細書において記述されるキットは、単回単位用量または複数回単位用量に包装することができる。キットの内容物は一般的に、無菌的で実質的に等張の溶液として製剤化される。

#### 【実施例】

##### 【0314】

本発明は、以下の実施例を参照してより十分に理解されるであろう。しかし、以下の実施例は、本発明の範囲を制限すると解釈すべきではない。本明細書において記述される実施例および実施形態は、単に説明目的のためであり、それに照らして様々な変更または変化が当業者に示唆されるが、それらも本出願および添付の特許請求の範囲の精神および範囲に含まれると理解される。

10

#### 【実施例1】

##### 【0315】

C r i s p r - C a s 9 技術を使用したレーバー先天黒内障の *in vitro* モデルの作製

方法

プラスミド

p S p C a s 9 を発現する p S p C a s 9 プラスミドを、 S i g m a (カタログ番号: C A S 9 P - 1 E A ) に注文した。 B G H ポリ A における B b s I 制限部位を、 Q u i k C h a n g e L i g h t n i n g 部位特異的突然変異誘発キット ( S t r a t a g e n e ) および一対の突然変異誘発プライマー ( 配列番号 2 8 ~ 2 9 ) を使用して製造元のプロトコールに従って除去した。 U 6 プロモーター - B b s I : B b s I - s g R N A スキヤホールド - U 6 ターミネーター カセット ( 配列番号 3 0 ) を、 G e n e A r t ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) によって合成して、 p S p C a s 9 - B b s I ヌルプラスミドの P c i I および N r u I 制限部位に挿入し、 p S p C a s 9 ( B B ) プラスミドを作製した。 s g R N A オリゴ ( 配列番号 1 ~ 2 ) を、既に記述されたプロトコールに従って ( R a n , F . A . e t a l . ( 2 0 1 3 ) N a t . P r o t o c . 8 : 2 2 8 1 ~ 2 3 0 8 頁 ) 、 p S p C a s 9 ( B B ) プラスミドの 2 つの B b s I 制限部位にサブクローンングした。

20

##### 【0316】

30

スクレオフェクション

p S p C a s 9 ( B B ) - U 6 - s g R N A プラスミド D N A 2 . 5 マイクログラムおよび s s O D N ( 1 0 マイクロモル濃度 ) ( 配列番号 3 ) 5 マイクロリットルを、 A m a x a S F 細胞株 4 D - N u c l e o f e c t o r X キット L ( L o n z a ) および 4 D - N u c l e o f e c t o r システム ( L o n z a ) のプログラム C M - 1 3 0 を使用して、製造元のプロトコールに従って、 1 × 1 0 <sup>6</sup> 個の H E K 2 9 3 F T 細胞に同時トランスクレオフェクションした。

##### 【0317】

スクリーニング

C E P 2 9 0 の c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異を有するクローニングを同定するために、細胞を、 4 8 時間の同時トランスクレオフェクション後に単細胞に解離させて、ウェルあたり複数の細胞を有する可能性を低減させるために、 1 0 0 マイクロリットルあたり細胞 0 . 5 個の最終濃度に連続希釈した。希釈した細胞 1 0 0 マイクロリットルを 9 6 ウェルプレート 9 枚のそれぞれのウェルに播種した。細胞を 5 % C O <sub>2</sub> 、 3 7 ° のインキュベーター内で 2 週間増殖させた。

40

##### 【0318】

2 3 5 個の単細胞クローニングを同定して、 C E P 2 9 0 の c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異に関してスクリーニングした。ゲノム D N A を、 Q u i c k E x t r a c t D N A 抽出溶液 ( E p i c e n t r e ) を使用して抽出し、 G o T a q H o t S t a r t G r e e n マスター ミックス ( P r o m e g a ) およびイントロン突然変異の両端に

50

位置する P C R プライマー（配列番号 4 ~ 5 ）によって増幅した。 P C R 産物の増幅は、以下のサイクリングパラメータによって得られた： 9 5 で 2 分間を 1 サイクル； 9 5 で 3 0 秒、 6 0 で 3 0 秒、および 7 2 で 3 分間を 3 5 サイクル； 7 2 で 1 5 分間を 1 サイクル。 P C R 産物を、 S n a B I 消化およびシーケンシングプライマー（配列番号 6 ）によるサンガーシーケンシングに供した。

### 【 0 3 1 9 】

#### R T - q P C R

m R N A を、 R N e a s y P l u s ミニキット（ Q i a g e n ）を使用して、製造元のプロトコールに従って W T 、 H e t 、および M T 細胞から抽出した。総 R N A 1 マイクログラムを使用して、 i S c r i p t c D N A 合成キット（ B i o - R a d ）を使用して製造元のプロトコールに従って c D N A を合成した。 c D N A を、 A B I P r i s m 7 5 0 0 リアルタイム P C R システム（ A p p l i e d B i o s y s t e m s ）において、低濃度 R O X ( B i o t i u m ) を含む F a s t P l u s E v a G r e e n q P C R マスター・ミックス、ならびに野生型 C E P 2 9 0 m R N A ( 配列番号 7 ~ 8 ) および突然変異体 C E P 2 9 0 m R N A ( 配列番号 9 ~ 1 0 ) をそれぞれ特異的に検出するプライマーを含む緩衝液中でリアルタイム P C R 増幅に供した。以下の条件を使用した： 5 0 で 2 分間を 1 サイクル； 9 5 で 1 0 分間を 1 サイクル； 9 5 で 1 5 秒間および 6 0 で 6 0 秒間を 4 0 サイクル。増幅産物の特異性を、 9 5 で 1 5 秒間、 6 0 で 6 0 秒間、 9 5 で 1 5 秒間および 6 0 で 1 5 秒間のサイクルを使用してそれぞれの試行の最後に実施した融解曲線分析から決定した。データを S D S 2 . 3 ソフトウェア（ A p p l i e d B i o s y s t e m s ）を使用して分析した。 C E P 2 9 0 発現レベルを、 P P I A m R N A の発現レベルに対して標準化した（プライマーの配列に関しては、配列番号 3 1 ~ 3 2 を参照されたい）。

### 【 0 3 2 0 】

#### ウェスタンプロット分析

細胞を、氷中で、 1 ミリモル / リットルのフッ化フェニルメチルスルホニル ( P M S F ; C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y ) および 1 X プロテアーゼ阻害剤カクテル ( C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y ) を補充した R I P A 溶解緩衝液 ( C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y ) 中で溶解した。次に、細胞をこすり取り、エッペンドルフチューブに収集して、ライセートを 1 3 , 0 0 0 r p m 、 4 で 6 分間の遠心分離によって透明にした。 N u P a g e 4 X L D S 試料緩衝液および N u P a g e 1 0 X 還元剤（いずれも L i f e T e c h n o l o g i e s ）を添加して、 7 0 で 1 0 分間加熱し、 1 3 , 0 0 0 r p m で 1 分間遠心分離することによって、試料を調製した。タンパク質試料を、 H i M a r k 染色済みタンパク質標準物質（いずれも L i f e T e c h n o l o g i e s ）と共に N u P A G E 3 ~ 8 % T r i s - 酢酸ゲルにロードした。試料をゲル電気泳動によって、 1 8 0 ボルトで 1 時間分離した。使用した泳動緩衝液は、 T r i s - 酢酸 S D S 泳動緩衝液（ L i f e T e c h n o l o g i e s ）であった。転写のために、ポリフッ化ビニリデン（ P V D F ）メンブレンを、親水性にするためにメタノール中で短時間処理して水ですすいだ。 X C e l l I I プロットモジュール（ L i f e T e c h n o l o g i e s ）において P V D F メンブレンおよびゲルを濾紙およびスポンジの間に挟むことによって、転写サンドイッチを調製した。使用した転写緩衝液は、 2 0 % メタノールを含む N u P a g e 2 0 X 転写緩衝液（ L i f e T e c h n o l o g i e s ）であった。転写は、 X C e l l S u r e L o c k M i n i - C e l l ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) 中、 3 0 ボルトで 2 時間実施した。転写後、 P V D F メンブレンを、 1 % 脱脂粉乳を含む P i e r c e T B S T 緩衝液（ T w e e n 2 0 洗浄剤を含む T r i s - 緩衝食塩水； T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ）中、室温で 1 時間振とうさせながらブロックした。プロットをブロック溶液中で作製した一次抗体溶液中でインキュベートして、 4 で終夜振り動かした。使用した一次抗体は、ウサギポリクローナル抗 C E P 2 9 0 抗体（ウスター、マサチューセッツ大学の H e m a n t K h a n n a 教授の寄贈）、マウスモノクロ

ーナル抗 Cas 9 抗体 (クローン 7 A 9 ; Millipore) 、 HRP コンジュゲートウサギモノクローナル抗ベータ - アクチン抗体 (クローン 13 E 5 ; Cell Signaling Technology) であった。未結合の一次抗体を TBS T で各 10 分間 3 回洗浄した。ブロック溶液中の二次抗体 (Alexa Fluor 647 コンジュゲート抗ウサギまたは抗マウス IgG ; Cell Signaling Technology) を、メンブレンに添加して、シェーカーにおいて室温で 1 時間維持した。非特異的バックグラウンドを低減させるために、メンブレンを TBS T によって各 10 分間 3 回洗浄した。メンブレンを、 Pierce 増強化学発光 (ECL) ウエスタンプロット用基質 (Thermo Fisher Scientific) を使用して 4 分間現像した。最後に、プロット中のタンパク質バンドを、Kodak X-OMAT 2000 プロセッサにおいて、フィルムを様々な時間間隔で露出することによって可視化した。抗ベータ - アクチン抗体のプロットを再プロービングするために、メンブレンを最初に、回復用ウエスタンプロットストリッピング緩衝液 (Thermo Fisher Scientific) 中、37 度 30 分間インキュベートすることによってストリッピングした後、抗ベータ - アクチン抗体によって再プロービングした。本試験で示したプロッティングデータは、少なくとも 3 回の独立した実験の代表であった。 10

#### 【0321】

##### 結果

最初に、CRISPR - Cas 9 ゲノム編集技術を使用して、CEP290においてイントロンスプライス突然変異 c. 2991 + 1655 A > G を有する細胞モデルを作製した。この細胞モデルは、CEP290において c. 2991 + 1655 A > G 突然変異を有する LCA 患者を治療する治療薬を評価するための貴重なツールであった。 20

#### 【0322】

細菌型 II CRISPR - Cas 9 システムによるゲノム編集を、sgRNA 標的配列およびプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) によって定義される標的化ゲノム座での二本鎖切断 (DSB) の導入によって開始した後、相同性組換え修復 (HDR) または非相同末端結合 (NHEJ) のいずれかを通して DSB の修復を行った (Jinek, M. et al. (2012) Science 337 : 816 ~ 821 頁; Ran, F. A. et al. (2013) Nat. Protoc. 8 : 2281 ~ 2308 頁)。HDR 鑄型の存在下では、CRISPR - Cas 9 システムを使用して、HDR プロセスを通して標的座で正確かつ定義された遺伝子操作を行うことができる。 30

#### 【0323】

標的化ゲノム DNA 置換を得るために、sgRNA および化膿連鎖球菌 Cas 9 (SpCas9) の両方を発現するプラスミドを、直線状の HDR 鑄型と共に 293FT 細胞にスクリオフェクションによって導入した。HDR 鑄型は、突然変異 PAM (c. 2991 + 1666 C > G) と共に c. 2991 + 1655 A > G 突然変異の両端に位置する 75 bp の相同性アームを含む一本鎖 DNA オリゴスクリオチド (ssODN ; 配列番号 3) であった。突然変異 PAM は、細胞においてドナー ssODN が Cas 9 によって分解されるのを回避して、その間に CEP290 のイントロン 26 に独自の SnaBI 制限部位を導入した。 40

#### 【0324】

CEP290 の c. 2991 + 1655 A > G 突然変異を有する細胞を得るために、sgRNA / SpCas9 および ssODN 同時トランスフェクト細胞から、235 個の単細胞クローニングを単離してスクリーニングした。ゲノム DNA を抽出して、イントロン突然変異の両端に位置する PCR プライマー (配列番号 4 ~ 5) によって増幅した。PCR 産物を、SnaBI 消化およびシーケンシングプライマー (配列番号 6) によるサンガーシーケンシングに供した。

#### 【0325】

235 個の単細胞クローニング中、1 つのクローニングが、両方の CEP290 対立遺伝子に c. 2991 + 1655 A > G および c. 2991 + 1666 C > G 突然変異を含んだ (本 50

明細書において以降、「突然変異体細胞」または「M T 細胞」と呼ぶ)。別のクローンは、1つのC E P 2 9 0 対立遺伝子上に2つの突然変異、および他の対立遺伝子上に内因性の野生型C E P 2 9 0 DNAを含んだ(本明細書において以降、「ヘテロ接合細胞」または「H e t 細胞」と呼ぶ)。内因性の野生型C E P 2 9 0 の2つの対立遺伝子を含む細胞を、本明細書において以降「野生型細胞」または「W T 細胞」と呼ぶ。

#### 【0326】

野生型、ヘテロ接合、および突然変異体細胞における野生型および突然変異型C E P 2 9 0 mRNAの発現レベルを、野生型C E P 2 9 0 mRNA(配列番号7~8)および突然変異型C E P 2 9 0 mRNA(配列番号9~10)をそれぞれ特異的に検出するプライマーを使用して、逆転写定量的PCR(RT-qPCR)によって測定した。結果を、P P I A mRNA(配列番号31~32)の発現レベルに対して標準化した。

10

#### 【0327】

野生型細胞と比較して、ヘテロ接合および突然変異体細胞では、野生型C E P 2 9 0 のmRNAレベルがそれぞれ27%および48%低減された(図3A)。予想されるように、野生型細胞は、突然変異型C E P 2 9 0 mRNAを発現しなかったが、そのレベルは突然変異体細胞ではヘテロ接合細胞より24%高かった(図3B)。ヘテロ接合細胞と比較して、突然変異体細胞は、有意により低レベルの野生型C E P 2 9 0 mRNAを発現し、有意により高レベルの突然変異型C E P mRNAを発現した。したがって、この細胞モデルは、c. 2991+1655A>G突然変異を有するLCA患者が、野生型C E P 2 9 0 mRNAの約50%低減されたレベルを発現することから(c. 2991+1655A>G突然変異を有するLCA患者が、野生型C E P 2 9 0 mRNAの約50%低減されたレベルを発現することから(den Hollander, A. I. et al. (2006) Am. J. Hum. Genet. 79: 556~561頁)、これらの患者における表現型を要約する。

20

#### 【0328】

野生型、ヘテロ接合、および突然変異体細胞におけるC E P 2 9 0 のタンパク質レベルをウェスタンプロット分析によって調べた。野生型細胞と比較すると、ヘテロ接合および突然変異体細胞におけるC E P 2 9 0 タンパク質レベルは、大きく低減された(図3C)。突然変異体細胞は、ヘテロ接合細胞と比較してより低いレベルのC E P 2 9 0 タンパク質を発現した(図3C)。したがって、イムノプロットデータは、RT-qPCRデータと一貫した。

30

#### 【実施例2】

#### 【0329】

c. 2991+1655A>G突然変異の標的化欠失

方法

プラスミド

オールインワン型発現ベクターを、既に記述されたGolden Gateクローニング法(Sakuma, T. et al. (2014) Sci. Rep. 4: 5400)によって構築した。簡単に説明すると、U6プロモーター-BbsI:BbsI-sgRNAスキヤホールド-U6ターミネーター-CMVプロモーター(配列番号33)を含むDNA断片を、GeneArt(Life Technologies)によって合成して、上記のpSpCas9-BbsIヌルプラスミドのPciIおよびNheI制限部位に挿入して、上流のsgRNAガイド配列をサブクローニングするために使用するpSpCas9(BBU)プラスミドを作製した。下流のsgRNAガイド配列をサブクローニングするために使用するpSpCas9(BBD)プラスミドを構築するために、DNA鑄型としてのpSpCas9(BB)プラスミドDNAおよび一対のPCRプライマー(配列番号34~35)と共に、Phusion高忠実度DNAポリメラーゼ(New England Biolabs Inc.)を使用してPCR反応を実施した。サイクリングパラメータは、98℃で1分間を1サイクル；98℃で20秒間、および72℃で30秒間を35サイクル；72℃で5分間を1サイクルであった。PCR産物を、pSpCas9(BBU)プラスミドのPciIおよびKpnI部位に挿入した。このpSpCas9(BBD)プラスミドでは、2つのBsaI部位がU6プロモーター駆動sgRNAの両

40

50

端に位置する。U 1 sgRNAオリゴ(配列番号11～12)をアニールした後、pSpCas9(BB-U)プラスミドの2つのBbsI制限部位にサブクローニングし、D1、D2、およびD3 sgRNAオリゴ(配列番号13～18)をアニールして、既に記述されたプロトコール(Ran, F. A. et al. (2013) Nat. Proto. c. 8: 2281～2308頁)に従って、pSpCas9(BB-D)プラスミドの2つのBbsI制限部位にサブクローニングした。得られたD1～D3 sgRNAをU6プロモーターと共に、制限酵素BsaIを使用してpSpCas9(BB-D)プラスミドからさらに切り出し、pSpCas9(BB-U)-U1 sgRNAプラスミドにおける2つのBsaI部位にサブクローニングした。得られたpSpCas9(BB-UD)プラスミドは、2つのU6プロモーター駆動sgRNAおよび1つのCMVプロモーター駆動SpCas9を発現した。2つの対照sgRNA(配列番号36～39)のオリゴを、上記の方法を使用して、対照プラスミドとしてオールインワン型発現ベクターのBbsI制限部位にサブクローニングした。

### 【0330】

#### トランスフェクションおよびPCR分析

sgRNA対-SpCas9プラスミドを、Lipofectamine 3000トランスフェクション試薬(Life Technologies)を使用して、製造元のプロトコールに従って、野生型、ヘテロ接合、および突然変異体細胞にトランスフェクトした。

### 【0331】

トランスフェクションの48時間後、ゲノムDNAを、Quick Extract DNA抽出溶液(Epicentre)を使用して細胞から抽出し、GoTaq Hot Start GreenマスターMix( Promega)およびイントロン突然変異の両端に位置するPCRプライマー(配列番号4～5)によって増幅した。PCR産物の増幅は、以下のサイクリングパラメータによって得られた：95℃で2分間を1サイクル；95℃で30秒間、60℃で30秒間、および72℃で3分間を35サイクル；72℃で15分間を1サイクル。次に、PCR産物を、アガロースゲル電気泳動に供した。

### 【0332】

#### 次世代シーケンシング(NGS)

上記で得られたPCR産物をNGSシーケンシングのためにACGT(Wheeling, IL)に送付した。試料DNAを、超音波処理によって平均で350bpの標的断片サイズに断片化して、Illumina Truseq DNA PCRフリー試料調製キットを使用してシーケンシングライブリを構築するために使用した。ライブリをQubitおよび2100バイオアナライザによって定量して、Illuminaプラットフォームにロードして、PE150のリードを得た。試料あたりおよそ150Kリード(±20%)を得た。未加工のIlluminaを逆多重化して、fastqフォーマットに変換し、低品質( $Q < 20$ )および短いリード( $N < 50$ )を除外した。フィルター処理したリードを、Bowtie2を使用して参照配列(野生型DNAおよびトランケート型DNA)とアラインした。定量のために、野生型DNAまたはトランケート型DNAのいずれかに対して独自であるU1 sgRNA切断部位の両端に位置する(切断部位の前20bpおよび後20bp)40bpの配列とアラインしたリードの数を使用して、それぞれの試料における野生型およびトランケート型DNAの百分率を計算した。

### 【0333】

#### 結果

次に、本明細書において記述されるモデルを使用して、c. 2991 + 1655 A > G突然変異の標的化欠失を生成するためのアプローチを試験した。

### 【0334】

潜在性エキソン内の座を標的とする1つの上流のsgRNA(U1、配列番号19)を、SpCas9と同じベクターにおいて下流の3つのsgRNAのそれぞれ(D1、D2、D3、配列番号20～22)と共に発現させた。上流および下流のsgRNA対は全て

10

20

30

40

50

、 c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異の両端に位置し、これまでの研究から、 s g R N A 対によって誘導されるゲノム欠失の修復が正確な末端結合によってほぼ達成されることが証明されていることから、それぞれ 2 8 3 b p 、 1 8 7 b p 、および 2 3 1 b p のゲノム欠失を生成すると予想された (Brandl, C. et al. (2014) F E B S Open Bio. 5 : 2 6 ~ 3 5 頁; Zheng, Q. et al. (2014) Biotechniques 5 7 : 1 1 5 ~ 1 2 4 頁)。2 つ対照 s g R N A を、対照として同じプラスミドにサブクローニングした。

#### 【 0 3 3 5 】

s g R N A 対 - S p C a s 9 プラスミドを、上記のように野生型、ヘテロ接合、および突然変異体細胞にトランスフェクトした後、欠失領域の両端に位置するプライマー (配列番号 4 ~ 5) を使用して P C R 分析を行った。野生型およびトランケート型ゲノム断片をゲル電気泳動によって分離した。試験した 3 つ全ての上流 / 下流の s g R N A 対に関して、対照 s g R N A トランスフェクト細胞には存在しない、予想されるゲノム欠失の存在を示す P C R 産物を検出した (図 4 A)。これらの結果は、 s g R N A 対および S p C a s 9 が、 c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異を除去することができることを証明した。突然変異体細胞から調製した 4 つ P C R 試料の次世代シーケンシング (N G S) 分析により、 6 0 . 7 % 、 6 5 . 9 % 、および 7 2 . 4 % の N G S リードがそれぞれ、 U 1 D 1 - 、 U 1 D 2 - 、および U 1 D 3 - トランスフェクト細胞においてトランケート型 D N A とアラインされることがさらに判明した。したがって、 3 つ全ての s g R N A 対および S p C a s 9 は、 c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異の除去において非常に有効であった。

#### 【 0 3 3 6 】

s g R N A 対が、ヘテロ接合および突然変異体細胞において野生型 C E P 2 9 0 発現レベルをレスキューすることができることを確認するために、野生型、ヘテロ接合および突然変異体細胞に、 s g R N A 対および S p C a s 9 を発現するプラスミドをトランスフェクトさせた後、上記のように C E P 2 9 0 m R N A について R T - q P C R 分析を行った。結果を、 P P I A m R N A の発現レベルに対して標準化した。

#### 【 0 3 3 7 】

対照 s g R N A と比較すると、 s g R N A 対、特に U 1 D 3 対は、ヘテロ接合および突然変異体細胞において、野生型 C E P 2 9 0 m R N A レベルを顕著にレスキューし (図 5 A) 、突然変異体 C E P 2 9 0 m R N A レベルを低減させた (図 5 B)。重要なことに、 3 つの s g R N A 対のいずれも、野生型 C E P 2 9 0 m R N A レベルを有意に変化させず (図 5 A) 、標的化ゲノム欠失が C E P 2 9 0 転写物の正常なスプライシングを妨害しなかったことを示唆した。 U 1 D 3 s g R N A 対は、ヘテロ接合および突然変異体細胞における野生型 C E P 2 9 0 m R N A レベルを、野生型細胞と同等のレベルまで顕著にレスキューした (図 5 A)。 U 1 D 2 s g R N A 対もまた、ヘテロ接合細胞における野生型 C E P 2 9 0 m R N A レベルを有意に増加させた (図 5 A)。 3 つの s g R N A 対は全て、ヘテロ接合細胞における突然変異体 C E P 2 9 0 m R N A レベルを有意に低減させた (図 5 B)。 U 1 D 2 および U 1 D 3 s g R N A の対は、 M T 細胞における突然変異体 C E P 2 9 0 m R N A レベルを有意に低減させた (図 5 B)。

#### 【 0 3 3 8 】

s g R N A 対が、突然変異体細胞における野生型 C E P 2 9 0 タンパク質発現をレスキューできることを確認するために、突然変異体細胞に、 s g R N A 対および S p C a s 9 をトランスフェクトさせて、上記のウェスタンプロット分析に供した。対照 s g R N A と比較して、 3 つ全ての s g R N A 対が C E P 2 9 0 タンパク質発現をレスキューした (図 5 C)。

#### 【 0 3 3 9 】

併せると、これらのデータは、上流 / 下流の s g R N A 対、特に U 1 D 3 対が、突然変異体の潜在性エキソンのスプライシングの防止および野生型 C E P 2 9 0 発現の回復において非常に有効であることを証明した。これらの結果は、 C a s 9 とカップリングした一

10

20

30

40

50

対のガイドRNAが、CEP290mRNAに挿入される潜在性エキソンのスプライシングを防止するために、CEP290のc.2991+1655A>G突然変異の両端に位置するイントロン領域を永続的に欠失させることを証明している。

【実施例3】

【0340】

S p C a s 9 存続時間を制限するための自己限定性 C r i s p r - S p C A S 9 システムの開発

方法

プラスミド

A A V パッケージングプラスミド p A A V - m i n C M V - S p C a s 9 - N L S - S 10 V 4 0 p A を、自己限定性 C r i s p r - C a s 9 システムのために構築した。簡単に説明すると、C M V プロモーター由来の最小プロモーター断片 ( m i n C M V プロモーター ) ( 配列番号 5 6 ) を含む DNA 断片を、 G e n e A r t ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) によって合成し、上記の S i g m a p S p C a s 9 プラスミドの M l u I および A p o I 制限部位に挿入して、 p m i n C M V - S p C a s 9 - N L S - B G H p A プラスミドを作製した。次に、 S V 4 0 初期ポリ ( A ) シグナル ( S V 4 0 p A ) ( 配列番号 5 7 ) を含む DNA 断片を、 G e n e A r t ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) によって合成し、上記のプラスミドの X h o I および B b s I 制限部位に挿入して、 p m i n C M V - S p C a s 9 - N L S - S V 4 0 p A プラスミドを作製した。最後に、 m i n C M V - S p C a s 9 - N L S - S V 4 0 p A 断片を、 A A V パッケージング 20 プラスミドにサブクローニングして、 p A A V - m i n C M V - S p C a s 9 - N L S - S V 4 0 p A を作製した。

【0341】

自己限定性 p S p C a s 9 プラスミドを構築するために、 S p C a s 9 ヌクレアーゼの認識配列 ( U 1 および D 3 s g R N A 標的配列プラス対応する P A M モチーフ ; 配列番号 5 8 ~ 5 9 ) を挿入部位 1 ( m i n C M V プロモーターと S p C a s 9 の間 ) および / または挿入部位 2 ( S p C a s 9 核局在化シグナル ( N L S ) と S V 4 0 ポリ ( A ) シグナルの間 ) にサブクローニングした。

【0342】

自己限定性 C r i s p r - C a s 9 システムの第 2 の A A V パッケージングプラスミドは、 p A A V - U 6 - U 1 s g R N A - U 6 - D 3 s g R N A - B G H p A である。このプラスミドを構築するために、 U 6 - U 1 s g R N A - U 6 - D 3 s g R N A 断片を、制限酵素 P c i I および K p n I を使用して p S p C a s 9 ( B B U D ) - U 1 D 3 プラスミドから切り出した後、 A A V パッケージングプラスミドの E c o R V および K p n I 部位にサブクローニングして、 p A A V - U 6 - U 1 s g R N A - U 6 - D 3 s g R N A プラスミドを作製した。 A A V の力価測定目的のために、 B G H p A 断片 ( 配列番号 6 0 ) を、このプラスミドの S p e I および H i n d I I I 部位にクローニングした。

【0343】

結果

C R I S P R - C a s 9 は、強力なゲノム編集ツールであるが、細菌タンパク質である C a s 9 の発現が患者においてどのように忍容されるのかは不明である。 C R I S P R - C a s 9 は、急速 ( 数時間 ~ 数日 ) に作用し、それが細胞に持続的に存在する必要はない。望まれない免疫反応および起こりうる安全性の問題は、外因性のタンパク質が持続的に発現することによって引き起こされる。例えば、外因性のマーカータンパク質である緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) の発現は、かなりの望まれない免疫反応を誘発しうる ( S t r i p e c k e R e t a l . ( 1 9 9 9 ) G e n e T h e r . 6 : 1 3 0 5 ~ 1 3 1 2 頁 )。加えて、最近の報告により、 C R I S P R - C a s 9 の i n v i v o 送達後に、 C a s 9 に対する液性免疫の誘導および C a s 9 特異的細胞免疫反応が存在する可能性があることが示唆された ( W a n g , D . e t a l . ( 2 0 1 5 ) H u m . G e n e 40 50

Ther. 26: 432~442頁)。したがって、Cas9タンパク質に対する曝露を制限する「ヒット&ゴー」アプローチは、CRISPR-Cas9のin vivo送達にとって有益でありうる。そのような「ヒット&ゴー」アプローチはまた、これがCas9と意図されない標的との間の相互作用時間を低減させることから、オフターゲット効果も低減させることができる。

#### 【0344】

この目的のために、本発明者らは、SpCas9の発現の開始後まもなく、ベクターが切斷および破壊されるように、sgRNAの認識部位をSpCas9ベクター自身に組み込むことによってSpCas9の存続時間を制限する自己限定性Crispr-Cas9システムを開発した。自己限定性Crispr-Cas9システムは、2つのベクター、すなわちsgRNA対U1およびD3を発現するpAAV-U6-U1 sgRNA-U6-D3 sgRNAベクターおよびminCMVプロモーター駆動SpCas9を発現するpAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pAベクターを含む。U1および/またはU3 sgRNAの認識配列(標的配列プラス対応するPAMモチーフ)は、第2のベクターにおける2つの挿入部位の1つまたは2つのいずれかに組み込まれる。挿入部位1は、minCMVプロモーターとSpCas9コード配列の間に位置し、挿入部位2は、核局在化シグナル(NLS)とSV40ポリ(A)シグナルの間に位置する(図6A)。したがって、この自己限定性Crispr-Cas9システムにおいて、U1およびD3 sgRNAは、標的化ゲノム欠失および自己限定性SpCas9ベクター自身の切斷の両方に関してSpCas9タンパク質を導き、これによってベクターが過剰なSpCas9タンパク質を生成するのを防止する。

#### 【0345】

自己限定性Crispr-Cas9システムをin vitroで試験するために、突然変異体細胞に、上記の2つのベクターをトランスフェクトした後、上記のように、ウェスタンプロット分析(図6B)、ゲノムDNA PCR(図6C)、およびCEP290 mRNAに関するRT-qPCR分析(図6D & 6E)を実施した。

#### 【0346】

単一のsgRNA認識配列(U1TまたはD3T;配列番号58~59)を自己限定性SpCas9ベクターに挿入すると、SpCas9タンパク質レベルは、sgRNA認識配列を含まない対照のSpCas9ベクターと比較して大きく低減された(図6B)。2つのU1T、2つのD3T、またはD3TとU1Tの組み合わせを、自己限定性SpCas9ベクターに挿入すると、SpCas9タンパク質レベルはほぼ消失した(図6B)。したがって、自己限定性Crispr-Cas9システムは、SpCas9発現を有効に制限することができる。

#### 【0347】

自己限定性Crispr-Cas9システムがなおも、標的化ゲノム欠失を誘導して、LCA10 c. 2991+1655A>G突然変異を除去できることを確認するために、本発明者らは、デュアルベクターをトランスフェクトした突然変異体細胞においてゲノムDNA PCR分析を実施した(図6C)。トランケート型DNAに対応するPCRバンドは、対照のSpCas9ベクタートransfected細胞と、自己限定性SpCas9ベクタートransfected細胞の両方に存在し、SpCas9の存続時間が短いにも関わらず、自己限定性Crispr-Cas9システムが、なおもLCA10イントロン突然変異を除去できることを示唆した。図6Cにおいて観察されたゲノム欠失は、図4Aで見られた欠失ほど強くはなかったことは注目に値する。これは、これらの2つの試験における実験条件が異なるためである可能性がある。第1に本発明者らは、図4Aにおいてオールインワン型ベクターを使用したが、図6Cではデュアルベクターを使用した。第2に、SpCas9発現は、図4AではCMVによって駆動されたが、図6CではminCMVプロモーターによって駆動された。

#### 【0348】

次に、本発明者らは、デュアルベクターをトランスフェクトした突然変異体細胞における

10

20

30

40

50

る野生型および突然変異体 C E P 2 9 0 m R N A レベルを調べた。U 1 D 3 s g R N A 単独（対照）と比較すると、S p C a s 9 ベクターは、突然変異体細胞における野生型 C E P 2 9 0 m R N A レベルを有意にレスキューした（図 6 D）。同様に、いずれかの挿入部位で D 3 s g R N A 認識配列を含む S p C a s 9 ベクターは、野生型 C E P 2 9 0 m R N A レベルを有意に増加させた（図 6 D）。他の自己限定性 S p C a s 9 ベクターも同様に野生型 C E P 2 9 0 m R N A レベルを増加させたが、差は対照と比較して統計学的に有意ではなかった（図 6 D）。加えて、自己限定性 S p C a s 9 ベクターおよび対照 S p C a s 9 ベクターは全て、突然変異体 C E P 2 9 0 m R N A レベルを有意に低減させた（図 6 E）。

## 【 0 3 4 9 】

10

併せると、これらのデータは、自己限定性 C r i s p r - C a s 9 システムが、S p C a s 9 存続時間を制限し、L C A 1 0 c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異を除去し、野生型 C E P 2 9 0 発現をレスキューし、突然変異体 C E P 2 9 0 発現を低減させることができることを証明した。

## 【 実施例 4 】

## 【 0 3 5 0 】

マウス網膜におけるマウス C e p 2 9 0 遺伝子のイントロン領域の標的化欠失方法

## プラスミド

本発明者らは、マウス網膜における標的化ゲノム欠失のためにデュアル A A V システムを使用した。第 1 の A A V を上記のように、A A V パッケージングプラスミド p A A V - m i n C M V - S p C a s 9 - N L S - S V 4 0 p A によって產生した。第 2 の A A V は、A A V パッケージングプラスミド p A A V - U 6 - U 1 1 s g R N A - U 6 - D 1 1 s g R N A - R K - E G F P - B G H p A によって產生した。このプラスミドを構築するために、U 1 1 s g R N A ガイド配列（配列番号 6 1）および D 1 1 s g R N A ガイド配列（配列番号 6 2）を、上記のように p S p C a s 9 ( B B U D ) プラスミドにサブクローニングして、p S p C a s 9 ( B B U D ) - U 1 1 D 1 1 プラスミドを作製した。R K プロモーター - E G F P - B G H p A 断片（配列番号 6 3）を、このプラスミドの K p n I および X h o I 部位に挿入した後、U 6 - U 1 1 s g R N A - U 6 - D 1 1 s g R N A - R K - E G F P - B G H p A カセット全体を、制限酵素 P c i I および P m e I を使用してこのプラスミドから切り出して、上記の A A V パッケージングプラスミドの B a m H I および S p h I 部位にサブクローニングして、最終的なプラスミドを作製した。対照プラスミド p A A V - R K - E G F P - B G H p A も作製した。

20

## 【 0 3 5 1 】

## A A V の產生

組換え A A V ベクターを、既に記述されたように（Xiao, X. et al. (1998) J. Virol. 72: 2224 ~ 2232 頁）、ヒト胎児腎癌 2 9 3 細胞（H E K 2 9 3）のトリプルトランスフェクションによって產生した。簡単に説明すると、A A V パッケージングプラスミド、血清型 2 からの r e p 遺伝子および血清型 5 からのキャブシド遺伝子とを含むプラスミド、ヘルパー・アデノウイルスプラスミド（S tr a t a g e n e）を使用した。ウイルスをトランスフェクションの 7 2 時間後に回収して、A V B セファロースアフィニティクロマトグラフィー（G E H e a l t h c a r e）によって精製した。A A V ベクターのゲノムコピー（G C）力値を、既に記述された（Gerits, A. et al. (2015) Neurophotonics. 2: 031209）T a q M a n ベースの定量的 P C R 分析（A p p l i e d B i o s y s t e m s）によって決定した。

30

## 【 0 3 5 2 】

## 動物

8 ~ 1 0 週齢の雌性 C 5 7 B L / 6 J マウスを J a c k s o n L a b o r a t o r i e s ( B a r H a r b o r , M E ) から購入して、S a n o f i の動物飼育施設で維持

40

50

した。試験期間中、動物に飼料および水を自由に与えた。動物技法は全て、実験動物福祉部門 (the Office of Laboratory Animal Welfare) の動物保護法、実験動物の飼育および使用に関するガイド (the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) を遵守して、ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従って実施した。

### 【0353】

#### 網膜下AAV注射

マウスを、鼻の円錐形部 (nose cone) から動物に送達した酸素 800 ml / 分中の 3.5 % イソフルランを使用して鎮静化した。散瞳および毛様体筋麻痺を、トロピカミド (Alcon, Fort Worth, TX) の局所適用によってマウスに誘導した。角膜に予備切開を行い、33ゲージの鈍端の針を、切開部を通過するように導き、虹彩と水晶体囊の間の後方に、先端が後部網膜神経感覚上皮を貫通するまで進めた。AAV5 - min CMV - SpCas9 - NLS - SV40 pA (図7AのAAV5 - SpCas9) の  $1 \times 10^9$  個のウイルスゲノム粒子を、AAV5 - U6 - U11 sgRNA - U6 - D11 sgRNA - RK - EGFP - BGH pA (図7AのAAV5 - U11D11 - RK - EGFP) または対照AAV5 - U6 - RK - EGFP - BGH pA (図7BのAAV5 - RK - EGFP) の  $1 \times 10^9$  個のウイルスゲノム粒子と共に、各マウスのOS眼に、1マイクロリットルの体積で1秒間かけて送達した。針を、引き抜くまでおよそ5秒間その位置に保持した。動物を麻酔から回復させた後、ケージに戻した。

### 【0354】

網膜におけるEGFP発現を、注射の2および4週間後にMicron IV Retinal Microscope (Phoenix Research Labs) を使用して生きている動物において評価して、EGFP発現を欠如するマウスを試験から除外した。動物は全て注射の4週間後に安楽死させた。

### 【0355】

#### 網膜の解剖

マウスの眼の眼球を摘出してリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に入れた。網膜を、解剖顕微鏡下で微小解剖用ハサミによって単離した。網膜色素上皮 (RPE) 層を注意深く切除した。

### 【0356】

#### ゲノムDNA発現およびPCR分析

網膜をQuick Extract DNA抽出溶液 (Epicentre) 中で、コードレスモーター (VWR) を動力源とする乳棒によってホモジナイズした。ゲノムDNAを、製造元の説明書 (Epicentre) に従って抽出し、10ナノグラム/マイクロリットルに希釈した後、GoTaq Hot Start Greenマスター-ミックス (Promega) および欠失領域の両端に位置するPCRプライマー (配列番号64~65) によって増幅した。PCR産物の増幅は以下のサイクリングパラメータによって得られた: 95 °C で2分間を1サイクル; 95 °C で30秒間、62 °C で30秒間、および72 °C で2分間を35サイクル; 72 °C で12分間を1サイクル。次に、PCR産物を、アガロースゲル電気泳動に供した。

### 【0357】

#### 結果

LCA10の細胞モデルにおける本発明者らの研究は、in vitroでLCA10 c. 2991 + 1655 A > G 突然変異を除去するための本発明者らのsgRNA対およびSpCas9アプローチの有効性を裏付けた。次に、本発明者らは、in vivoの状況で本発明者らのCRISPR-Cas9アプローチを評価した。現在、LCA10 イントロンスプライス突然変異によって引き起こされた潜在性エキソンを発現する動物モデルはないことから、本発明者らは、SpCas9と共にsgRNA対が、c. 2991

+ 1 6 5 5 A > G 突然変異が位置する場所でヒト C E P 2 9 0 遺伝子のイントロン 2 6 に  
対して相同であるマウス C e p 2 9 0 遺伝子のイントロン 2 5 における標的化ゲノム欠失  
を誘導できるか否かを試験した。

【 0 3 5 8 】

本発明者らは、ある特定の細胞型への優先的な感染を可能にする、その低い免疫原性および血清型の範囲のために、in vivo 遺伝子送達のために A A V ベクターを使用することに決定した。C E P 2 9 0 突然変異によって最も影響を受ける網膜細胞は、光受容体であり、これまでの研究により、A A V 血清型 5 ( A A V 5 ) が網膜下注射によって光受容体を効率的に形質導入できることが示されている ( Boye, S. E. et al. ( 2 0 1 2 ) Hum. Gene Ther. 2 3 : 1 1 0 1 ~ 1 1 1 5 頁 )。したがって、本発明者らは、S p C a s 9 と s g R N A 対とを光受容体に送達するために A A V 5 を使用することを決定した。

【 0 3 5 9 】

A A V ベクター ( 約 4 . 8 k b ) の低いパッケージング能力、および 4 . 1 k b と測定される ( アミノ酸配列に関しては配列番号 4 0 を参照されたい ) S p C a s 9 コード配列の長さのために、1 つの S p C a s 9 構成要素と 2 つの U 6 - s g R N A 構成要素とを単一の A A V ベクターにパッケージングすることは難題である。したがって、本発明者らは、本発明者らの in vivo バリデーション試験のためにデュアル A A V システムを使用した ( 図 7 A )。第 1 の A A V ベクターは、A A V 5 - U 1 1 D 1 1 - R K - E G F P であり、これは上流の s g R N A U 1 1 1 ( 配列番号 6 1 ) および下流の s g R N A D 1 1 ( 配列番号 6 2 ) ならびにロドシンキナーゼ ( R K ) プロモーター駆動 E G F P リポーター遺伝子を発現する。U 1 1 および D 1 1 s g R N A 対は、マウス C e p 2 9 0 遺伝子のイントロン 2 5 における 5 5 7 b p のゲノム欠失を生成すると予想される。対照 A A V である A A V 5 - R K - E G F P も同様に産生した。第 2 の A A V ベクターは、A A V 5 - S p C a s 9 であり、これは m i n C M V プロモーター駆動 S p C a s 9 を発現する。

【 0 3 6 0 】

A A V 5 - U 1 1 D 1 1 - R K - E G F P ( または A A V 5 - R K - E G F P ) および A A V 5 - S p C a s 9 ( 各 1 × 1 0 9 個のウイルスゲノム粒子 ) を成体の C 5 7 B L / 6 J マウスの網膜下腔に同時注射した。網膜における E G F P 発現を、生きている動物において評価して、E G F P 発現を欠如するマウスを試験から除外した。注射の 4 週間後、動物を安樂死させ、ゲノム D N A を網膜から抽出した後、欠失領域の両端に位置するプライマー ( 配列番号 6 4 ~ 6 5 ) を使用して P C R 分析を行った。野生型およびトランケート型ゲノム断片をゲル電気泳動によって分離した。A A V 5 - U 1 1 D 1 1 - R K - E G F P および A A V 5 - S p C a s 9 を注射した動物に関して、U 1 1 および D 1 1 s g R N A 対による予想されるゲノム欠失の存在を示す P C R 産物が検出され、これは A A V 5 - R K - E G F P および A A V 5 - S p C a s 9 を注射した動物には存在しなかった ( 図 7 B )。これらの結果は、本発明者らのデュアル A A V システムが in vivo で標的化ゲノム欠失を誘導できることを証明した。

【 実施例 5 】

【 0 3 6 1 】

L C A 1 0 c . 2 9 9 1 + 1 6 5 5 A > G 突然変異を除去するための上流 / 下流の s g R N A 対および S a C a s 9 の使用

方法

プラスミド

S a C a s 9 プラスミドを構築するために、m i n C M V - S a C a s 9 - N L S - F L A G - B G H p A - U 6 - B s a I : B s a I - s g R N A スキヤホールド断片 ( 配列番号 6 6 ) を G e n S c r i p t において合成し、S i g m a p S p C a s 9 プラスミドの P c i I および B b s I 制限部位にサブクローニングして、C M V - S p C a s 9 - B G H p A カセットを交換し、p m i n C M V - S a C a s 9 - B G H p A - U 6

10

20

30

40

50

プラスミドを作製した。5個のsgRNAガイド配列(aU1、aU2、aU3、aD1、aD2；配列番号45～49)を、Benchlingのオンラインゲノム編集設計ツールを使用して同定した後、上記のプラスミドの2つのBsaI制限部位にサブクローニングした。上流のsgRNA(aU1、aU2、aU3)と下流のsgRNA(aD1、aD2)を対にするために、U6-aD1 sgRNAカセットおよびU6-aD2 sgRNAカセットを、制限酵素KpnIおよびNotIを使用してそのプラスミドから切り出した後、aU1、aU2、またはaU3 sgRNAを発現するプラスミドのNotI部位にサブクローニングした。その結果、本発明者らは、異なる6つのsgRNA対(aU1aD1、aU1aD2、aU2aD1、aU2aD2、aU4aD1、aU4aD2)を発現する6つのプラスミドを作製した。最後に、これらの6つのプラスミドにおけるminCMV-SaCas9-BGH pA-U6-sgRNA対断片を、AAVパッケージングプラスミドにサブクローニングして、pAAV-minCMV-SaCas9-BGH pA-U6-sgRNA対プラスミドを作製した。sgRNAを発現しない対照プラスミドpAAV-minCMV-SaCas9-BGH pAも作製した。

### 【0362】

#### 結果

上記の試験から、本発明者らは、上流／下流のsgRNAの対が、効率的にSpCas9を導き、LCA10c.2991+1655A>G突然変異を除去して野生型CEP390発現を回復することができることを証明した。SpCas9コード配列の長さ(約4.1kb)により、1つのminCMV-SpCas9構成要素と2つのU6-sgRNA構成要素とを単一のAAVベクターにパッケージングすることが難しくなる。Ranら(Ran, F. A. et al. (2015) Nature 520: 186～191頁)は、最近、哺乳動物細胞においても切断活性を示す、より短いCas9酵素である黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)Cas9(SaCas9；1053アミノ酸；配列番号55)を発見した。SaCas9のサイズがより小さいことにより、1つのminCMV-SaCas9構成要素と2つのU6-sgRNA構成要素とを単一のAAVベクターにパッケージングすることができる。sgRNA対およびSaCas9はまた、LCA10イントロン突然変異を除去することができるか否かを試験するために、本発明者らは、SaCas9に対して特異的な3つの上流のsgRNAガイド配列(aU1、aU2、aU3；配列番号45～47)および2つの下流のsgRNAガイド配列(aD1、aD2；配列番号48～49)を、Benchlingのオンラインゲノム編集設計ツールを使用して設計した。上流／下流のsgRNAを対にして、AAVパッケージングプラスミドにサブクローニングした。同じプラスミドも、minCMVプロモーター駆動およびヒトコードン最適化SaCas9(配列番号66)を発現した。

### 【0363】

sgRNA対-SaCas9プラスミドを、上記のように突然変異細胞にトランスフェクトした。SaCas9をSpCas9と比較するため、突然変異細胞にも、デュアルSpCas9-AAVプラスミド(pAAV-minCMV-SpCas9+AAV-U1D3 sgRNA対)、または個々のプラスミド単独をトランスフェクトした。欠失領域の両端に位置するプライマー(配列番号4～5)を使用して、PCR分析を実施した。野生型およびトランケート型ゲノム断片をゲル電気泳動によって分離した。試験した全ての上流／下流のsgRNA対に関して、予想されるゲノム欠失の存在を示すが、対照プラスミドトランスフェクト細胞には存在しないPCR産物が検出された(図8A)。これらの結果は、SaCas9およびSpCas9の両方が、LCA10イントロンスプライス突然変異を除去するためにsgRNA対と共に作用できることを証明した。

### 【0364】

次に、本発明者らは、上記のAAVパッケージングプラスミドをトランスフェクトした突然変異細胞における野生型および突然変異型CEP290 mRNAレベルを調べた。意外にも、上流／下流のsgRNA対のいずれも、SaCas9単独のプラスミドと比較して野生型CEP290 mRNAレベルを有意に増加させなかつたが、aU2aD1

10

20

30

40

50

対および a U 2 D 2 対は増加傾向を示した(図 8 B)。これに対し、S p C a s 9 のデュアル A A V プラスミドは、個々のプラスミドと比較して野生型 C E P 2 9 0 m R N A レベルを有意にレスキューした(図 8 B)。s g R N A 対 - S a C a s 9 プラスミドは全て、S a C a s 9 単独プラスミドと比較して突然変異体 C E P 2 9 0 m R N A レベルを有意に低減させた(図 8 C)。同様に、S p C a s 9 のデュアル A A V プラスミドは、個々のプラスミドと比較して突然変異体 C E P 2 9 0 m R N A レベルを有意に低減させた(図 8 C)。本研究において、S a C a s 9 は、突然変異体細胞における野生型 C E P 2 9 0 m R N A レベルのレスキューに関して S p C a s 9 ほど有効ではないが、本発明者らは、強力な s g R N A 対が、S a C a s 9 を導いて、突然変異体細胞において L C A 1 0 イントロンスプライス突然変異を有效地に除去する、および野生型 C E P 2 9 0 m R N A レベルを有意にレスキューする可能性を除外することはできない。 10

## 【 0 3 6 5 】

## 配列

核酸配列は全て、特に明記していなければ 5' から 3' で表す。

アミノ酸配列は全て、特に明記していなければ N 末端から C 末端で表す。

相同性組換え修復 (H D R) に使用した s g R N A のトップ鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 1)

c a c c g A A G A C A C T G C C A A T A G G G A T

相同性組換え修復 (H D R) に使用した s g R N A のボトム鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 2)

a a a c A T C C C T A T T G G C A G T G T C T T c

H D R 鑄型 (配列番号 3)

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

C E P 2 9 0 イントロン 2 6 F 核酸プライマー (配列番号 4)

G G T C C C T G G C T T T T G T T C C T

C E P 2 9 0 イントロン 2 6 R 核酸プライマー (配列番号 5)

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

C E P 2 9 0 イントロン 2 6 シークエンシングプライマー (配列番号 6)

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

野生型 C E P 2 9 0 F 核酸プライマー (配列番号 7)

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

野生型 C E P 2 9 0 R 核酸プライマー (配列番号 8)

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

突然変異体 C E P 2 9 0 F 核酸プライマー (配列番号 9)

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

野生型 C E P 2 9 0 R 核酸プライマー (配列番号 10)

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

U 1 s g R N A のトップ鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 11)

c a c c G G C G G G T G G A T C A C G A G T T C

U 1 s g R N A のボトム鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 12)

a a a c G A A C T C G T G A T C C A C C C G C C

D 1 s g R N A のトップ鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 13)

c a c c g A A A G C T A C C G G T T A C C T G A A

D 1 s g R N A のボトム鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 14)

a a a c T T C A G G T A A C C G G T A G C T T T c

D 2 s g R N A のトップ鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 15)

c a c c g T C A T T C T T G T G G C A G T A A G G

20

30

40

50



## 【化2】

TGCATCTTACATAGTTTGACATAGTACATATTATACATCAAATTATGTGTTAACATATCTGT  
 CTCCTTAATGGAATATAAGCTTTGATATAAGGAACATATTAATTGTTCTGTGTTGAGTATCTCCCTG  
 TTTGGCACAGAGTCAAGCTAATACATGAGAGTGATTAGTGGTGGAGAGCACAGTGCATGTGGTGTCAAATA  
 TGGTGCCTAGGAAATTATTGTGCTTTGAGAGGAAAGGTTATGAGACTAGAGGTCAGAAAATCAGATT  
 TCATGEGTGAAGAATGGAATAGATAATAAGGAAATACAAAACGGATGGTAATAAGCAAAAGAAAAACTT  
 GAAATTGATAGTAGAAGAAGAAAATAGATGTAGATTGAGGTAGAATCAAGAAGAGGATCTTTTGT  
 TGTTTTTTGAAACAGAGTCTCACTGTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGAGTGTATCTGGCTACTG  
 CAACCTCTGCCCTCCAGGTTCAAGCGATTCTCTGCTCAGTCCTCCGAGTAGCTGGAATTACAGGTGCCAC  
 CAGCACGGCCGGCTAATTAGAGACAGGGTTGCCATGTTGGCCGGCTGGCTCAAACCTTGGATCTC  
 AGGTAATCCGCCAGCCTCAACTTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCCACTGTGCCAGCCTGTTT  
 TTTTTTAAAGGAGACAGTGAAGTTCAAGGAGGGAAAGAAAATTAGAGTTACTAGGGAGAGAGTGT  
 GAAGATAAGAGATGAAAGTGTAAAGGAAATACGCAAATATCAGGGTAGGTGGGAGAAAAGAGATTG  
 AACAAACAATAGGATTATCTGTGAAAAGGATGAAAGGAAGAAAAAAATGGATAGAAAGATATTAAACAC  
 CCTCAGCCTCCTGTTCCCTCTGTATTCACTATATAAAACTATAATTATGTACTTTACTIAAAAAT  
 ATATTATTATTACCTTATCGTGTATTAAATCATAGCATGTCCTCTTTAGTCTCATTACCTGTTGTAT  
 TATTCTCATAACACTTAATACCTGACATTGTATTATATGGCTTATTTCAGGTACTCCACTCAAATAT  
 AAGTTCTAGGATATAATTATTACTGAAATCCATTGCTTAGAGTACCTGGCATGTTAGTAAATAGGCATT  
 CTGTTTTCAAAATAAAAAATAGGAACTTAAGATATATAATTATGTATTATGCCAGCCTTTCCTCACA  
 GCTCTATTCTGTGTACAGAATTACCTACTTACAATTCTGTGTCAAGGGGATCTCAAATTAAACGTGTC  
 CACAATGAACTCCGATTCTCTCCTAGTCATTCTTCAATATATGTTAGTACCTAACCAACCAGC  
 TAGTCAAGGCAGATACTTAAAGTTATTCTGTAGTCATTCTTCTCCCTACCATTTTGTTCAGGAAATGTA  
 TTTATGTGTCCTCTTCATCCCTCGCAGCTCTAACCTTGTCCAACCCAGCATCATCACTCTGGAGTCC  
 ACAATGCTTTCTGGCTAGTTCCCTGATTCTCTATTGACCCCTTATTCTCACAGTGCAGCCAGAATGAT  
 TGTTAAAACCTCTCTTAAATCTTAAATTGTTCTTTTACGTTAAGTAAATTCCAGTCTCTTGTC  
 TTGGCATGCCATGCCCTGCCCTGGTGTGGCCCCCTGATGGCTCTCCAACCTCATGTTTACTACTATTGACTCT  
 TATTTTGCTTACTCTGCTGGGTGCTCCAGTCCTCAAATCATTCCTGCTCCAATCATTCATATT  
 TCCTCTCAGATCTTATAGTATTCAAATGCTTCTCTTGGAGCATCTGGGTTACTAATAAAACTTCGT  
 ACCTCACAGTCACTTAAATATCAATTATTGGGGTAAAGACATCCTCAACCGCCTAICIAATAAATGTC  
 TTTCTTATTATCAGGCTCAGTACTCTGTTTTTCTTCTAAATGTCACCTTTTTTGTGAGTCA  
 GGGTCTCAGTGTGCCAGGCTCGAGTGCAGTTGCAACATCATAGCTCATGCACTGCCAGCTGGCTCTGGGATC  
 AAGTAATTCTCCCACCTCAGCCTCCAAAATAGCTGGGATTACAGGTATGCATCACCATGCTCAGCTA  
 TGTTTTTTGAGAGATGAGGCTCAGTTGTCAGGCTGGGTTACAGGTGTGAGCCACTGCACCTGGCTGATCT  
 TCCCACCTCAGGCCCTCCAAAAGTGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACCGTAATCGGCCAACAT  
 TTTTTTGAGATGGAGTTTGCTCTGCTCTGCTCAGTCTCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCAAGTGCAC  
 CCACCTCCCAGGTAAAGGGATTCTCTGCTCAGTCTCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCAAGTGCAC  
 GACTGGCTAAATTGAGACTTTGTTGTTACTTGCTTATTATCTGCTGCCTTCCACACTCTGGGAAATCT  
 TGACATTAGTAGACTTTGTTGTTACTTGCTTATTATCTGCTGCCTTCCACACTCTGGGAAATCT  
 GCCACCCACCCACACACATAGGCACTGAATGGCAGAACTCTGAAGGCCAGAATTATATAATTCTTAC  
 TGTAACACATCATCTGTCACTGATGGCACACTAGGAATGCTCAGCAACTGTGTGCATGAAGGAAGTAAGC  
 TAGTTTGAGGCTGCAAACACTCTGAGTATTCTAAGAGTTTGCCAAATGAATGTACAGCTTGTGGC  
 AGAAGCTAATACTCAGAAATTGAGGCCGTATATTGATAACACAGGATTGGATGATTATTTAAAATA  
 TTTACATTGTATATGT  
 TGTATGTGTATTAGTCCGTTCTCATGCTGCTATGAAGAAATACCTGAGACTGGTAATTATAAAGGAAAGAG  
 GTTTAATTGACTCACAGTCCACAGAGCTGGGAGGCCTCAGAAAACCTAACAGTTATGGCAGAAGGGGAAAGC  
 AAACACATTCTTCATGGTGGCCGGAATTAGAAGAATGTGAGCCAGCAAAGGGGAAAGCCCTATAA  
 AACCATCAGACATCGTGAGAACTTACTATTATGAGAAATAGCGTGGGGAAACCACCCCCACGATTCAATTAC  
 TCCCACCAAATCCCTCCCATGACATATGAGGATTAGGAACTATGATTCAAGATGAGATTGGTAGGGACA  
 CAGCCAAACCATATCAGTATGTATATGATAAGTATTATATATATGTATGTGTTGTAAGCATA  
 ATTATATATGGAGGAAATTCTAATTGTTAAAGGAGATGTTATATAAAGGTA  
 AGACAATGTCATTGTTGTTGCTGAATTACAATGTTAGTTCTTACTGATATTCTTATTTCAG  
 40

## 突然変異 ITR 配列 (配列番号 24)

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

## t r a c r 配列 (配列番号 25)

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

## NLS 配列

P K K K R K V (配列番号 26)

P K K K R K V E D P K K K R K V D (配列番号 27)

B b s I 制限部位突然変異のフォワード核酸プライマー (配列番号 28)

10

20

30

40

50

GGGAGGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTG

BbsI制限部位突然変異のリバース核酸プライマー（配列番号29）

CAGCATTGCCTGCTATTCTCTTCCCCAATCCTCCC

U6プロモーター配列を下線で示す、pSpCas9(BB)を構築するためのU6プロモーター-BbsI: BbsI-sgRNAスキヤホールド-U6ターミネーター-カセット（配列番号30）

CACATGTGAGGGCCTATTCCCCATGATTCCCTTCATATTTG  
CATATACGATAACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATT  
ATTTGACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAAATACGTG  
ACGTAGAAAGTAATAATTCTTGGGTAGTTGCAGTTTA 10  
AAATTATGTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAA  
CTTGAAGTATTGATTTGGCTTGGCTTATATATCTTGTG  
GAAAGGACGAAACACCGGGCTTCGAGAAGACCTGTTTA  
GAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT  
CAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTGT  
TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTT  
TTTAGCGCGTGCGCCATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGA  
GGTACCC

PPIA F核酸プライマー（配列番号31）

TTCATCTGCAC TGCC AAGAC

20

PPIA R核酸プライマー（配列番号32）

TCGAGTTGTCCACAGTCAGC

U6プロモーターおよびCMVプロモーター配列を下線で示す、pSpCas9(BBU)を構築するためのU6プロモーター-BbsI: BbsI-sgRNAスキヤホールド-U6ターミネーター-CMVプロモーター（配列番号33）

CTCACATGTGAGGGCCTATTCCCCATGATTCCCTTCATATT  
TGCATATACGATAACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAAT  
TAATTGACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAAATACG  
TGACGTAGAAAGTAATAATTCTTGGGTAGTTGCAGTTT  
TAAAATTATGTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCGT 30  
AACTTGAAAGTATTGATTTGGCTTGGCTTATATATCTTG  
TGGAAAGGACGAAACACCGGGCTTCGAGAAGACCTGTT  
TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTT  
ATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTGT  
TTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCG  
TTTTAGCGCGTGCGCCATTCTGCAGACAAATGGCTCTA  
GAGACCGGGCGCCGCTACAGGGCTTCCACCGGTGGTCTTT  
CTAGAGGTACCCGTTACATCTAGTTATTAAATAGTAATCAA

TTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCCATATATGGAGTTCCG  
CGTTACATAACTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCG  
CCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCATAATGACGTATG  
TTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC  
ATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTA  
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACG  
TCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTA  
CATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTAC  
GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTGGC  
AGTACATCAATGGCGGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGG  
ATTTCCAAGTCTCCACCCCCATTGACGTCATAATGGGAGTTG  
TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAAATGTCGTA 40  
50

ACAAACTCCGCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGT  
 ACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAAGT  
 AGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAAATACGA  
 CTCACATAGGGAGAACCAAGCTGGCTAGCCGC

pSpCas9 (BBB) を構築するためのフォワード核酸プライマー (配列番号 34)  
 ATAACATGTTGCTCACTCTAGAGGCATGTTGAGGGCTAT  
 TTCCC

pSpCas9 (BBB) を構築するためのリバース核酸プライマー (配列番号 35)  
 TATGGTACCGGTCTCATAGAGCCATTGTTGCTGAGA

対照 1 sgRNA のトップ鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 36) 10  
 caccGCACCTACCAAGAGCTAACTCA

対照 1 sgRNA のボトム鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 37)  
 aaacTGAGTTAGCTCTGGTAGTGC

対照 2 sgRNA のトップ鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 38)  
 caccggTGCAGAATACGCCACGCGAT

対照 2 sgRNA のボトム鎖オリゴヌクレオチド (配列番号 39)  
 aaacATCGCGTGGCGTATTGCAC

化膿連鎖球菌 Cas9 アミノ酸配列 (配列番号 40)

MDKKYSIGLDIGTN SVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGN TDR  
 HSIKKNLIGALLFD SGETAEATRLKRTARRRYTRRKKNR I C 20  
 YLQEIFSNEMAKVDDSF FHRL EESFLVEEDKKHERHPIFG  
 NIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH  
 MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLFEENP  
 INASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGN  
 LIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDLDNLLA  
 QIGDQYADLFLAAKNLSDA ILLSDILRVNTEITKAPLSAS  
 MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQS KNGYA  
 GYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLR 30  
 KQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPPFLKDNREKI  
 EKILTFRIPIYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWN FEE  
 VVDKGASAQS FIERMTNF DKNLPNEKVLPKHSLLY EYFTV  
 YNELT KVKVYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLF KTNRKVT  
 VKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV EDRFNASLGTYHDLLKI  
 IKDKDFLDNEENEDILEDIVLT LTLFEDREMI EERLKTYA  
 HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGR LSRK LINGIRDKQSGKTIL  
 DFLKSDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL  
 HEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIV  
 IEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG I KELGSQILKEHP  
 VENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDH  
 IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMK 40  
 NYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ  
 LVE TRQITKHVAQI L DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS  
 KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKK  
 YPKLESEFVYGDYK VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYS  
 NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI VWDKGRDF  
 ATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQ TGGFSKESI L PKRNSDKLI  
 ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSV  
 KELLGITIMERSSFEKNP IDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK  
 YSLFEL ENGRKRM LASAGELQKGNEALPSKYVNFLYLAS  
 HYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIIEQI SEFSKRV 50

I L A D A N L D K V L S A Y N K H R D K P I R E Q A E N I I H L F T L T N L G A  
P A A F K Y F D T T I D R K R Y T S T K E V L D A T L I H Q S I T G L Y E T R I  
D L S Q L G G D

U 1 sgRNAガイド／プロトスペーサー配列（配列番号41）

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

D 1 sgRNAガイド／プロトスペーサー配列（配列番号42）

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

D 2 sgRNAガイド／プロトスペーサー配列（配列番号43）

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

D 3 sgRNAガイド／プロトスペーサー配列（配列番号44）

10

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

a U 1 sgRNAガイド／プロトスペーサー配列（配列番号45）

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

a U 2 sgRNAガイド／プロトスペーサー配列（配列番号46）

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

a U 3 sgRNAガイド／プロトスペーサー配列（配列番号47）

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

a D 1 sgRNAガイド／プロトスペーサー配列（配列番号48）

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

a D 2 sgRNAガイド／プロトスペーサー配列（配列番号49）

20

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

a U 1 sgRNA配列（配列番号50）

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

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

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

a U 2 sgRNA配列（配列番号51）

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

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

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

a U 3 sgRNA配列（配列番号52）

30

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

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

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

a D 1 sgRNA配列（配列番号53）

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

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

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

a D 2 sgRNA配列（配列番号54）

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

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

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

黄色ブドウ球菌Cas9アミノ酸配列（配列番号55）

M K R N Y I L G L D I G I T S V G Y G I I D Y E T R D V I D A G V R L F K E A N

V E N N E G R R S K R G A R R L K R R R R H R I Q R V K K L L F D Y N L L T D H

S E L S G I N P Y E A R V K G L S Q K L S E E E F S A A L L H L A K R R G V H N

V N E V E E D T G N E L S T K E Q I S R N S K A L E E K Y V A E L Q L E R L K K

D G E V R G S I N R F K T S D Y V K E A K Q L L K V Q K A Y H Q L D Q S F I D T

Y I D L L E T R R T Y Y E G P G E G S P F G W K D I K E W Y E M L M G H C T Y F

P E E L R S V K Y A Y N A D L Y N A L N D L N N L V I T R D E N E K L E Y Y E K

F Q I I E N V F K Q K K P T L K Q I A K E I L V N E E D I K G Y R V T S T G K

40

P E F T N L K V Y H D I K D I T A R K E I I E N A E L L D Q I A K I L T I Y Q S  
 S E D I Q E E L T N L N S E L T Q E E I E Q I S N L K G Y T G T H N L S L K A I  
 N L I L D E L W H T N D N Q I A I F N R L K L V P K K V D L S Q Q K E I P T T L  
 V D D F I L S P V V K R S F I Q S I K V I N A I I K K Y G L P N D I I I E L A R  
 E K N S K D A Q K M I N E M Q K R N R Q T N E R I E E I I R T T G K E N A K Y L  
 I E K I K L H D M Q E G K C L Y S L E A I P L E D L L N N P F N Y E V D H I I P  
 R S V S F D N S F N N K V L V K Q E E N S K K G N R T P F Q Y L S S S D S K I S  
 Y E T F K K H I L N L A K G K G R I S K T K K E Y L L E E R D I N R F S V Q K D  
 F I N R N L V D T R Y A T R G L M N L L R S Y F R V N N L D V K V K S I N G G F  
 T S F L R R K W K F K K E R N K G Y K H A E D A L I I A N A D F I F K E W K K 10  
 L D K A K K V M E N Q M F E E K Q A E S M P E I E T E Q E Y K E I F I T P H Q I  
 K H I K D F K D Y K Y S H R V D K K P N R E L I N D T L Y S T R K D D K G N T L  
 I V N N L N G L Y D K D N D K L K K L I N K S P E K L L M Y H H D P Q T Y Q K L  
 K L I M E Q Y G D E K N P L Y K Y Y E E T G N Y L T K Y S K K D N G P V I K K I  
 K Y Y G N K L N A H L D I T D D Y P N S R N K V V K L S L K P Y R F D V Y L D N  
 G V Y K F V T V K N L D V I K K E N Y Y E V N S K C Y E E A K K L K K I S N Q A  
 E F I A S F Y N N D L I K I N G E L Y R V I G V N N D L L N R I E V N M I D I T  
 Y R E Y L E N M N D K R P P R I I K T I A S K T Q S I K K Y S T D I L G N L Y E  
 V K S K K H P Q I I K K G

min CMVプロモーターを下線で示す、pAAV-min CMV-SpCas9-NL 20  
 S-SV40 pAを構築するためのmin CMVプロモーター-SpCas9配列(配列番号56)

T A T A C G C G T G T T G A C A C T A G T T C G C G A A A T A T T G A C T C A C  
G G G G A T T T C C A A G T C T C C A C C C C A T T G A C G T C A A T G G G A G  
 T T T G T T T G G C A C C A A A T C A A C G G G A C T T T C C A A A A T G T  
C G T A A C A A C T C C G C C C C A T T G A C G C A A A T G G G C G G T A G G C  
G T G T A C G G T G G G A G G T C T A T A A G C A G A G G C T C G T T A G T  
G A A C C G T C A G A T C G C C G C C A C C A T G G A C A A G A A G T A C A G C  
 A T C G G C C T G G A C A T C G G C A C C A A C T C T G T G G G C T G G G C C G  
 T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G G T G C C C A G C A A G A A A T T C A A 30  
 G

SV40初期ポリ(A)シグナルを下線で示す、pAAV-min CMV-SpCas9- NLS-SV40 pAを構築するためのSV40 pA配列(配列番号57)

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

U1 sgRNA認識配列(U1T; U1 sgRNAガイド配列+PAM)(配列番号58) 40

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

D3 sgRNA認識配列(D3T; D3 sgRNAガイド配列+PAM)(配列番号59)

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

BGH pAを下線で示す、BGH pA含有断片(配列番号60)

C T A G T G G C G G C C G C T C G A G C A T G C A T C T A G A G G G C C C T A T  
 T C T A T A G T G T C A C C T A A A T G C T A G A G G C T C G C T G A T C A G C C  
T C G A C T G T G C C T T C T A G T T G C C A G C C A T C T G T T G T T G C C  
C C T C C C C C G T G C C T T C C T T G A C C C T G G A A G G T G C C A C T C C  
C A C T G T C C T T C C T A A T A A A T G A G G A A A T T G C A T C G C A T 50

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

U 1 1 s g R N A ガイド / プロトスペーサー配列 ( 配列番号 6 1 )

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

D 1 1 s g R N A ガイド / プロトスペーサー配列 ( 配列番号 6 2 )

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

R K プロモーター - キメライントロン - E G F P - B G H p A 断片 ( 配列番号 6 3 )

G G G C C C C A G A A G C C T G G T G G T T G T T G T C C T T C T C A G G G G 10

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

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

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

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

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

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

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

G T G C C C C G C T C C G C C G C C T C G C G C C G C C C G C C C C G G C

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

C G G C C C T T C C T C C G G G C T G T A A T T A G C G C T T G G T T T A A 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C C G G C T T C G G G T G C G G G G C T C C G T A C G G G G C G T G G C G C G G G 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A C G G C T G C C T T C G G G G G G A C G G G G C A G G G G C G G G G G T T C G G 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

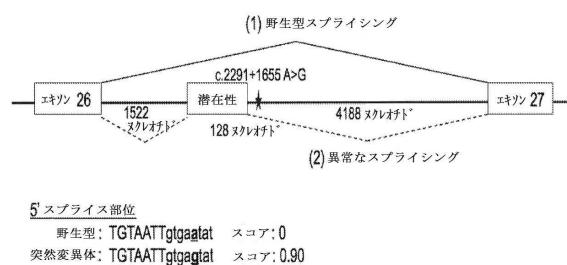
C T A C G G C G T G C A G T G C T T C A G C C G C T A C C C C G A C C A C A T G 50

A A G C A G C A C G A C T T C T T C A A G T C C G C C A T G C C C G A A G G C T  
 A C G T C C A G G G A G C G C A C C A T C T T C T T C A A G G A C G A C G G C A A  
 C T A C A A G A C C C G C G C C G A G G T G A A G T T C G A G G G C G A C A C C  
 C T G G T G A A C C G C A T C G A G C T G A A G G G C A T C G A C T T C A A G G  
 A G G A C G G C A A C A T C C T G G G G C A C A A G C T G G A G T A C A A C T A  
 C A A C A G G C C A C A A C G T C T A T A T C A T G G C C G A C A A G C A G A A G  
 A A C G G G C A T C A A G G T G A A C T T C A A G A T C C G C C A C A A C A T C G  
 A G G A C G G G C A G C G T G C A G C T C G C C G A C C A C T A C C A G C A G A A  
 C A C C C C C A T C G G C G A C G G C C C G T G C T G C T G C C C G A C A A C  
 C A C T A C C T G A G C A C C C A G T C C G C C C T G A G C A A A G A C C C C A 10  
 A C G A G A A G C G C G A T C A C A T G G T C C T G C T G G A G T T C G T G A C  
 C G C C G C C G G G A T C A C T C T C G G C A T G G A C G A G C T G T A C A A G  
 T A A A G C G G C C A A A T C G T A C G C C T A G G T G A T C A A G A T C T G C  
 T A G C T T A A T T A A C C C G G G A C T A G T G G C G G C C G C T C G A G C A  
 T G C A T C T A G A G G G C C C T A T T C T A T A G T G T C A C C T A A A T G C  
 T A G A G C T C G C T G A T C A G C C T C G A C T T G T G C C T T C T A G T T G C  
 C A G C C A T C T G T T G T T G C C C C T C C C C C G T G C C T T C T T G A  
 C C C T G G A A G G T G C C A C T C C C A C T G T C C T T C C T A A T A A A A  
 T G A G G A A A T T G C A T C G C A T T G T C T G A G T A G G T G T C A T T C T  
 A T T C T G G G G G G T G G G G T G G G G C A G G A C A G C A A G G G G G A G G 20  
 A T T G G G A A G A C A A T A G C A G G C A T G C T G G G G A  
 マウス C e p 2 9 0 イントロン 2 5 F 核酸プライマー (配列番号 6 4 )  
 C C C C T C G C C T G T A C T G A A A G  
 マウス C e p 2 9 0 イントロン 2 5 R 核酸プライマー (配列番号 6 5 )  
 G C A C A T C A T C T G A G G C A G G T  
 m i n C M V および S a C a s 9 配列を下線で示す、m i n C M V - S a C a s 9 - N L  
 S - F L A G - B G H p A - U 6 - B s a I : B s a I - s g R N A スキヤホールド断  
 片 (配列番号 6 6 )  
 A T G A A T T C T C T A G A C A A T T G G A C T C A C G G G G A T T T C C A A G  
 T C T C C A C C C C A T T G A C G T C A A T G G G A G T T T G T T T G G C A C 30  
 C A A A A T C A A C G G G A C T T T C C A A A A T G T C G T A A C A A C T C C G  
 C C C C C A T T G A C G C A A A T G G G G C G G T A G G C G T G T A C G G T G G G A  
 G G T C T A T A T A A G C A G A G C T C G T T T A G T G A A C C G T C A G A T C  
 A C G C G T G C C A C C A T G A A G C G G A A C T A C A T C C T G G G C C T G G  
 A C A T C G G C A T C A C C A G C G T G G G C T A C G G C A T C A T C G A C T A  
 C G A G A C A C G G G A C G T G A T C G A T G C C G G C G T G C G G C T G T T C  
 A A A G A G G G C C A A C G T G G A A A A C A A C G A G G G C A G G C G G G A G C A  
 A G A G A G G G C G C C A G A A G G C T G A A G C G G G C G G G C G G G A T A G  
 A A T C C A G A G A G T G A A G A A G C T G C T G T T C G A C T A C A A C C T G  
 C T G A C C G A C C A C A G C G A G C T G A G C G G C A T C A A C C C C T A C G 40  
 A G G C C A G A G T G A A G G G G C T G A G C C A G A A G C T G A G C G G A G G G A  
 A G A G T T C T C T G C C G C C C T G C T G C A C C T G G C C A A G A G A A G A  
 G G C G T G C A C A A C G T G A A C G A G G T G G A A G A G G G A C A C C G G C A  
 A C G A G C T G T C C A C C A A A G A G G C A G A T C A G C C G G A A C A G C A A  
 G G C C C T G G A A G A G A A A T A C G T G G C C G A A C T G C A G C T G G A A  
 C G G C T G A A G A A A A G A C G G C G A A G T G C G G G G C A G C A T C A A C A  
 G A T T C A A G A C C A G C G A C T A C G T G A A A G A A G C C A A A C A G C T  
 G C T G A A G G T G C A G A A G G C C T A C C A C C A G C T G G A C C A G A G C  
 T T C A T C G A C A C C T A C A T C G A C C T G C T G G A A A C C C G G C G G A  
 C C T A C T A T G A G G G A C C T G G C G A G G G C A G C C C C T T C G G C T G 50

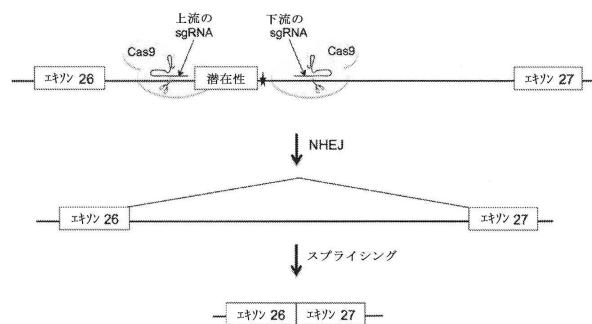
GAAGGACATCAAAGAATGGTACGAGATGCTGATGGGCCAC  
 TGACCTACTTCCCCGAGGAACCTGCAGCGTGAAGTACG  
 CCTACAAACGCCGACCTGTACAACGCCCTGAACGACCTGAA  
 CAATCTCGTGATCACCAAGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAA  
 TATTACGAGAACGTTCCAGATCATCGAGAACGTCGAAAGCTGGAA  
 AGAACGAGAACGCCCACCCCTGAAGCAGATCGCCAAAGAAC  
 CCTCGTGAACGAAGAGGATATTAAGGGCTACAGAGTGA  
 AGCACCGGCAAGGCCAGTTCACCAACCTGAAGGTGTAC  
 ACGACATCAAGGACATTACCGCCCGGAAAGAGGATTATTGA  
 GAACGCCGAGCTGCTGGATCAGATTGCCAAGATCCTGACC  
 10  
 ATCTACCAAGAGCAGCGAGGACATCCAGGAAGAAC  
 ATCTGAACCTCGAGCTGACCCAGGAAGAGAAC  
 CTCTAATCTGAAGGGCTATAACCGGCACCCACAACCTGAGC  
 CTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGCTGTGGCACA  
 CCAACGACAACCAGATCGCTATCTTCAACCAGGCTGAAGCT  
 GGTGCCAAGAACGGTGGACCTGTCCCAGCAGAAAGAGATC  
 CCCACCAACCTGGTGGACGACTTCATCCTGAGCCCCGTCG  
 TGAAGAGAACGCTTCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGC  
 CATCATCAAGAACGTACGGCCTGCCAACGACATCATTATC  
 GAGCTGGCCCGCGAGAAC  
 20  
 TGATCAACGAGATGCAGAACGGGAAACCGGCAGACCAACGA  
 GCGGATCGAGGAAATCATCCGGACCAACGGCAAAGAGAAC  
 GCCAAGTACCTGATCGAGAAC  
 AGGAAGGCAAGTGCCTGTACAGCCTGGAAAGCCATCCCTCT  
 GGAAGATCTGCTGAACAAACCCCTTCAACTATGAGGTGGAC  
 CACATCATCCCCAGAACCGTGTCCCTGACAAACAGCTTCA  
 ACAACAAAGGTGCTCGTGAAGCAGGAAGAAC  
 GGGCAACCGGACCCATTCCAGTACCTGAGCAGCAGCGAC  
 AGCAAGATCAGCTACGAAACCTTCAAGAAC  
 30  
 ATCTGGCCAAGGGCAAGGGCAGAAC  
 AGAGTATCTGCTGGAAAGAAC  
 GTGCAGAAAGACTTCATCAACCGGAACCTGGTGGATACCA  
 GATACGCCACCAAGGGCTGATGAACCTGCTGCGGGAGCTA  
 CTTCAGAGTGAACAAACCTGGACGTGAAAGTGAAAGTCCATC  
 AATGGCGGCTTCACCAAGCTTTCTGCGGGAGTGGAAGT  
 TTAAGAAAGAGCGGAACAAAGGGTACAAGCACCAAGGCCA  
 GGACGCCCTGATCATTGCCAACGCCGATTCATCTTCAAA  
 GAGTGGAAAGAAACTGGACAAGGCCAAAAAGTGATGGAAA  
 ACCAGATGTTCGAGGAAAAGCAGGCCGAGAGCAGTGC  
 GATCGAAACCGAGCAGGAGTACAAAGAGATCTTCATCACC  
 40  
 CCCCACCAAGATCAAGCACATTAAAGGACTTCAAGGACTACA  
 AGTACAGCCACCGGGTGGACAAGAAC  
 GATTAAACGACACCCCTGTACTCCACCCGAAAGGACGACAAG  
 GGCAACACCCCTGATCGTGAACAATCTGAACCGGCCTGTACG  
 ACAAGGACAATGACAAGCTGAAAAAGCTGATCAACAAAGAG  
 CCCCAGAAAAAGCTGCTGATGTACCAACGCCACGACCCCC  
 TACCAAGAAACTGAAGCTGATTATGGAACAGTACGGCGACG  
 AGAACGAAATCCCCCTGTACAAGTACTACGAGGAAACCGGGAA  
 CTACCTGACCAAGTACTCCAAAAAGGACAACCGGCCCGTG  
 ATCAAGAACGAGATTAAAGTATTACGGCAACAAACTGAAACGCC  
 50

ATCTGGACATCACCGACGACTACCCCAACAGCAGAAACAA  
GGTCGTGAAGCTGTCCTGAAGCCCTACAGATTGACGTTG  
TACCTGGACAATGGCGTGTACAAGTTCTGACCGTGAAGA  
ATCTGGATGTGATCAAAAAAGAAAACCTACTACGAAGTGA  
TAGCAAGTGCTATGAGGAAGCTAACAGAAGCTGAAGAAGATC  
AGCAACCCAGGCCGAGTTATCGCCTCTTCTACAAACAAACG  
ATCTGATCAAGATCAACGGCGAGCTGTATAGAGTGAATCGG  
CGTGAACAAACGACCTGCTGAACCGGATCGAAGTGAACATG  
ATCGACATCACCTACCGCGAGTACCTTGAAAACATGAACG  
ACAAGAGGCCCCAGGATCATTAAAGACAATCGCCTCCAA 10  
GACCCAGAGCATTAAAGAAGTACAGCACAGACATTCTGGGC  
AACCTGTATGAAGTGAATCTAACAGAACCCCTCAGATCA  
TCAAAAAGGGCGGATCCCCCAAGAAAAAGCGCAAGTGG  
CTACAAAGACGATGACGACAAGTGAAGCTAGCGACTGTGCC  
TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCTG  
CTTCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTT  
CCTAATAAAATGAGGAATTGCATCGCATTGTCAGTAG  
GTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGCAGGACAGC  
AAGGGGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGTA  
CCTGAGGGCCTATTCCTCATGATTCTTCATATTCGATA 20  
TACGATAACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAAATT  
GACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGT  
AGAAAGTAATAATTCTTGGTAGTTGCAGTTAAAT  
TATGTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACCTG  
AAAGTATTCGATTCCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAA  
GGACGAAACACCGGAGACCACGGCAGGTCTCAGTTAGT  
ACTCTGGAAACAGAATCTACTAAACAAAGGCAAAATGCCG  
TGTTTATCTCGTCAACCTGTTGGCGAGATTGCGGGCCG  
CGTCGACAT

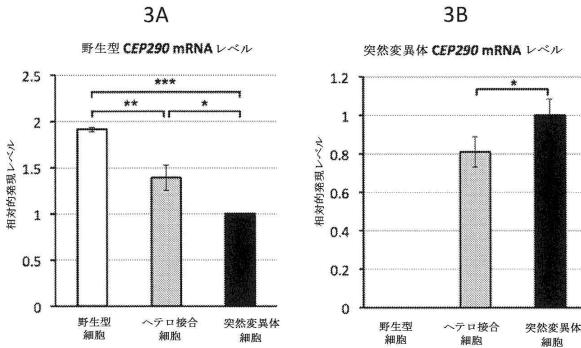
【図1】



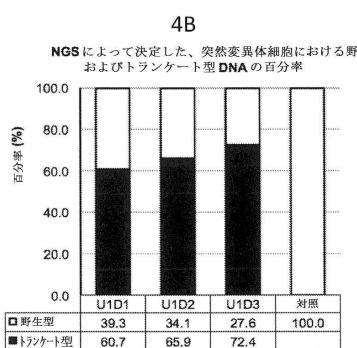
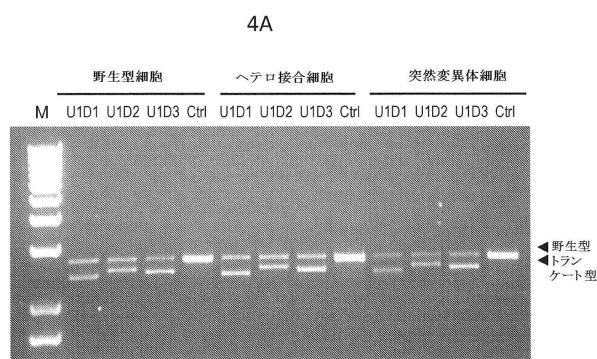
【図2】



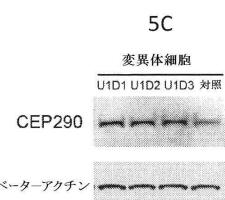
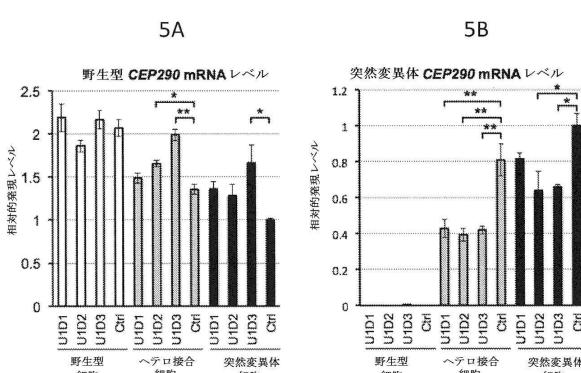
【図3】



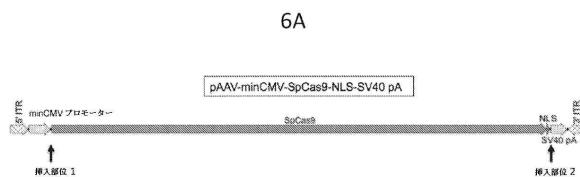
【図4】



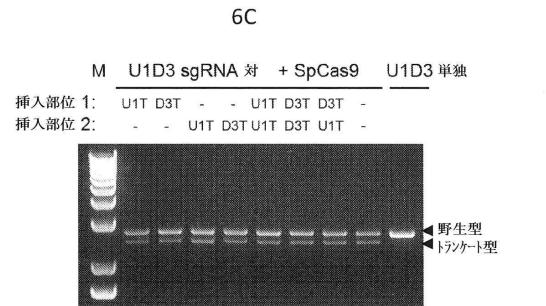
【図5】



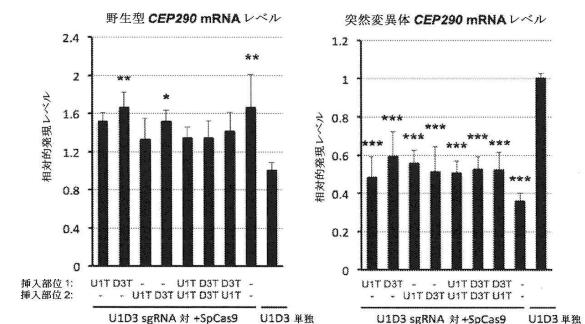
【図 6 - 1】



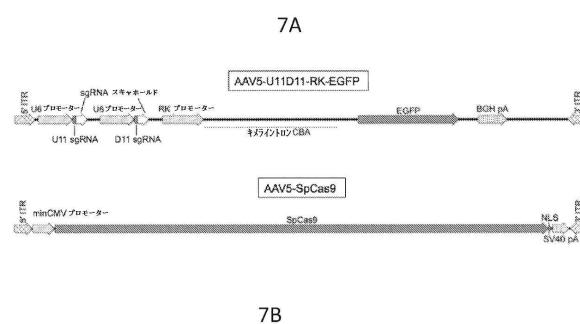
【図 6 - 2】



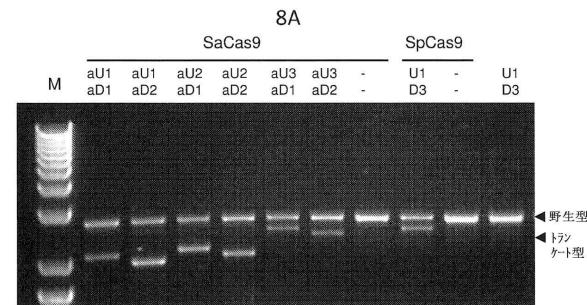
6D



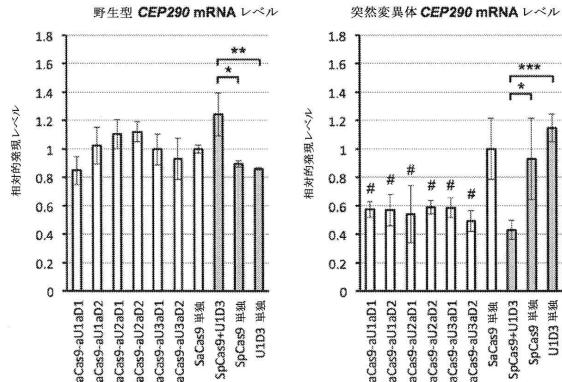
【図 7】



【図 8】



8B



【配列表】

0006985250000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K 35/76
C 1 2 N	15/86	(2006.01)	C 1 2 N 15/86 Z
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5
			A 6 1 P 43/00 1 2 1

(72)発明者 アブラハム・スカリア  
アメリカ合衆国ニュージャージー州08807.プリッジウォーター.メールコード 55エー-505エー.コーポレートドライブ55.サノフィ

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 国際公開第2014/204724 (WO, A1)  
国際公開第2015/070083 (WO, A1)  
MORGAN, L. et al., Molecular Therapy, 2015年05月01日, Vol. 23, Suppl. 1, pp. S273-4

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K	4 8 / 0 0
A 6 1 K	3 1 / 0 0
A 6 1 K	3 5 / 0 0
C 1 2 N	9 / 0 0
C 1 2 N	1 5 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )	