

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6873911号  
(P6873911)

(45) 発行日 令和3年5月19日 (2021.5.19)

(24) 登録日 令和3年4月23日 (2021.4.23)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 O
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04

請求項の数 26 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-552447 (P2017-552447)	(73) 特許権者	503115205
(86) (22) 出願日	平成28年4月5日 (2016.4.5)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
(65) 公表番号	特表2018-513682 (P2018-513682A)		ザ レランド スタンフォード ジュニ
(43) 公表日	平成30年5月31日 (2018.5.31)		ア ユニバーシティ
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/026028		アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8
(87) 国際公開番号	W02016/164356		カリフォルニア州 スタンフォード メイ
(87) 国際公開日	平成28年10月13日 (2016.10.13)		ン クワッド ビルディング 1 7 0 サ
審査請求日	平成31年4月5日 (2019.4.5)		ード フロア ピー. オー. ボックス 2
(31) 優先権主張番号	62/143, 729		0 3 8 6 オフィス オブ ザ ジェネラ
(32) 優先日	平成27年4月6日 (2015.4.6)		ル カウンセル
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/160, 545		
(32) 優先日	平成27年5月12日 (2015.5.12)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 初代細胞において標的核酸の遺伝子調節を誘導するためにインビトロで行う方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

初代細胞において標的核酸の遺伝子調節を誘導するためにインビトロで行う方法であって、

(a) 標的核酸に相補的な第1のヌクレオチド配列と、C a s 9 タンパク質と相互作用する第2のヌクレオチド配列からなる修飾型単一ガイドRNA (s g RNA) であって、5'末端の3個の連続する修飾型ヌクレオチドと、3'末端の3個の連続する修飾型ヌクレオチドとを有し、該修飾型ヌクレオチドが、2'-O-メチル(M)ヌクレオチド、2'-O-メチル3'-ホスホロチオエート(MS)ヌクレオチド、または2'-O-メチル3'-チオP A C E (M S P)ヌクレオチドである、修飾型単一ガイドRNA ; ならびに

(b) C a s ポリペプチド、C a s ポリペプチドをコードするmRNA、および/またはC a s ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを初代細胞へ導入するステップを含み、

前記修飾型s g RNAが前記C a s ポリペプチドを標的核酸へ導き、

前記修飾型s g RNAが、対応する非修飾型s g RNAと比較して増強した活性で標的核酸の遺伝子調節を誘導する、方法。

【請求項 2】

前記増強した活性が、前記修飾型s g RNAの増加した安定性および/または前記修飾

型 s g R N A の標的核酸に対する増加した特異性を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記標的核酸が標的 D N A または標的 R N A を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記遺伝子調節が前記標的 D N A のゲノム編集を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ゲノム編集が、標的 D N A の相同組換え修復 ( H D R ) または非相同末端結合 ( N H E J ) を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

組換えドナー修復鋳型を前記初代細胞へ導入するステップをさらに含む、請求項 4 または 5 に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記組換えドナー修復鋳型が、前記標的 D N A の 2 つの重複しない相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、ゲノム編集を受ける前記標的 D N A に対応するヌクレオチド配列の 5 ' 末端および 3 ' 末端に位置する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記組換えドナー修復鋳型が、一塩基多型 ( S N P ) を正すための変異をコードするヌクレオチド配列を含む合成の一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド ( s s O D N ) 鋳型、および標的 D N A の 2 つの重複しない相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、変異をコードするヌクレオチド配列の 5 ' 末端および 3 ' 末端に位置する、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記遺伝子調節が、エンドヌクレアーゼ欠損 C a s ポリペプチドを用いた、前記標的 D N A または前記標的 R N A の遺伝子発現の阻害または活性化を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

前記初代細胞が、幹細胞、免疫細胞、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記幹細胞が、造血幹細胞・造血前駆細胞 ( H S P C )、間葉幹細胞、神経幹細胞、臓器幹細胞、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記免疫細胞が、T 細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、末梢血単核細胞 ( P B M C )、末梢血リンパ球 ( P B L )、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記初代細胞が初代細胞集団を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも 30 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも 40 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも 50 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも 60 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 13 に記載の方法。

50

## 【請求項 18】

前記第1のヌクレオチド配列が20ヌクレオチド長である、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記第1のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの10%から30%までが修飾型ヌクレオチドである、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記第2のヌクレオチド配列が80ヌクレオチド長である、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの1%から10%までが修飾型ヌクレオチドである、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記修飾型sgRNAが化学合成される、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 23】

前記修飾型sgRNAが少なくとも2個の異なる修飾型sgRNAを含み、各修飾型sgRNAが、異なる標的核酸へ方向づけられている、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記Casポリペプチドが、前記CasポリペプチドをコードするmRNAである、請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 25】

前記Casポリペプチドが、Cas9ポリペプチド、そのバリエーション、またはその断片である、請求項1～24のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記初代細胞へ導入するステップが、前記初代細胞をエレクトロポレーションすることを含む、請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、2015年4月6日に出願された米国仮出願第62/143,729号、および2015年5月12日に出願された米国仮出願第62/160,545号の優先権を主張し、それらの米国仮出願の開示は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

## 【0002】

連邦政府支援の研究および開発の下でなされた発明への権利に関する陳述

この発明は、National Institutes of Healthによって授与された契約EY018244およびAI097320による政府支援でなされた。政府はこの発明において一定の権利を有する。

## 【背景技術】

## 【0003】

人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集は、関心対象となる、本質的にいかなるゲノム配列をも改変するための画期的技術である(Porteus, M. H. & Carroll, D., Nature Biotechnology 23, 967-973 (2005))。この技術は、人工ヌクレアーゼを利用して、部位特異的二本鎖切断(DSB)を生じさせ、続いて、内因性細胞修復機構によりDSBを回復させる。その結果は、切断の部位において挿入もしくは欠失(イン/デル)を生じる、変異原性の非相同末端結合(NHEJ)による特定部位の変異か、または外因的に導入されたドナー鋳型を用

10

20

30

40

50

いる相同組換え (H R) によるゲノム配列の正確な変化かのいずれかであり得る (H e n d e l e t a l . , T r e n d s i n B i o t e c h n o l o g y 33 , 132 - 140 (2015))。このプラットフォームへの最近の主な追加は、RNA ガイド型ヌクレアーゼ (C a s) および短鎖ガイド RNA (s g R N A) からなるクラスター化された規則的な配置の回文配列リピート (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 : C R I S P R) / C a s システムである (J i n e k , M . e t a l . , S c i e n c e 337 , 816 - 821 (2012)、M a l i , P . e t a l . , S c i e n c e 339 , 823 - 826 (2013)、C o n g , L . e t a l . , S c i e n c e 339 , 819 - 823 (2013)、H s u e t a l . , C e l l 157 , 1262 - 1278 (2014))。ガイド RNA は、C R I S P R R N A (c r R N A) およびトランス活性化型 c r R N A (t r a c r R N A) と名付けられた 2 つの RNA で構成されており、それらは、典型的には、キメラ単一ガイド RNA (s g R N A) として融合している。

#### 【0004】

ゲノム編集のための s g R N A は、100ヌクレオチド (n t) からなり得、そのうちの 5' 末端における 20 n t が、ワトソン・クリック塩基対形成によって標的 DNA 配列とハイブリダイズし、標的ゲノム DNA を切断するように C a s エンドヌクレアーゼを導く。

#### 【0005】

C R I S P R / C a s システムはまた、遺伝子発現の配列特異的制御、例えば、遺伝子発現の阻害または活性化に適応している。エンドヌクレアーゼ活性を欠く特定の C a s 9 ポリペプチドバリエーションを用いて、標的遺伝子を抑制または活性化することができる (Q i e t a l . , C e l l , 2013 , 152 (5) : 1173 - 7783、P e r e z - P i n e r a e t a l . , N a t M e t h o d s , 2013 , 10 (10) : 973 - 976、M a e d e r e t a l . , N a t M e t h o d s , 2013 , 10 (10) : 977 - 979、G i l b e r t e t a l . , C e l l , 2014 , 159 : 647 - 661、O' C o n n e l l e t a l . , N a t u r e , 2014 , 516 : 263 - 266)。

#### 【0006】

残念なことに、C R I S P R / C a s システムを用いるゲノム編集および遺伝子発現のモジュレーションは、特に初代細胞において、非効率のままである。それゆえに、遺伝子調節、例えば、ゲノム編集、遺伝子発現の阻害、および遺伝子発現の活性化のために用いることができる、C R I S P R / C a s システムに基づいた、改善された組成物および方法の必要性が当技術分野において依然として存在する。本発明は、この必要性を満たし、さらに追加の利点を提供する。

#### 【発明の概要】

#### 【0007】

細胞において標的核酸の遺伝子調節を誘導する (例えば、惹起する、モジュレートする、増強するなど) ための方法を提供する。本発明は、(例えば、エキソビボ治療用にインビトロで培養された) 初代細胞において、または (例えば、インビボ治療用の) ヒトなどの対象内の細胞において、標的核酸のゲノム編集および/または遺伝子発現の阻害もしくは活性化を増強する、修飾型単一ガイド RNA (s g R N A) を用いることを含む。本発明はまた、疾患に関連した標的遺伝子における変異を正す正確なゲノム編集を増強することによる、対象において疾患を予防または処置するための方法を提供する。本発明は、ヌクレアーゼ媒介性ゲノム編集技術を受け入れられる、いかなる細胞型に関しても、かついかなる遺伝子座においても用いることができる。

#### 【0008】

第 1 の態様において、本発明は、初代細胞において標的核酸の遺伝子調節を誘導するための方法であって、

(a) 標的核酸に相補的な第1のヌクレオチド配列、およびCRISPR関連タンパク質(Cas)ポリペプチドと相互作用する第2のヌクレオチド配列を含む修飾型単一ガイドRNA(sgRNA)であって、前記第1のヌクレオチド配列および/または前記第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの1個または複数が修飾型ヌクレオチドである、修飾型単一ガイドRNA；ならびに

(b) Casポリペプチド、CasポリペプチドをコードするmRNA、および/またはCasポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを初代細胞へ導入するステップを含み、

前記修飾型sgRNAがCasポリペプチドを標的核酸へ導き、

前記修飾型sgRNAが、対応する非修飾型sgRNAと比較して増強した活性で標的核酸の遺伝子調節を誘導する、方法を提供する。

【0009】

関連態様において、本発明は、初代細胞において標的DNAのゲノム編集を増強するための方法であって、

(a) 標的DNAに相補的な第1のヌクレオチド配列、およびCRISPR関連タンパク質(Cas)ポリペプチドと相互作用する第2のヌクレオチド配列を含む修飾型単一ガイドRNA(sgRNA)であって、前記第1のヌクレオチド配列および/または前記第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの1個または複数が修飾型ヌクレオチドである、修飾型単一ガイドRNA；ならびに

(b) Casポリペプチド、CasポリペプチドをコードするmRNA、および/またはCasポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを初代細胞へ導入するステップを含み、

前記修飾型sgRNAがCasポリペプチドを標的DNAへ導き、

前記修飾型sgRNAが、対応する非修飾型sgRNAと比較して、(例えば、修飾型sgRNAの安定性の増加および/または修飾型sgRNAの標的DNAに対する特異性の増加によって)標的DNAのゲノム編集を増強する、方法を提供する。

【0010】

第2の態様において、本発明は、対象において遺伝的疾患を予防または処置するための方法であって、

遺伝的疾患に関連した標的遺伝子における変異を正すのに十分な量で修飾型単一ガイドRNA(sgRNA)を対象に投与するステップであって、前記修飾型sgRNAが、標的遺伝子に相補的な第1のヌクレオチド配列、およびCRISPR関連タンパク質(Cas)ポリペプチドと相互作用する第2のヌクレオチド配列を含み、かつ前記第1のヌクレオチド配列および/または前記第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの1個または複数が修飾型ヌクレオチドである、ステップを含む、方法を提供する。

【0011】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明および図から当業者に明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1A - 1G】合成され、かつ化学修飾されたsgRNAが、インビトロでの高レベルのDNA切断、およびヒト細胞株(K562)におけるイン/デルの高頻度を促進することを示す図である。図1Aは、IL2RG sgRNAの配列、およびCas9ヘローディングされ、かつそのゲノム標的部位と結合したIL2RG sgRNAの二次構造の概略図を示す。化学修飾を有するヌクレオチドは、白色旗でマークされている。図1Bは、sgRNA(配列については表1)の化学合成中に取り込まれた化学修飾の構造を描く。存在する場合、2'-O-メチル(M)、2'-O-メチル、3'ホスホロチオエート

10

20

30

40

50

(MS)、または2'-O-メチル、3'-チオPACE(MSP)を含む化学修飾(灰色で示されている)は、5'末端と3'末端の両方における3個の終端ヌクレオチドに取り込まれた。図1Cは、PCRアンプリコンのディープシーケンシングにより測定された場合の変異原性NH<sub>2</sub>Jによる遺伝子破壊を示す。図1Dは、合成sgRNAと組み合わされたCas9により誘導されたK562細胞の3つの遺伝子座IL2RG、HBB、およびCCR5におけるHRによる遺伝子付加を示す。合成sgRNAを、100万個の細胞あたり1μg(明るい色調)または20μg(暗い色調)で送達した。Cas9はプラスミド(2μg)から発現し、HR実験について、5μgのGFPコードドナープラスミドが含まれた。陽性対照として、sgRNAとCas9タンパク質の両方をコードする2μgのsgRNAプラスミドを用いた(灰色バー)。バーは、平均値+SEM、n=3を表す。図1Eは、20μgのsgRNAについて、図1Cにおいて実施されたような合成sgRNAにより媒介される標的化切断の特異性を示す。イン/デル頻度を、標的ゲノム遺伝子座、および各遺伝子について3つのバイオインフォマティクス的に予測されたオフターゲット遺伝子座のPCRアンプリコンのディープシーケンシングにより測定した。バーは、平均値+SEM、n=3を表す。図1Fは、エレクトロポレーション法を用いた、15μg Cas9 mRNAおよび10μg IL2RG合成sgRNAの100万個のK562細胞への時差送達を示す。バーは、参照対照としてmock処理された試料を用いた、sgRNA標的部位に及ぶPCRアンプリコンのTIDE分析により測定された場合の、平均イン/デル頻度+SEM、n=3を表す。図1Gにおいて、Cas9タンパク質を、2.5モル過剰の示された合成IL2RG sgRNAとあらかじめ複合体化させ、示された量で100万個のK562細胞へヌクレオフェクションした。イン/デル頻度は、上記のようにTIDE分析により測定され、バーは平均イン/デル頻度+SEM、n=3を表す。

【図2A-2C】化学修飾型sgRNAが、ヒト初代T細胞およびCD34+造血幹細胞・造血前駆細胞(HSPC)において高率の遺伝子破壊を促進することを示す図である。100万個のヒト初代T細胞に、10μgの示された合成sgRNA、および15μg Cas9 mRNAかまたは1μg Cas9コードプラスミドかのいずれかをヌクレオフェクションした(図2A)。sgRNAとCas9タンパク質の両方をコードする1μgのプラスミドを比較のために含めた。バーは、sgRNA標的部位に及ぶPCRアンプリコンのTIDE分析により測定された場合の、3つの異なるドナーについての平均イン/デル頻度+SEM、n=6を表し、参照対照としてmock処理の試料を用いた。図2Bにおいて、刺激T細胞に、上記の通りであるが、ただし、2.5モル過剰の示された合成CCR5 sgRNAとあらかじめ複合体化した15μg Cas9タンパク質をヌクレオフェクションした。イン/デル頻度を、上記のようにTIDE分析により測定した。バーは、3つの異なるドナーについての平均イン/デル頻度+SEM、n=6を表す。図2Cにおいて、500,000個の動員化ヒト末梢血CD34+HSPCに、10μgの示された、IL2RGまたはHBBを標的にする合成sgRNA、および15μg Cas9 mRNAかまたは1μg Cas9プラスミドのいずれかをヌクレオフェクションした。sgRNAとCas9タンパク質の両方をコードする1μgのsgRNAプラスミドを比較のために含めた。バーは、T7エンドヌクレアーゼ切断アッセイにより測定される場合の平均イン/デル頻度+SEM、n=3を表す。図2Dにおいて、100万個の刺激T細胞または動員化ヒト末梢血CD34+HSPCに、15μg Cas9 mRNAおよび10μgの示された合成CCR5 sgRNAをヌクレオフェクションした。組み合わせて用いられる場合、各sgRNAの量は5μgであった。単一のsgRNAでの試料についてのイン/デル頻度を、上記のようにTIDE分析により測定し、2つのsgRNAでの試料についてのイン/デル頻度を、クローニングされたPCR産物のシーケンシングにより測定した(図18A~B参照)。バーは平均イン/デル頻度+SEM、n=3を表す。

【図3】インビトロでの化学修飾型sgRNAにより方向づけられたdsDNA標的のCas9切断を示す図である。バーは、Cas9タンパク質およびsgRNAで処理された

10

20

30

40

50

標的DNA断片の切断生成物（図4参照）のパーセント収量を示す。各sgRNAの3つの独立した合成についての平均値 + SEMが示されている。

【図4】インビトロで化学修飾型sgRNAにより方向づけられたdsDNA標的のCas9切断を示す図である。dsDNA標的の生化学的切断からの切断生成物を、Bioanalyzer 2200においてDNA 7500 LabChipsでアッセイした。各標的について代表的なゲルが示されており、追加の反復実験は、図3においてプロットされた結果に含まれている。試料は以下の通りであった：（L）：ラダー、（1）：非修飾型sgRNA + 標的DNA（- Cas9 mock処理）、（2）：標的DNA + Cas9タンパク質（- sgRNA mock処理）、（3）：非修飾型sgRNA + 標的DNA + Cas9タンパク質、（4）：MS sgRNA + 標的DNA + Cas9タンパク質、（5）：MS sgRNA + 標的DNA + Cas9タンパク質、および（6）：MS P sgRNA + 標的DNA + Cas9タンパク質。

10

【図5】合成sgRNAにより媒介される標的化切断の特異性を示す図である。標的特異性を図1EにおいてのようにIlluminaディープシーケンシングを用いて評価したが、ただし、図1Cからの試料に1 μg sgRNAをヌクレオフェクションした。イン/デル頻度を、各sgRNAについて3つのバイオフィーマティクス的に予測されたオフターゲット遺伝子座からのPCRアンプリコンのディープシーケンシングにより測定した。バーは、対数目盛で示された、平均値 + SEM、n = 3を表す。イン/デルパーセンテージに関して表5を参照。

【図6】K562細胞における、IL2RGを標的にするMSP sgRNAおよびCas9 mRNAの滴定を示す図である。測定されたイン/デル頻度は、3回の反復実験からの平均であり、値は、ヒートマップで示されている。反復実験（n = 3）のSEMは、明快にするために表示されていないが、全て、測定された表示の値の4%未満である。イン/デル頻度を、sgRNA標的部位に及ぶPCRアンプリコンのTIDE分析により測定し、参照対照としてmock処理された試料を用いた。

20

【図7】sgRNAおよびCas9 mRNAの時差送達の実験概略図を提供する。図1Gについてのデータをもたらした実験の概略図。K562細胞に、Cas9 mRNA、および/またはIL2RGを標的にするsgRNAを、示された時点でヌクレオフェクションした。ゲノムDNAを、最後の成分のヌクレオフェクションから72時間後、抽出し、イン/デル頻度を、参照対照としてmock処理された試料を用いるTIDEにより測定した。

30

【図8】異なる販売会社からのCas9タンパク質を比較する図である。100万個のK562細胞に、2.5モル過剰のMSP sgRNAとあらかじめ複合体化した15 μg Cas9タンパク質をヌクレオフェクションした3日後、ゲノムDNAを抽出し、イン/デル頻度を、参照対照としてmock処理された試料を用いるTIDEにより測定した。バーは、平均 + SEM、n = 3を表す。

【図9A - 9B】標的化切断の特異性が、合成IL2RG sgRNAおよびCas9プラスミド、mRNA、またはタンパク質により媒介されることを示す図である。標的特異性を、図1Eおよび図5においてのようにIlluminaディープシーケンシングを用いて評価し、均等目盛（図9A）および対数目盛（図9B）で表示した。100万個のK562細胞に、（i）2 μg Cas9プラスミド + 20 μg sgRNA、（ii）15 μg Cas9 mRNA + 10 μg sgRNA、または（iii）7.6 μg sgRNAとあらかじめ複合体化した15 μg Cas9タンパク質（タンパク質：sgRNAのモル比 = 1 : 2.5）をヌクレオフェクションした。Cas9プラスミドの結果は、図1Eに示されたのと同じである。バーは、平均イン/デル頻度 + SEM、n = 3を表す。

40

【図10】ヒト初代T細胞における高いRNAヌクレオフェクション効率を示す図である。3つの異なるドナー由来の刺激T細胞に、刺激から3日後、GFP mRNAをヌクレオフェクションした。GFPの発現を、ヌクレオフェクションから3日後、フローサイトメトリにより測定した。ヌクレオフェクションされた細胞（灰色）におけるGFP発現は

50

、m o c kでトランスフェクトされた細胞（黒色）と比較して示されている。

【図11】T細胞ヌクレオフェクションにおいてC C R 5 s g R N AおよびC a s 9 m R N A量を増加させることが、類似したイン/デル頻度を生じたことを示す図である。刺激T細胞に、M S P C C R 5 s g R N AおよびC a s 9 m R N Aの示された量をヌクレオフェクションした。イン/デル頻度を、s g R N A標的部位に及ぶP C RアンプリコンのT I D E分析により測定し、参照対照としてm o c k処理された試料を用いた。平均イン/デル頻度は+ S E M、n = 6を示されている。

【図12】C D 4 +、C D 8 +、および全てのT細胞集団における類似したイン/デル頻度を示す図である。刺激T細胞にC C R 5 M S P s g R N AおよびC a s 9 m R N Aをヌクレオフェクションし、その後、C D 4 +およびC D 8 +亜集団へ分別した。イン/デル頻度をT I D Eにより測定し、全部の集団におけるイン/デル頻度と比較した。バーは、1つのT細胞ドナーについての平均イン/デル頻度+ S E M、n = 8を表す。

10

【図13】ヒト初代T細胞におけるイン/デル頻度が、時間が経過しても安定であることを示す図である。刺激T細胞にC C R 5 M S P s g R N AおよびC a s 9 m R N Aをヌクレオフェクションした。示された時点において細胞のサブセットからg D N Aを抽出し、イン/デル頻度を、s g R N A標的部位に及ぶP C RアンプリコンのT I D E分析により測定し、参照対照としてm o c k処理された試料を用いた。平均イン/デル頻度は3つの異なるT細胞ドナーについて、+ / - S E M、n = 6を示されている。

【図14】C a s 9 プラスミドと比較して、合成s g R N AおよびC a s 9 m R N AをヌクレオフェクションされたT細胞における細胞死の、より低い頻度を示す図である。100万個の刺激T細胞に、10 μ gの示された合成s g R N A、および15 μ g C a s 9 m R N Aまたは1 μ g C a s 9 コードプラスミドのいずれかをヌクレオフェクションした。C C R 5 s g R N AとC a s 9 タンパク質の両方をコードする1 μ gのプラスミドを、比較のために含めた（s g R N Aプラスミド）。ヌクレオフェクションから3日後、細胞を、生/死の細胞染色で染色した。バーは、3つの異なるT細胞ドナーについての死細胞の平均パーセンテージ+ S E M、n = 6を表す。

20

【図15】合成s g R N AのT細胞へのヌクレオフェクション後の増殖アッセイからの結果を示す図である。2つの異なるドナー由来の刺激T細胞を0日目にヌクレオフェクションし、細胞増殖を、C e l l T i t e r G l oアッセイを用いてモニターした。反復実験のS E Mは、明快にするために表示されていないが、全て、示された値の15%未満である。

30

【図16】刺激されていないT細胞におけるC C R 5破壊を示す図である。3つの異なるドナー由来の刺激されていないヒトT細胞に、単離の日において、M S s g R N AおよびC a s 9 m R N Aをヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクションから3日後、g D N Aを抽出し、イン/デル頻度を、参照対照としてm o c k処理された試料を用いるT I D Eにより測定した。バーは平均+ S E M、n = 2を表す。

【図17】I L 2 R GおよびH B Bについての動員化P B C D 3 4 + H S P Cにおけるイン/デル頻度を示す図である。C D 3 4 + H S P Cのヌクレオフェクションから3日後、ゲノムD N Aを抽出し、イン/デル頻度をT 7アッセイにより測定した。I L 2 R GおよびH B Bのそれぞれについての3つの生物学的反復実験の1つの代表的なゲルが示されている。+ S E M、n = 2。

40

【図18A - B】2つのs g R N Aを用いた、ヒト初代T細胞およびC D 3 4 + H S P Cにおける高いC C R 5 遺伝子改変頻度を示す図である。3つの異なるドナー由来の刺激T細胞およびP B動員化C D 3 4 + H S P Cに、「D」 s g R N Aと「Q」 s g R N Aの両方をC a s 9 m R N Aと共に3連でヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクションから3日後、g D N Aを抽出し、C C R 5の改変された領域を、非改変対立遺伝子についての2 . 1 k bアンプリコンを生じるプライマー対を用いてP C R増幅した（図18A）。P C Rアンプリコンを、形質転換用のプラスミドへサブクロニングし、個々の対立遺伝子を表す個々のコロニーをシーケンシングし、予想されたゲノム配列に対して照合し、対立遺伝子ジェノタイプに従って分類した（図18B）。

50



【図19】CD34 + HSPCにおいて、MS修飾型sgRNAが、非修飾型sgRNAより優れた機能を果たすことを示す図である。CD34 + HSPCに、2.5モル過剰の示された合成HBB sgRNAと複合体化した30 µg Cas9タンパク質をヌクレオフェクションした。インデル頻度を、ヌクレオフェクションから4日後、TIDE分析により測定した。バーは、3つの異なるドナーについての平均インデル頻度 + SEM、n = 3を表す。\* \* p < 0.01、スチューデントt検定。

【図20】修飾型sgRNAが、効率的な多重化ゲノム編集に用いられ得ることを示す図である。100万個のK562細胞に、15 µg Cas9 mRNAおよび5 µgの、CCR5か、HBBか、またはIL2RGのいずれかのMS修飾型sgRNA、または3つ全てのsgRNA（多重化）（3 × 5 µg）をヌクレオフェクションした。インデル頻度を、ヌクレオフェクションから3日後、その3つの遺伝子座のそれぞれにおいてTIDE分析により測定した。バーは、平均インデル頻度 + SEM、n = 3を表す。\* \* \* p < 0.001、n.s. = p = 0.05、スチューデントt検定。

【図21】化学修飾型CCR5 sgRNA、Cas9 mRNA、およびCCR5 sODNを用いた相同組換え後のCCR5標的部位に及ぶPCR産物を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

I. 序論

インビトロ細胞（例えば、エクスピボ治療用の初代細胞）またはインビボ細胞（例えば、ヒトなどの対象の器官または組織における細胞）においてCRISPR / Casに基づいた、ゲノム編集および／または遺伝子発現のモジュレーションのための方法が本明細書に提供される。特に、本明細書に提供される方法は、対応する非修飾型sgRNAと比較して、遺伝子調節（例えば、ゲノム編集、遺伝子発現の阻害、および遺伝子発現の活性化）中、増強した活性を有する化学修飾型単一ガイドRNA（sgRNA）を利用する。ある特定の態様において、本発明は、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片か、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片をコードするmRNAか、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターかのいずれかと共に、標的核酸とハイブリダイズする化学修飾型sgRNAを導入することによる、細胞における標的核酸の遺伝子調節のための方法を提供する。ある特定の他の態様において、本発明は、疾患に関連した遺伝子変異を正すのに十分な量の化学修飾型sgRNAを投与することにより、対象において遺伝的疾患を予防または処置するための方法を提供する。

【0014】

II. 一般

本発明の実施は、他に指示がない限り、当業者の能力の範囲内にある、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノム科学、および組換えDNAの通常の技術を用いる。Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition (1989)、Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987))、the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995))、Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1987))参照。

【0015】

市販されていないオリゴヌクレオチドは、例えば、Van Devanter et .

al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984)に記載されているように、自動合成機を用いて、Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862 (1981)により初めて記載された固相ホスホラミダイトリエステル方法に従って、化学合成することができる。オリゴヌクレオチドの精製は、任意の当技術分野において認められた戦略、例えば、非変性アクリルアミドゲル電気泳動、またはPearson and Reanier, J. Chrom. 255: 137-149 (1983)に記載されているように陰イオン交換高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用いて実施される。

#### 【0016】

10

#### III. 定義

具体的に他に指示がない限り、本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されているのと同じ意味をもつ。加えて、本明細書に記載された方法または材料と類似した、または等価の任意の方法または材料を、本発明の実施に用いることができる。本発明のために、以下の用語が定義される。

#### 【0017】

本明細書で用いられる場合、用語「1つの(a)」、「1つの(an)」、または「その(the)」は、1つのメンバーに関する態様を含むだけでなく、1つより多いメンバーに関する態様も含む。例えば、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が明らかに他に規定しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「1つの細胞」への言及は、複数のそのような細胞を含み、「その作用物質」への言及は、当業者に知られた1つまたは複数の作用物質への言及を含むなどである。

20

#### 【0018】

用語「初代細胞」は、多細胞生物体から直接、単離された細胞を指す。初代細胞は、典型的には、集団倍加をほとんど起こしておらず、それゆえに、連続(腫瘍または人工的不死化)細胞株と比較して、それらが由来する組織の主要な機能性成分をより顕著に表している。ある場合には、初代細胞は、単離されている細胞であり、その後、すぐに用いられる。他の場合では、初代細胞は、無制限に分裂することができず、それゆえに、インビトロで長期間、培養することができない。

30

#### 【0019】

用語「ゲノム編集」は、1つまたは複数のヌクレアーゼおよび/またはニッカーゼを用いて、DNAが、標的DNA、例えば、細胞のゲノムから挿入、置換、または除去される一種の遺伝子操作を指す。ヌクレアーゼは、ゲノムにおいて所望の位置に、特異的な二本鎖切断(DSB)を生じさせ、細胞の内因性機構を利用して、相同組換え修復(HDR)(例えば、相同組換え)または非相同末端結合(NHEJ)により、引き起こされた切断を修復する。ニッカーゼは、ゲノムにおいて所望の位置に特異的な一本鎖切断を生じさせる。1つの非限定的例において、2つのニッカーゼは、標的DNAの向かい合わせのストランドに2個の一本鎖切断を生じさせるために用いることができ、それにより、平滑または突出末端を生み出す。標的DNA配列のゲノム編集を誘導するために任意の適切なヌクレアーゼを導入することができ、それらには、CRISPR関連タンパク質(Cas)ヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、他のエンド-またはエキソ-ヌクレアーゼ、それらのバリエーション、それらの断片、およびそれらの組合せが挙げられるが、それらに限定されない。特定の実施形態において、標的DNA配列のヌクレアーゼ媒介性ゲノム編集は、例えば、相同組換え修復(HDR)による正確なゲノム編集の効率を向上させるために、Casヌクレアーゼ(例えば、Cas9ポリペプチドまたはCas9 mRNA)と組み合わせて、本明細書に記載された修飾型単一ガイドRNA(sgRNA)を用いて、「誘導」または「モジュレート」(例えば、増強)することができる。

40

50

## 【0020】

用語「相同組換え修復」または「HDR」は、修復を導くための相同鋳型を用いて、二本鎖DNA切断を精密かつ正確に修復する、細胞における機構を指す。HDRの最も一般的な形は、相同組換え（HR）（ヌクレオチド配列が、2つの類似した、または同一のDNA分子の間で交換される一種の遺伝的組換え）である。

## 【0021】

用語「非相同末端結合」または「NHEJ」は、相同鋳型の必要性なしに、切断末端が直接的にライゲーションされる、二本鎖DNA切断を修復する経路を指す。

## 【0022】

用語「核酸」、「ヌクレオチド」、または「ポリヌクレオチド」は、一本鎖、二本鎖、または多重鎖のいずれかの形での、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、およびそれらのポリマーを指す。その用語には、一本鎖、二本鎖、もしくは多重鎖DNAもしくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、またはプリン塩基および/もしくはピリミジン塩基、もしくは他の天然、化学修飾型、生化学的修飾型、非天然、合成、もしくは誘導体化のヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれるが、それらに限定されない。いくつかの実施形態において、核酸は、DNA、RNA、およびそれらの類似体の混合物を含み得る。具体的に限定されない限り、その用語は、参照核酸と類似した結合性質を有し、かつ天然に存在するヌクレオチドと類似した様式で代謝される、天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む核酸を包含する。他に指示がない限り、特定の核酸配列はまた、明確に示された配列に加えて、その保存的に改変されたバリエーション（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、一塩基多型（SNP）、および相補的配列を暗に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1個または複数の選択された（または全ての）コドンの3番目の位置が、混合塩基および/またはデオキシイノシン残基と置換されている配列を生じさせることにより達成され得る（Batzler et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); およびRossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)）。核酸という用語は、遺伝子、遺伝子によってコードされるcDNA、およびmRNAと交換可能に用いられる。

## 【0023】

用語「ヌクレオチド類似体」または「修飾型ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの窒素塩基（例えば、シトシン（C）、チミン（T）もしくはウラシル（U）、アデニン（A）、またはグアニン（G））の中もしくは上に、ヌクレオシドの糖部分（例えば、リボース、デオキシリボース、修飾型リボース、修飾型デオキシリボース、6員環糖類似体、または鎖式糖類似体）の中もしくは上に、またはホスフェートの中もしくは上に、1つまたは複数の化学修飾（例えば、置換）を含むヌクレオチドを指す。

## 【0024】

用語「遺伝子」または「ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列」は、ポリペプチド鎖を産生するのに関与するDNAのセグメントを意味する。DNAセグメントは、遺伝子産物の転写/翻訳、および転写/翻訳の調節に関与する、コード領域の前および後の領域（リーダーおよびトレイラー）、加えて、個々のコードセグメント（エクソン）の間の介在配列（イントロン）を含み得る。

## 【0025】

用語「ポリペプチド」、「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のに、本明細書で交換可能に用いられる。その用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーに加えて、1個または複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工の化学的模倣体であるアミノ酸ポリマーに適用される。本明細書で用いられる場合、その用語は、アミノ酸残基が共有結合性ペプチド結合によって連結されている、完全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖を包含する。

## 【0026】

用語「バリエーション」は、天然に存在するものから逸脱する、生物体、菌株、遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または特性の一形態を指す。

## 【0027】

用語「相補性」は、核酸が、伝統的なワトソン・クリック型かまたは他の非伝統的型のいずれかにより、別の核酸配列と水素結合を形成する能力を指す。パーセント相補性は、第2の核酸配列と水素結合を形成することができる（例えば、ワトソン・クリック塩基対形成）、核酸分子における残基のパーセンテージを示す（例えば、10個のうちの5個、6個、7個、8個、9個、10個は、50%、60%、70%、80%、90%、および100%相補性である）。「完全に相補的な」とは、核酸配列の全ての連続した残基が、第2の核酸配列における連続した残基の同じ数と水素結合するだろうことを意味する。本明細書で用いられる場合、「実質的に相補的な」とは、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、もしくはそれ以上のヌクレオチドの領域に関して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%である相補性の程度を指し、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする2つの核酸を指す。

10

## 【0028】

ハイブリダイゼーションについての用語「ストリンジェントな条件」とは、標的配列と相補性を有する核酸が、主にその標的配列とハイブリダイズし、かつ非標的配列とは実質的にハイブリダイズしない、条件を指す。ストリンジェントな条件は、一般的に、配列依存性であり、いくつかの因子によって変わる。一般的に、配列が長ければ長いほど、その配列がその標的配列と特異的にハイブリダイズする温度は高くなる。ストリンジェントな条件の非限定的例は、Tijssen (1993), Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology - Hybridization With Nucleic Acid Probes Part 1, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay", Elsevier, N.Y. に詳細に記載されている。

20

30

## 【0029】

用語「ハイブリダイゼーション」は、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合により安定化している複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対形成、フーグスティーン結合により、または任意の他の配列特異的様式で、生じ得る。その複合体は、二重鎖構造を形成する2本のストランド、多重鎖複合体を形成する3本以上のストランド、単一の自己ハイブリッド形成ストランド、またはこれらの任意の組合せを含み得る。

## 【0030】

「組換え発現ベクター」は、宿主細胞において特定のポリヌクレオチド配列の転写を可能にする一連の特定化された核酸エレメントを含む、組換え的に、または合成的に作製された核酸構築物である。発現ベクターは、プラスミド、ウイルスゲノム、または核酸断片の部分であり得る。典型的には、発現ベクターは、プロモーターへ作動可能に連結された、転写されるべきポリヌクレオチドを含む。この文脈における「作動可能に連結された」とは、プロモーターがコード配列の転写を命令するように、エレメントの適切な生物学的機能を可能にする相対的位置に置かれた、ポリヌクレオチドコード配列およびプロモーターなどの、2つ以上の遺伝的エレメントを意味する。用語「プロモーター」は、核酸の転写を命令する核酸制御配列のアレイを指すように、本明細書で用いられる。本明細書で用いられる場合、プロモーターは、ポリメラーゼII型プロモーターの場合のTATAエレメントなど、転写開始部位の近くに必要な核酸配列を含む。プロモーターはまた、任意で

40

50

、転写開始部位から数千塩基対ほどの所に位置することができる遠位エンハンサーまたはリプレッサーエレメントを含む。発現ベクターに存在し得る他のエレメントには、転写を増強するエレメント（例えば、エンハンサー）、および転写を終結するエレメント（例えば、ターミネーター）、ならびに発現ベクターから産生された組換えタンパク質にある特定の結合親和性または抗原性を与えるエレメントが挙げられる。

#### 【0031】

「組換え」とは、遺伝子改変されたポリヌクレオチド、ポリペプチド、細胞、組織、または生物体を指す。例えば、組換えポリヌクレオチド（または組換えポリヌクレオチドのコピーもしくは相補体）は、よく知られた方法を用いて操作されているものである。第2のポリヌクレオチド（例えば、コード配列）へ作動可能に連結されたプロモーターを含む組換え発現カセットは、ヒトの操作（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1989) または Current Protocols in Molecular Biology Volumes 1-3, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998) に記載された方法による）の結果として、第2のポリヌクレオチドに対して異種性であるプロモーターを含み得る。組換え発現カセット（または発現ベクター）は、典型的には、天然で見出されない組合せでポリヌクレオチドを含む。例えば、ヒトが操作した制限部位またはプラスミドベクター配列は、他の配列由来のプロモーターに隣接し、または離れることができる。組換えタンパク質は、組換えポリヌクレオチドから発現するものであり、組換え細胞、組織、および生物体は、組換え配列（ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド）を含むものである。

#### 【0032】

用語「一塩基多型」または「SNP」は、対立遺伝子内を含む、ポリヌクレオチドに関して、単一ヌクレオチドの変化を指す。これは、1個のヌクレオチドの別のヌクレオチドによる置換、および単一ヌクレオチドの欠失または挿入を含み得る。最も典型的には、SNPは、2対立遺伝子のマーカーであるが、3対立遺伝子および4対立遺伝子のマーカーもまた存在し得る。非限定的例として、SNP A\Cを含む核酸分子は、多型の位置にCまたはAを含み得る。

#### 【0033】

細胞培養自体または培養の過程に言及する場合の用語「培養する」、「培養すること」、「成長する」、「成長すること」、「維持する」、「維持すること」、「増殖する」、「増殖すること」などは、細胞（例えば、初代細胞）が、制御された条件下、例えば、生存に適した条件下で、その通常の環境の外側で維持されることを意味するように、交換可能に用いることができる。培養された細胞は、生存することが可能になり、培養の結果として、細胞成長、静止、分化、または分裂を生じ得る。その用語は、一部の細胞は、自然に、死、または老化し得るため、培養中の全ての細胞が、生存し、成長し、または分裂することを含意するわけではない。細胞は、典型的には、培地中で培養され、その培地は、培養の経過中に交換することができる。

#### 【0034】

用語「対象」、「患者」、および「個体」は、ヒトまたは動物を含むように、本明細書で交換可能に用いられる。例えば、動物対象は、哺乳類、霊長類（例えば、サル）、家畜動物（例えば、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、またはヤギ）、コンパニオンアニマル（例えば、イヌ、ネコ）、実験動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、トリ）、獣医学的意義のある動物、または経済的意義のある動物であり得る。

#### 【0035】

本明細書で用いられる場合、用語「投与すること」には、対象への経口投与、局所的接触、坐剤としての投与、静脈内、腹腔内、筋肉内、病巣内、髄腔内、鼻腔内、または皮下の投与が挙げられる。投与は、非経口および経粘膜（例えば、頬側、舌下、口蓋、歯肉、

10

20

30

40

50

鼻、膣、直腸、または経皮)を含む任意の経路による。非経口投与には、例えば、静脈内、筋肉内、細動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、および頭蓋内が挙げられる。送達他の様式には、リポソーム製剤の使用、静脈内注入、経皮パッチなどが挙げられるが、それらに限定されない。

【0036】

用語「処置すること」は、非限定的に治療的利益および/または予防的利益を含む、有益な、または所望の結果を得るためのアプローチを指す。治療的利益とは、処置の下での、1つまたは複数の疾患、状態、または症状における任意の治療的に関連した向上または効果を意味する。予防的利益について、疾患、状態、もしくは症状がまだ顕在化されていないかもしれないが、特定の疾患、状態、もしくは症状を発生するリスクがある対象に、または疾患の生理的症状の1つもしくは複数を報告している対象に、組成物が投与され得る。

10

【0037】

用語「有効量」または「十分な量」は、有益な、または所望の結果をもたらすのに十分である作用物質(例えば、Casヌクレアーゼ、修飾型単一ガイドRNAなど)の量を指す。治療的有效量は、処置されている対象および疾患状態、対象の体重および年齢、疾患状態の重症度、投与の様式などの1つまたは複수에依存して変わり得、それは、当業者により容易に決定することができる。特定の量は、選択された特定の作用物質、標的細胞型、対象における標的細胞の位置、従われるべき投与計画、それが他の作用物質と併用して投与されるかどうか、投与のタイミング、およびそれが運ばれる物理的送達系の1つまたは複수에依存して変わり得る。

20

【0038】

用語「薬学的に許容される担体」は、作用物質(例えば、Casヌクレアーゼ、修飾型単一ガイドRNAなど)の細胞、生物体、または対象への投与を助ける物質を指す。「薬学的に許容される担体」は、組成物または製剤に含まれ得、かつ患者に有意に有害な毒性的効果を引き起こさない担体または賦形剤を指す。薬学的に許容される担体の非限定的例には、水、NaCl、生理食塩水、乳酸リンゲル液、規定のスクロース、規定のグルコース、結合剤、増量剤、崩壊剤、潤滑剤、コーティング剤、甘味剤、香料および着色剤などが挙げられる。他の薬学的担体が本発明において有用であることを当業者は認識しているだろう。

30

【0039】

CRISPRシステムの成分に関しての用語「安定性を増加させること」は、CRISPRシステムの任意の分子成分の構造を安定化させる修飾を指す。その用語は、CRISPRシステムの任意の分子成分の分解を減少、阻害、減弱、または低下させる修飾を含む。

【0040】

CRISPRシステムの成分に関しての用語「特異性を増加させること」は、CRISPRシステムの任意の分子成分の特異性活性(例えば、オンターゲット活性)を増加させる修飾を指す。その用語は、CRISPRシステムの任意の分子成分の非特異性活性(例えば、オフターゲット活性)を減少、阻害、減弱、または低下させる修飾を含む。

40

【0041】

CRISPRシステムの成分に関しての用語「毒性を減少させること」は、CRISPRシステムの任意の分子成分の細胞、生物体、対象などへの毒性効果を減少、阻害、減弱、または低下させる修飾を指す。

【0042】

CRISPRシステムの成分に関し、遺伝子調節の文脈における用語「増強した活性」は、ゲノム編集および/または遺伝子発現を誘導、モジュレート、調節、または制御する効率および/または頻度の増加または向上を指す。

【0043】

表示数値に関しての用語「約」は、その値から10%をプラスまたはマイナスした値の

50

範囲を含み得る。例えば、量「約 10」は、9、10、および 11 の表示数を含む、9 から 11 までの量を含む。表示数値に関しての用語「約」はまた、その値から 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または 1% をプラスまたはマイナスした値の範囲を含み得る。

#### 【0044】

#### IV. 実施形態の説明

本発明は、細胞において標的核酸の遺伝子調節を誘導するための方法を提供する。本発明は、（例えば、エクスピボ治療用にインビトロで培養された）初代細胞において、または（例えば、インビボ治療用の）ヒトなどの対象内の細胞において、標的核酸のゲノム編集および/または遺伝子発現の阻害もしくは活性化を増強する修飾型単一ガイド RNA (sgRNA) を用いることを含む。本発明はまた、疾患に関連した標的遺伝子における変異を正すための正確なゲノム編集を増強することによる、対象において疾患を予防または処置するための方法を提供する。本発明は、ヌクレアーゼ媒介性ゲノム編集技術を受け入れられる、いかなる細胞型に関しても、かついかなる遺伝子座においても用いることができる。

#### 【0045】

第 1 の態様において、本発明は、初代細胞において標的核酸の遺伝子調節を誘導する（例えば、惹起する、モジュレートする、増強するなど）ための方法であって、

(a) 標的核酸に相補的な第 1 のヌクレオチド配列、および CRISPR 関連タンパク質 (Cas) ポリペプチドと相互作用する第 2 のヌクレオチド配列を含む修飾型単一ガイド RNA (sgRNA) であって、前記第 1 のヌクレオチド配列および/または前記第 2 のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの 1 個または複数が修飾型ヌクレオチドである、修飾型単一ガイド RNA ; ならびに

(b) Cas ポリペプチド、Cas ポリペプチドをコードする mRNA、および/または Cas ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを初代細胞へ導入するステップを含み、

前記修飾型 sgRNA が Cas ポリペプチドを標的核酸へ導き、

前記修飾型 sgRNA が、対応する非修飾型 sgRNA と比較して増強した活性で標的核酸の遺伝子調節を誘導する、方法を提供する。

#### 【0046】

いくつかの実施形態において、増強した活性は、修飾型 sgRNA の増加した安定性および/または修飾型 sgRNA の標的核酸に対する増加した特異性を含む。

#### 【0047】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、標的 DNA または標的 RNA を含む。標的核酸の遺伝子調節は、標的核酸による特定の遺伝子産物（例えば、タンパク質または RNA）の産生を増加または減少させ得る、細胞により用いられる任意の機構を包含し、標的核酸のゲノム編集、または標的核酸の遺伝子発現のモジュレーション（例えば、阻害または活性化）を含む。ある例では、遺伝子調節は、標的 DNA のゲノム編集を含む。ゲノム編集は、標的 DNA の相同組換え修復 (HDR) または非相同末端結合 (NHEJ) であり得る。他の例では、遺伝子調節は、標的 DNA または標的 RNA の遺伝子発現を、エンドヌクレアーゼ欠損 Cas ポリペプチドを用いてモジュレートすること（例えば、阻害すること、または活性化すること）を含む。

#### 【0048】

いくつかの実施形態において、方法は、組換えドナー修復鋳型を初代細胞へ導入することをさらに含む。ある特定の例では、組換えドナー修復鋳型は、標的 DNA の 2 つの重複しない相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列は、ゲノム編集を受ける標的 DNA に対応するヌクレオチド配列の 5' 末端および 3' 末端に位置する。他の例では、組換えドナー修復鋳型は、一塩基多型 (SNP) を正すための変異をコードするヌクレオチド配列を含む合成の一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN)

）鋳型、および標的DNAの2つの重複しない相同部分を含む2つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列は、変異をコードするヌクレオチド配列の5'末端および3'末端に位置する。

#### 【0049】

いくつかの実施形態において、初代細胞は、修飾型sgRNAおよびCasポリペプチドを初代細胞へ導入する前に、多細胞生物体から単離される。多細胞生物体は、植物、多細胞原生生物、多細胞真菌、または哺乳類（例えば、ヒト）などの動物であり得る。ある特定の例では、初代細胞は、幹細胞、免疫細胞、およびそれらの組合せからなる群から選択される。幹細胞の非限定的例には、CD34+HSPCなどの造血幹細胞・造血前駆細胞（HSPC）、間葉幹細胞、神経幹細胞、臓器幹細胞、およびそれらの組合せが挙げられる。免疫細胞の非限定的例には、T細胞（例えば、CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、腫瘍浸潤細胞（TILs）、メモリーT細胞、メモリーT幹細胞、エフェクターT細胞）、ナチュラルキラー細胞、単球、末梢血単核細胞（PBMC）、末梢血リンパ球（PBL）、およびそれらの組合せが挙げられる。他の実施形態において、修飾型sgRNAおよびCasポリペプチドを初代細胞へ導入した後に、初代細胞またはその子孫（例えば、初代細胞に由来した細胞）が多細胞生物体（例えば、ヒト）へ戻される（例えば、任意の許容される送達系および送達経路によって投与される）。

10

#### 【0050】

いくつかの実施形態において、初代細胞は、初代細胞集団を含む。ある例では、修飾型sgRNAが、初代細胞集団の少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%において標的核酸の遺伝子調節を誘導する。他の例では、初代細胞集団は、少なくとも約10個、 $10^2$ 個、 $10^3$ 個、 $10^4$ 個、 $10^5$ 個、 $10^6$ 個、 $10^7$ 個、 $10^8$ 個、または $10^9$ 個の初代細胞を含む。ある特定の例では、遺伝子調節は、初代細胞集団における標的DNAのゲノム編集（例えば、HDRまたはNHEJ）を含む。ある特定の他の例では、遺伝子調節は、エンドヌクレアーゼ欠損Casポリペプチドを用いた、初代細胞集団において標的DNAまたは標的RNAの遺伝子発現をモジュレートすること（例えば、阻害すること、または活性化すること）を含む。非限定的例として、修飾型sgRNAは、（例えば、リボ核タンパク質（RNP）複合体としての）CasポリペプチドまたはCasポリペプチドをコードするmRNAと共に、初代T細胞へ修飾型sgRNAを導入した後、初代T細胞集団の少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、または60%においてHDR（例えば、イン/デル頻度）を誘導することができる。別の非限定的例として、修飾型sgRNAは、（例えば、RNP複合体としての）CasポリペプチドまたはCasポリペプチドをコードするmRNAと共に、初代造血幹細胞・造血前駆細胞（HSPC）へ修飾型sgRNAを導入した後、初代造血幹細胞・造血前駆細胞（HSPC）集団の少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、または60%においてHDR（例えば、イン/デル頻度）を誘導することができる。

20

30

#### 【0051】

いくつかの実施形態において、修飾型sgRNAの第1のヌクレオチド配列および/または第2のヌクレオチド配列における1個または複数の修飾型ヌクレオチドは、リボース基、リン酸基、核酸塩基、またはそれらの組合せにおける修飾を含む。リボース基における修飾は、リボース基の2'位における修飾であり得る。ある例では、リボース基の2'位における修飾は、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、および2'-O-(2-メトキシエチル)からなる群から選択される。リン酸基における修飾は、ホスホロチオエート修飾であり得る。

40

#### 【0052】

特定の実施形態において、修飾型sgRNAの第1のヌクレオチド配列および/または第2のヌクレオチド配列における1個または複数の修飾型ヌクレオチドは、2'-O-メチル（M）ヌクレオチド、2'-O-メチル3'-ホスホロチオエート（MS）ヌクレオ

50



チド、2'-O-メチル3'-チオP A C E ( M S P )ヌクレオチド、またはそれらの組合せを含む。ある場合では、修飾型 s g R N A は、第1のヌクレオチド配列および/または第2のヌクレオチド配列において1個または複数のM Sヌクレオチドを含む。ある場合では、修飾型 s g R N A は、第1のヌクレオチド配列および/または第2のヌクレオチド配列において1個または複数のM S Pヌクレオチドを含む。ある場合では、修飾型 s g R N A は、第1のヌクレオチド配列および/または第2のヌクレオチド配列において、1個または複数のM Sヌクレオチドおよび1個または複数のM S Pヌクレオチドを含む。ある場合では、修飾型 s g R N A は、第1のヌクレオチド配列および/または第2のヌクレオチド配列においてMヌクレオチドを含まない。ある場合では、修飾型 s g R N A は、第1のヌクレオチド配列および/または第2のヌクレオチド配列において、修飾型ヌクレオチドとしてM Sヌクレオチドおよび/またはM S Pヌクレオチドだけを含む。他の場合では、修飾型 s g R N A は、第1のヌクレオチド配列および/または第2のヌクレオチド配列において、1個もしくは複数のM Sヌクレオチドおよび/または1個もしくは複数のM S Pヌクレオチドを含み、第1のヌクレオチド配列および/または第2のヌクレオチド配列において、1個または複数のMヌクレオチドをさらに含み得る。

#### 【0053】

いくつかの実施形態において、修飾型 s g R N A の第1のヌクレオチド配列は、約20ヌクレオチド長である。ある例では、第1のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上が、修飾型ヌクレオチドである。ある特定の例では、第1のヌクレオチド配列（例えば、約20ヌクレオチド長の第1のヌクレオチド配列）におけるヌクレオチドの約2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個が修飾型ヌクレオチドである。他の例では、第1のヌクレオチド配列（例えば、約20ヌクレオチド長の第1のヌクレオチド配列）におけるヌクレオチドの全部が修飾型ヌクレオチドである。ある例では、修飾型ヌクレオチドは、第1のヌクレオチド配列の5'末端（例えば、5'末端の終端ヌクレオチド）に、もしくは5'末端の近く（例えば、5'末端の終端ヌクレオチドから1、2、3、4、または5ヌクレオチド内）に、および/または第1のヌクレオチド配列内の内部の位置に、位置する。他の例では、第1のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの約10%から約30%までが修飾型ヌクレオチドである。

#### 【0054】

いくつかの実施形態において、修飾型 s g R N A の第2のヌクレオチド配列は、約80ヌクレオチド長である。ある例では、第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上が、修飾型ヌクレオチドである。ある特定の例では、第2のヌクレオチド配列（例えば、約80ヌクレオチド長の第2のヌクレオチド配列）におけるヌクレオチドの約2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個、51個、52個、53個、54個、55個、56個、57個、58個、59個、60個、61個、62個、63個、64個、65個、66個、67個、68個、69個、70個、71個、72個、73個、74個、75個、76個、77個、78個、79個、または80個が修飾型ヌクレオチドである。他の例では、第2のヌクレオチド配列（例えば、約80ヌクレオチド長の第2のヌクレオチド配列）におけるヌクレオチドの全部が修飾型ヌクレオチドである。ある例では、修飾型ヌクレオチドは、第2のヌクレオチド配列の3'末端（例えば、3'末端の終端ヌクレオチド）に、もしくは3'末端の近く（例えば、3'末端から1、2、3、4、または5ヌクレオチド内）に、および/または第2のヌクレオチド配列内の内部の位置に、位置する。他の例では、第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの約1%から約10%までが

修飾型ヌクレオチドである。

【0055】

ある特定の実施形態において、修飾型 sgRNA は、第1のヌクレオチド配列の5'末端（例えば、5'末端の末端ヌクレオチド）から、または5'末端の近く（例えば、5'末端の末端ヌクレオチドから1、2、3、4、または5ヌクレオチド内）から始まる1個、2個、または3個の連続した、または非連続の修飾型ヌクレオチド、および第2のヌクレオチド配列の3'末端（例えば、3'末端の末端ヌクレオチド）から、または3'末端の近く（例えば、3'末端から1、2、3、4、または5ヌクレオチド内）から始まる1個、2個、または3個の連続した、または非連続の修飾型ヌクレオチドを含む。

【0056】

ある例では、修飾型 sgRNA は、第1のヌクレオチド配列の5'末端（例えば、5'末端の末端ヌクレオチド）に、または5'末端の近く（例えば、5'末端の末端ヌクレオチドから1、2、3、4、または5ヌクレオチド内）に1個の修飾型ヌクレオチド、および第2のヌクレオチド配列の3'末端（例えば、3'末端の末端ヌクレオチド）に、または3'末端の近く（例えば、3'末端から1、2、3、4、または5ヌクレオチド内）に1個の修飾型ヌクレオチドを含む。

【0057】

他の例では、修飾型 sgRNA は、第1のヌクレオチド配列の5'末端（例えば、5'末端の末端ヌクレオチド）から、または5'末端の近く（例えば、5'末端の末端ヌクレオチドから1、2、3、4、または5ヌクレオチド内）から始まる2個の連続した、または非連続の修飾型ヌクレオチド、および第2のヌクレオチド配列の3'末端（例えば、3'末端の末端ヌクレオチド）から、または3'末端の近く（例えば、3'末端から1、2、3、4、または5ヌクレオチド内）から始まる2個の連続した、または非連続の修飾型ヌクレオチドを含む。

【0058】

さらに他の例では、修飾型 sgRNA は、第1のヌクレオチド配列の5'末端（例えば、5'末端の末端ヌクレオチド）から、または5'末端の近く（例えば、5'末端の末端ヌクレオチドから1、2、3、4、または5ヌクレオチド内）から始まる3個の連続した、または非連続の修飾型ヌクレオチド、および第2のヌクレオチド配列の3'末端（例えば、3'末端の末端ヌクレオチド）から、または3'末端の近く（例えば、3'末端から1、2、3、4、または5ヌクレオチド内）から始まる3個の連続した、または非連続の修飾型ヌクレオチドを含む。

【0059】

特定の実施形態において、修飾型 sgRNA は、第1のヌクレオチド配列の5'末端に3個の連続した修飾型ヌクレオチド、および第2のヌクレオチド配列の3'末端に3個の連続した修飾型ヌクレオチドを含む。

【0060】

いくつかの実施形態において、修飾型 sgRNA は化学合成される。他の実施形態において、遺伝子調節を誘導するための方法は、複数の修飾型 sgRNA を用いて、単一の標的核酸配列または異なる標的核酸配列の多重化遺伝子調節（例えば、ゲノム編集または遺伝子発現をモジュレートすること）を含む。特定の実施形態において、多重化遺伝子調節は、対応する非修飾型 sgRNA の使用と比較して、より効率性および/または一貫性が高い。ある特定の例では、複数の修飾型 sgRNA は、少なくとも2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個、またはそれ以上の異なる修飾型 sgRNA を含み、各修飾型 sgRNA が、異なる標的核酸に方向づけられている。他の例では、複数の修飾型 sgRNA は、少なくとも2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個、またはそれ以上の異なる修飾型 sgRNA を含み、各修飾型 sgRNA が、同じ標的核酸に方向づけられている。

【0061】

ある特定の実施形態において、Casポリペプチドは、Casポリペプチドバリエーション

10

20

30

40

50

またはCasポリペプチド断片である。特定の実施形態において、CasポリペプチドはCas9ポリペプチド、そのバリエーション、またはその断片である。他の実施形態において、初代細胞へ導入するステップは、初代細胞を（例えば、ヌクレオフェクションによって）エレクトロポレーションすることを含む。

【0062】

第2の態様において、本発明は、対象において遺伝的疾患を予防または処置するための方法であって、

遺伝的疾患に関連した標的遺伝子における変異を正すのに十分な量で修飾型単一ガイドRNA（sgRNA）を対象に投与するステップであって、前記修飾型sgRNAが、標的遺伝子に相補的な第1のヌクレオチド配列、およびCRISPR関連タンパク質（Cas）ポリペプチドと相互作用する第2のヌクレオチド配列を含み、かつ前記第1のヌクレオチド配列および/または前記第2のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの1個または複数が修飾型ヌクレオチドである、ステップを含む、方法を提供する。

【0063】

いくつかの実施形態において、遺伝的疾患は、X連鎖重症複合免疫不全症、鎌状赤血球貧血、サラセミア、血友病、腫瘍症、癌、加齢黄斑変性、統合失調症、トリヌクレオチドリピート障害、脆弱X症候群、プリオン関連障害、筋萎縮性側索硬化症、薬物依存、自閉症、アルツハイマー病、パーキンソン病、嚢胞性線維症、血液凝固性疾患または障害、炎症、免疫関連疾患または障害、代謝性疾患、肝臓疾患および障害、腎臓疾患および障害、筋肉/骨格疾患および障害、神経学的および神経細胞の疾患および障害、心血管疾患および障害、肺疾患および障害、眼疾患および障害、ならびにウイルス感染症（例えば、HIV感染症）からなる群から選択される。

【0064】

いくつかの実施形態において、方法は、Casポリペプチド、CasポリペプチドをコードするmRNA、および/またはCasポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを対象に投与するステップをさらに含む。

【0065】

いくつかの実施形態において、方法は、対象に組換えドナー修復鋳型を投与するステップをさらに含む。ある特定の例では、組換えドナー修復鋳型は、標的遺伝子の2つの重複しない相同部分を含む2つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列は、ゲノム編集を受ける標的遺伝子に対応するヌクレオチド配列の5'末端および3'末端に位置する。他の例では、組換えドナー修復鋳型は、標的遺伝子における一塩基多型（SNP）を正すための変異をコードするヌクレオチド配列を含む合成の一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ssODN）鋳型、および標的遺伝子の2つの重複しない相同部分を含む2つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列は、前記変異をコードするヌクレオチド配列の5'末端および3'末端に位置する。

【0066】

ある特定の実施形態において、修飾型sgRNAを投与することは、対応する非修飾型sgRNAを投与することと比較して、標的遺伝子における変異を正すCasポリペプチドの効果を増強する。対象において遺伝的疾患を予防または処置するための方法に用いられる修飾型sgRNAに関連した非限定的実施形態は、上に記載されている。

【0067】

いくつかの実施形態において、修飾型sgRNA、Casポリペプチド、および/または組換えドナー修復鋳型は、薬学的に許容される担体と共に対象に投与される。

【0068】

いくつかの実施形態において、修飾型sgRNA、Casポリペプチド、および/または組換えドナー修復鋳型は、ナノ粒子、リポソーム、ミセル、ビロソーム、核酸複合体、およびそれらの組合せからなる群から選択される送達系によって対象へ投与される。ある特定の例では、核酸複合体は、Casポリペプチドと複合体化した修飾型sgRNAを含

10

20

30

40

50

む。

#### 【0069】

いくつかの実施形態において、修飾型 sgRNA、Casポリペプチド、および/または組換えドナー修復鋳型は、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、皮下、細動脈内、脳室内、頭蓋内、病巣内、髄腔内、局所的、経粘膜、鼻腔内、およびそれらの組合せからなる群から選択される送達経路によって対象へ投与される。

#### 【0070】

本明細書に記載された化学修飾型 sgRNAは、任意のCRISPR関連技術に関して用いることができ、そのCRISPR関連技術には、遺伝子発現の阻害のためのCRISPRi、遺伝子発現の活性化のためのCRISPRa、ゲノム遺伝子座の動的可視化のためのCRISPR画像化ツール、ならびにCRISPR媒介性RNA認識および切断が挙げられるが、それらに限定されない。ある場合では、sgRNAは、小さい分子またはタンパク質の、画像化、および/またはインビトロ細胞もしくはインビボ細胞への送達のために用いることができる。したがって、sgRNAは、研究および治療的適用に用いられ得る。

#### 【0071】

##### A. CRISPR/Casシステム

ゲノム改変のCRISPR/Casシステムは、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9ヌクレアーゼ）またはそのバリエーションもしくは断片、Casヌクレアーゼを標的ゲノムDNAへ向けるガイド配列およびCasヌクレアーゼと相互作用するスキャフォールド配列（例えば、tracrRNA）を含有するDNAターゲティングRNA（例えば、修飾型sgRNA）、ならびに任意で、ドナー修復鋳型を含む。ある例では、変異D10A、H840A、D839A、およびH863Aの1つまたは複数を含むCas9変異体などのCasヌクレアーゼのバリエーション、またはCas9ニッカーゼを用いることができる。他の例では、所望の性質（例えば、一本鎖もしくは二本鎖切断を生じ、および/または遺伝子発現をモジュレートする能力がある）をもつCasヌクレアーゼまたはそのバリエーションの断片を用いることができる。ドナー修復鋳型は、蛍光タンパク質または抗生物質耐性マーカーなどのレポーターポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、および標的DNAと相同であり、かつ遺伝子改変の部位に隣接する相同アームを含み得る。あるいは、ドナー修復鋳型は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ssODN）であり得る。

#### 【0072】

##### 1. Casヌクレアーゼおよびそのバリエーション

CRISPR（クラスター化された規則的な配置の短い回文配列リピート（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat））/Cas（CRISPR関連タンパク質）ヌクレアーゼシステムは、ゲノム操作のために用いることができる、細菌システムに基づいた人工ヌクレアーゼシステムである。それは、多くの細菌および古細菌の適応免疫応答の部分に基づいている。ウイルスまたはプラスミドが細菌に侵入した時、侵入者のDNAのセグメントが、「免疫」応答によりCRISPR RNA（crRNA）へ変換される。その後、crRNAは、tracrRNAと呼ばれる別の型のRNAと部分的相補性の領域を通して会合して、Cas（例えば、Cas9）ヌクレアーゼを、「プロトスペーサー」と呼ばれる標的DNAにおけるcrRNAと相同性の領域へ導く。Cas（例えば、Cas9）ヌクレアーゼは、crRNA転写産物内に含有される20ヌクレオチドガイド配列によって特定化された部位において、前記DNAを切断して、二本鎖切断点に平滑末端を生じる。Cas（例えば、Cas9）ヌクレアーゼは、部位特異的DNA認識および切断のためにcrRNAとtracrRNAの両方を必要とする。このシステムは、現在、crRNAとtracrRNAが1つの分子（「単一ガイドRNA」または「sgRNA」）へ組み合わせられ得るように操作されており、単一ガイドRNAのcrRNA等価部分は、Cas（例えば、Cas9）ヌクレアーゼを、任意の所望の配列に向けるように導くために操作することができる（例えば、Jinek et al. (2012) Science,

337:816-821; Jinek et al. (2013) eLife, 2:e00471; Segal (2013) eLife, 2:e00563 参照)。したがって、CRISPR/Cas システムは、細胞のゲノムにおける所望の標的地点に二本鎖切断を生じ、かつ相同組換え修復(HDR)または非相同末端結合(NHEJ)によって、誘導された切断を修復する細胞の内因性機構を利用するように操作することができる。

#### 【0073】

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、DNA切断活性を有する。Casヌクレアーゼは、標的DNA配列における位置において、1つまたは両方の鎖の切断を命令することができる。例えば、Casヌクレアーゼは、標的DNA配列の一本鎖を切断する、1個または複数の不活性化触媒ドメインを有するニッカーゼであり得る。

10

#### 【0074】

Casヌクレアーゼの非限定的例には、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(Csn1およびCsx12としても知られている)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、それらの相同体、それらのバリエーション、それらの断片、それらの変異体、およびそれらの誘導体が挙げられる。Casヌクレアーゼの3つの主要な型(I型、II型、およびIII型)、ならびに5個のI型、3個のII型、および2個のIII型タンパク質を含む10個のサブタイプがある(例えば、Hochstrasser and Doudna, Trends Biochem Sci, 2015:40(1):58-66 参照)。II型Casヌクレアーゼには、Cas1、Cas2、Csn2、およびCas9が挙げられる。これらのCasヌクレアーゼは当業者に知られている。例えば、化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)野生型Cas9ポリペプチドのアミノ酸配列が、例えば、NCBI参照配列番号NP\_269215に示されており、ストレプトコッカス・サーモフィラス(*Streptococcus thermophilus*)野生型Cas9ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば、NCBI参照配列番号WP\_011681470に示されている。本発明において有用であるCRISPR関連エンドヌクレアーゼは、例えば、米国特許出願公開第2014/0068797号、第2014/0302563号、および第2014/0356959号に開示されている。

20

30

#### 【0075】

Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9ポリペプチドは、様々な細菌種に由来し得、その細菌種には、ベイルネラ・アティピカ(*Veillonella atypica*)、フソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)、フィリファクター・アロキス(*Filifactor alocis*)、ソロバクテリウム・ムーレイ(*Solobacterium moorei*)、コプロコッカス・カウス(*Coproccoccus catus*)、トレボネーマ・デンティコーラ(*Treponema denticola*)、ペプトニフィラス・デュエルデニ(*Peptoniphilus duerdenii*)、カテニバクテリウム・ミツオカイ(*Catenibacterium mitsuokai*)、ストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)、リステリア・イノキュア(*Listeria innocua*)、スタフィロコッカス・シュードインターメディウス(*Staphylococcus pseudintermedius*)、アシダミノコッカス・インテスティン(*Acidaminococcus intestine*)、オルセネラ・ウリ(*Olsenella uli*)、オエノコッカス・キタハラエ(*Oenococcus kitaharae*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*)、ラクトバチルス・ラムノーサス(*Lactobacillus*

40

50

*us rhamnosus* )、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*)、フィネゴルディア・マグナ (*Finegoldia magna*)、  
 マイコプラズマ・モービレ (*Mycoplasma mobile*)、マイコプラズマ・  
 ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*)、マイコプラ  
 ズマ・オビニューモニアエ (*Mycoplasma ovipneumoniae*)、マ  
 イコプラズマ・カニス (*Mycoplasma canis*)、マイコプラズマ・シノビ  
 アエ (*Mycoplasma synoviae*)、ユウバクテリウム・レクターレ (*Eubacterium rectale*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス、ユウ  
 バクテリウム・ドリクム (*Eubacterium dolichum*)、ラクトバチル  
 ス・コリニフォルミス亜種トルクエン (*Lactobacillus corynif* 10  
*ormis subsp. Torquens*)、イリオバクター・ポリトロパス (*Ilyobacter polytropus*)、ルミノコッカス・アルブス (*Rumino*  
*coccus albus*)、アッカーマンシア・ムシニフィラ (*Akkermansia muciniphila*)、アシドサーマス・セルロリティカス (*Acidothe*  
*rmus cellulolyticus*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・デンティウム (*Bifidobacterium dentium*)、コリネバクテリウム・ジフテリアエ  
 (*Corynebacterium diphtheriae*)、エルシミクロビウム・  
 ミヌタム (*Elusimicrobium minutum*)、ニトラティフラクター・  
 サルスガイニス (*Nitratifractor salsuginis*)、スファエロ 20  
 カエタ・グロブス (*Sphaerochaeta globus*)、フィブロバクター・  
 サクシノゲネス亜種サクシノゲネス (*Fibrobacter succinogene*  
*s subsp. Succinogenes*)、バクテロイデス・フラギリス (*Bac*  
*teroides fragilis*)、カプノサイトファガ・オクラセア (*Capno*  
*cytophaga ochracea*)、ロドシュードモナス・パルストリス (*Rho*  
*dopseudomonas palustris*)、プレボテラ・ミカンス (*Pre*  
*votella micans*)、プレボテラ・ルミニコーラ (*Prevotella*  
*ruminicola*)、フラボバクテリウム・コラムナーレ (*Flavobacte*  
*rium columnare*)、アミノモナス・パウシボランス (*Aminomona*  
*s paucivorans*)、ロドスピリラム・ルブラム (*Rhodospirill* 30  
*um rubrum*)、カンジダタス・プニセイスピリルム・マリナム (*Candida*  
*tus Puniceispirillum marinum*)、ベルミネフロバクター・  
 エイセニアエ (*Verminephrobacter eiseniae*)、ラルスト  
 ニア・シジジイ (*Ralstonia syzygii*)、ディノロセオバクター・シバ  
 エ (*Dinoroseobacter shibae*)、アゾスピリルム (*Azospiri*  
*llum*)、ニトロバクター・ハンブルゲンシス (*Nitrobacter ham*  
*burgensis*)、ブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*)、ウオリ  
 ネラ・サクシノゲネス (*Wolinella succinogenes*)、キャンピロ  
 バクター・ジェジュニ亜種ジェジュニ (*Campylobacter jejuni* 40  
*subsp. Jejuni*)、ヘリコバクター・ムステラエ (*Helicobacter*  
*mustelae*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、アシ  
 ドボラクス・エブレウス (*Acidovorax ebreus*)、クロストリジウム・  
 パーフリンゲンス (*Clostridium perfringens*)、パルビバクラ  
 ム・ラバメンティボランス (*Parvibaculum lavamentivorans*)、ロゼブリア・インテスティナリス (*Roseburia intestinalis*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、パスツレラ・ム  
 ルトシダ亜種ムルトシダ (*Pasteurella multocida subsp.*  
*Multocida*)、ステレラ・ワズワースエンシス (*Sutterella wadsworthensis*)、プロテオバクテリア (*proteobacterium*)  
 、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、パ 50

ラステレラ・エクスクレメンチホミニス (*Parasutterella excrementihominis*)、ウォリネラ・サクシノゲネス (*Wolinella succinogenes*)、およびフランシセラ・ノビシダ (*Francisella novicida*) が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0076】

「Cas9」は、RNAガイド型二本鎖DNA結合性ヌクレアーゼタンパク質またはニッカーゼタンパク質を指す。野生型Cas9ヌクレアーゼは、異なるDNA鎖を切断する2つの機能性ドメイン、例えば、RuvCおよびHNHを有する。Cas9は、両方の機能性ドメインが活性である場合、ゲノムDNA（標的DNA）において二本鎖切断を誘導することができる。Cas9酵素は、コリネバクテリウム属 (*Corynebacter*)、ステレラ属 (*Sutterella*)、レジオネラ属 (*Legionella*)、トレポネマ属 (*Treponema*)、フィリファクター属 (*Filifactor*)、ユウバクテリウム属 (*Eubacterium*)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*)、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*)、マイコプラズマ属 (*Mycoplasma*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides*)、フラビボラ属 (*Flavivibrio*)、フラボバクテリウム属 (*Flavobacterium*)、スファエロカエタ属 (*Sphaerochaeta*)、アゾスピリillum属 (*Azospirillum*)、グルコンアセトバクテリウム属 (*Glucacetobacter*)、ナイセリア属 (*Neisseria*)、ロゼブリア属 (*Roseburia*)、パルビバクテリウム属 (*Parvibaculum*)、スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*)、ニトラティフラクター属 (*Nitratifactor*)、およびカンピロバクテリウム属 (*Campylobacter*) からなる群に属する細菌に由来したCas9タンパク質の1個または複数の触媒ドメインを含み得る。いくつかの実施形態において、2個の触媒ドメインは、異なる細菌種由来である。

#### 【0077】

有用なCas9ヌクレアーゼのバリエーションは、RuvC<sup>-</sup>もしくはHNH<sup>-</sup>酵素またはニッカーゼなどの単一の不活性触媒ドメインを含み得る。Cas9ニッカーゼは、1つだけの活性機能性ドメインを有し、標的DNAの1つのストランドのみを切断することができる。これにより、一本鎖切断またはニックを生じる。いくつかの実施形態において、少なくともD10A変異を有する変異体Cas9ヌクレアーゼはCas9ニッカーゼである。他の実施形態において、少なくともH840A変異を有する変異体Cas9ヌクレアーゼはCas9ニッカーゼである。Cas9ニッカーゼに存在する変異の他の例には、非限定的に、N854AおよびN863Aが挙げられる。向かい合わせのDNAストランドを標的にする少なくとも2つのDNAターゲティングRNAが用いられる場合には、二本鎖切断は、Cas9ニッカーゼを用いて導入することができる。二重ニックにより引き起こされた二本鎖切断は、NHEJまたはHDRにより修復することができる (Ran et al., 2013, Cell, 154:1380-1389)。この遺伝子編集戦略は、HDRを優先し、オフターゲットDNA部位におけるインデル変異の頻度を減少させる。Cas9ヌクレアーゼまたはニッカーゼの非限定的例は、例えば、米国特許第8,895,308号；第8,889,418号；および第8,865,406号、ならびに米国特許出願公開第2014/0356959号、第2014/0273226号、および第2014/0186919号に記載されている。Cas9ヌクレアーゼまたはニッカーゼは、標的細胞または標的生物体ごとにコドン最適化することができる。

#### 【0078】

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、RuvC1およびHNHヌクレアーゼドメインの2つのサイレンシング変異 (D10AおよびH840A) を含有するCas9ポリペプチドであり得、それはdCas9と呼ばれる (Jinek et al., Science, 2012, 337:816-821; Qi et al., Cell, 152(5):1173-1183)。一実施形態において、化膿性連鎖球菌由来のdCas9ポリペプチドは、位置D10、G12、G17、E762、H84

10

20

30

40

50

0、N854、N863、H982、H983、A984、D986、A987、またはそれらの任意の組合せにおける少なくとも1個の変異を含む。そのようなdCas9ポリペプチドおよびそれらのバリエーションの記載は、例えば、国際特許公開第WO2013/176772号に提供されている。dCas9酵素は、D10、E762、H983、またはD986における変異、加えてH840またはN863における変異を含有することができる。ある例では、dCas9酵素は、D10AまたはD10N変異を含有する。また、dCas9酵素は、H840A、H840Y、またはH840Nを含み得る。いくつかの実施形態において、本発明のdCas9酵素は、D10AおよびH840A；D10AおよびH840Y；D10AおよびH840N；D10NおよびH840A；D10NおよびH840Y；またはD10NおよびH840Nの置換を含む。置換は、Cas9ポリペプチドを触媒的不活性にし、かつ標的DNAと結合することができるようにする、保存的または非保存的置換であり得る。

10

#### 【0079】

ある特定の実施形態において、dCas9ポリペプチドは、ヌクレアーゼ活性の欠陥など、触媒的不活性である。ある例では、dCas9酵素またはそのバリエーションもしくは断片は、標的配列の転写をブロックすることができ、場合によっては、RNAポリメラーゼをブロックすることができる。他の例では、dCas9酵素またはそのバリエーションもしくは断片は、標的配列の転写を活性化することができる。

#### 【0080】

ゲノム編集方法について、Casヌクレアーゼは、dCas9に連結されたIIS型制限酵素FokIの触媒ドメインを含むポリペプチドなどのCas9融合タンパク質であり得る。FokI-dCas9融合タンパク質(fCas9)は、標的DNAの一本鎖と結合し得る2つのガイドRNAを用いて、二本鎖切断を生じさせることができる。

20

#### 【0081】

遺伝子調節（例えば、標的DNAの転写のモジュレーション）について、非限定的にdCas9などの、ヌクレアーゼ欠損Casタンパク質が、転写活性化または転写抑制のために用いることができる。ヌクレアーゼ無しのCasタンパク質を用いて遺伝子発現を不活性化する方法は、例えば、Larson et al., Nat. Protoc., 2013, 8(11): 2180-2196に記載されている。

#### 【0082】

30

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、組換え発現ベクターに存在する。ある特定の例では、組換え発現ベクターはウイルス構築物、例えば、組換えアデノ随伴ウイルス構築物、組換えアデノウイルス構築物、組換えレンチウイルス構築物などである。例えば、ウイルスベクターは、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、SV40、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルスなどに基き得る。レトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス、脾壊死ウイルスに基き得、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、乳癌ウイルスなどのレトロウイルスに由来したベクターであり得る。有用な発現ベクターは当業者に知られており、多くは市販されている。ベクターpXT1、pSG5、pSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVLSV40は、真核生物宿主細胞のための例として提供される。しかしながら、宿主細胞と適合性であるならば、いかなる他のベクターも用いられ得る。例えば、Cas9酵素をコードするヌクレオチド配列を含有する有用な発現ベクターは、例えば、Addgene、Life Technologies、Sigma-Aldrich、およびOrigeneから市販されている。

40

#### 【0083】

用いられる標的細胞/発現系に依存して、プロモーター、転写エンハンサー、転写ターミネーターなどを含むいくつかの転写および翻訳制御エレメントのいずれかが発現ベクターに用いられ得る。有用なプロモーターは、ウイルス、または任意の生物体、例えば、原核生物もしくは真核生物に由来し得る。適切なプロモーターには、SV40初期プロモ-

50



ター、マウス乳癌ウイルスの長い末端反復 ( L T R ) プロモーター ; アデノウイルスの主要な後期プロモーター ( A d M L P ) ; 単純ヘルペスウイルス ( H S V ) プロモーター、C M V 最初期プロモーター領域 ( C M V I E ) などのサイトメガロウイルス ( C M V ) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス ( R S V ) プロモーター、ヒト U 6 核内低分子プロモーター ( U 6 ) 、増強 U 6 プロモーター、ヒト H 1 プロモーター ( H 1 ) などが挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【 0 0 8 4 】

C a s ヌクレアーゼおよびそのバリエーションまたは断片は、C a s ポリペプチドまたはそのバリエーションもしくは断片、C a s ポリペプチドまたはそのバリエーションもしくは断片をコードする m R N A 、あるいは C a s ポリペプチドまたはそのバリエーションもしくは断片をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターとして、細胞 ( 例えば、エキスポ治療用の初代細胞などのインビトロ細胞、または患者内などのインビボ細胞 ) へ導入することができる。

10

#### 【 0 0 8 5 】

##### 2 . 修飾型単一ガイド R N A ( s g R N A )

ゲノム改変の C R I S P R / C a s システムに用いられる修飾型 s g R N A は、典型的には、標的核酸配列に相補的なガイド配列 ( 例えば、c r R N A ) 、および C a s ヌクレアーゼ ( 例えば、C a s 9 ポリペプチド ) またはそのバリエーションもしくは断片と相互作用するスキャフォールド配列 ( 例えば、t r a c r R N A ) を含む。本発明者らは、1 つまたは複数の化学修飾を含有する修飾型 s g R N A が、初代細胞 ( 例えば、T 細胞または造血幹細胞・造血前駆細胞 ) において C R I S P R に基づいた遺伝子調節 ( 例えば、ゲノム編集または遺伝子発現をモジュレートすること ) のために用いられた場合、対応する非修飾型 s g R N A と比較して、修飾型 s g R N A の活性、安定性、および特異性を増加させ、ならびに / またはその毒性を減少させ得ることを発見した。先行技術に優る修飾型 s g R N A の利点には、初代細胞などの標的細胞への送達がより容易なこと、加えて、安定性の増加、活性の持続時間の増加、および標的細胞における毒性の低下が挙げられるが、それらに限定されない。ある場合では、C R I S P R / C a s システムの部分としての修飾型 s g R N A は、他のシステムと比較してオンターゲット遺伝子調節のより高い頻度を提供する。他の場合では、修飾型 s g R N A は、それらの非修飾型配列等価物と比較して向上した活性および / または特異性を提供する。

20

30

#### 【 0 0 8 6 】

ある特定の例では、修飾型 s g R N A は、C a s ヌクレアーゼ ( 例えば、C a s 9 ポリペプチド ) またはそのバリエーションもしくは断片と複合体化して、細胞 ( 例えば、エキスポ治療用の初代細胞などのインビトロ細胞、または患者内などのインビボ細胞 ) への導入のためのリボ核タンパク質 ( R N P ) に基づいた送達系を形成する。他の例では、修飾型 s g R N A は、C a s ヌクレアーゼ ( 例えば、C a s 9 ポリペプチド ) またはそのバリエーションもしくは断片をコードする m R N A と共に細胞 ( 例えば、エキスポ治療用の初代細胞などのインビトロ細胞、または患者内などのインビボ細胞 ) へ導入される。さらに他の例では、修飾型 s g R N A は、C a s ヌクレアーゼ ( 例えば、C a s 9 ポリペプチド ) またはそのバリエーションもしくは断片をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターと共に細胞 ( 例えば、エキスポ治療用の初代細胞などのインビトロ細胞、または患者内などのインビボ細胞 ) へ導入される。

40

#### 【 0 0 8 7 】

ある例では、複数の修飾型 s g R N A が、初代細胞などの標的細胞において、効率的な多重化された、C R I S P R に基づいた遺伝子調節 ( 例えば、ゲノム編集または遺伝子発現をモジュレートすること ) に用いることができる。複数の修飾型 s g R N A は、同じ標的核酸配列または異なる標的核酸配列とハイブリダイズする、少なくとも約 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 5 個、2 0 個、2 5 個、3 0 個、3 5 個、4 0 個、4 5 個、5 0 個、またはそれ以上の修飾型 s g R N A を含み得る。複数の修飾型 s g R N A は、C a s ヌクレアーゼ ( 例えば、C a s 9 ポリペプチド ) またはそのバ

50

リアントもしくは断片との複合体で、あるいはCasヌクレアーゼ（例えば、Cas9ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片をコードするヌクレオチド配列（例えば、mRNAまたは組換え発現ベクター）として、細胞（例えば、エクスピオ治療用の初代細胞などのインビトロ細胞、または患者内などのインビボ細胞）へ導入することができる。

#### 【0088】

修飾型sgRNAの核酸配列は、標的配列とハイブリダイズし、かつCRISPR複合体の標的配列へ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（例えば、標的DNA配列）との相補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において、修飾型sgRNAのガイド配列とそれの対応する標的配列との相補性の程度は、適切なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントされた場合、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、もしくはそれ以上、または約50%より高く、60%より高く、75%より高く、80%より高く、85%より高く、90%より高く、95%より高く、97.5%より高く、99%より高く、もしくはそれ以上より高い。最適なアラインメントは、配列をアラインメントするための任意の適切なアルゴリズムを用いて決定され得、そのアルゴリズムの非限定的例には、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler Transformに基づいたアルゴリズム（例えば、Burrows Wheeler Aligner）、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign（Novocraft Technologies、ELAND（Illumina、San Diego、Calif.）、SOAP（soap.genomics.org.cnで利用可能）、およびMaq（maq.sourceforge.netで利用可能）が挙げられる。いくつかの実施形態において、ガイド配列は、約1ヌクレオチド長、2ヌクレオチド長、3ヌクレオチド長、4ヌクレオチド長、5ヌクレオチド長、6ヌクレオチド長、7ヌクレオチド長、8ヌクレオチド長、9ヌクレオチド長、10ヌクレオチド長、11ヌクレオチド長、12ヌクレオチド長、13ヌクレオチド長、14ヌクレオチド長、15ヌクレオチド長、16ヌクレオチド長、17ヌクレオチド長、18ヌクレオチド長、19ヌクレオチド長、20ヌクレオチド長、21ヌクレオチド長、22ヌクレオチド長、23ヌクレオチド長、24ヌクレオチド長、25ヌクレオチド長、26ヌクレオチド長、27ヌクレオチド長、28ヌクレオチド長、29ヌクレオチド長、30ヌクレオチド長、35ヌクレオチド長、40ヌクレオチド長、45ヌクレオチド長、50ヌクレオチド長、75ヌクレオチド長、またはそれ以上である。ある例では、ガイド配列は約20ヌクレオチド長である。他の例では、ガイド配列は約15ヌクレオチド長である。他の例では、ガイド配列は約25ヌクレオチド長である。CRISPR複合体の標的配列への配列特異的結合を導くガイド配列の能力は、任意の適切なアッセイにより評価され得る。例えば、試験されるべきガイド配列を含む、CRISPR複合体を形成するのに十分なCRISPRシステムの成分が、CRISPR配列の成分をコードするベクターでのトランスフェクションによるなど、対応する標的配列を有する宿主細胞へ供給され得、その後、標的配列内の優先的な切断が評価され得る。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、標的配列、試験されるべきガイド配列および試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含むCRISPR複合体の成分を供給し、試験ガイド配列反応と対照ガイド配列反応の間で、標的配列における結合または切断率を比較することにより試験管内で評価され得る。

#### 【0089】

修飾型sgRNAのヌクレオチド配列は、上記のウェブに基づいたソフトウェアのいずれかを用いて選択することができる。DNAターゲティングRNAを選択するための考慮すべきことには、用いられることになっているCasヌクレアーゼ（例えば、Cas9ポリペプチド）についてのPAM配列、およびオフターゲット改変を最小限にするための戦略が挙げられる。CRISPR Design Toolなどのツールは、修飾型sgRNAを調製するための配列、標的改変効率を評価すること、および/またはオフターゲット

ト部位における切断を評価することを提供することができる。修飾型 s g R N A の配列を選択するための別の考慮すべきことには、ガイド配列内の二次構造の度合を低下させることが挙げられる。二次構造は、任意の適切なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムによって決定され得る。いくつかのプログラムは、最小のギブズ自由エネルギーを計算することに基づいている。適切なアルゴリズムの例には、mFold (Zuker and Stiegler, Nucleic Acids Res, 9 (1981), 133-148)、UNAFold パッケージ (Markham et al., Methods Mol Biol, 2008, 453:3-31)、および ViennaRNA Package からの RNAfold が挙げられる。

【0090】

修飾型 s g R N A の、ガイド配列の 1 個もしくは複数のヌクレオチド、および / または スキャフォールド配列の 1 個もしくは複数のヌクレオチドは、修飾型ヌクレオチドであり得る。例えば、約 20 ヌクレオチド長であるガイド配列は、1 個または複数、例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、またはそれ以上の修飾型ヌクレオチドを有し得る。ある場合では、ガイド配列は、少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、またはそれ以上の修飾型ヌクレオチドを含む。他の場合では、ガイド配列は、少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、19 個、20 個、またはそれ以上の修飾型ヌクレオチドを含む。修飾型ヌクレオチドは、ガイド配列の任意の核酸位置に位置し得る。言い換えれば、修飾型ヌクレオチドは、ガイド配列の最初および / もしくは最後のヌクレオチドの地点、もしくはその近くに、ならびに / またはその間の任意の位置にあり得る。例えば、20 ヌクレオチド長であるガイド配列について、1 個または複数の修飾型ヌクレオチドは、ガイド配列の核酸 1 位、2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、および / または 20 位に位置し得る。ある特定の例では、ガイド配列の約 10 % から約 30 % まで、例えば、約 10 % ~ 約 25 %、約 10 % ~ 約 20 %、約 10 % ~ 約 15 %、約 15 % ~ 約 30 %、約 20 % ~ 約 30 %、または約 25 % ~ 約 30 % が修飾型ヌクレオチドを含み得る。他の例では、ガイド配列の約 10 % ~ 約 30 %、例えば、約 10 %、約 11 %、約 12 %、約 13 %、約 14 %、約 15 %、約 16 %、約 17 %、約 18 %、約 19 %、約 20 %、約 21 %、約 22 %、約 23 %、約 24 %、約 25 %、約 26 %、約 27 %、約 28 %、約 29 %、または約 30 % が修飾型ヌクレオチドを含み得る。

【0091】

いくつかの実施形態において、修飾型 s g R N A のスキャフォールド配列は、1 個または複数の修飾型ヌクレオチドを含有する。例えば、約 80 ヌクレオチド長であるスキャフォールド配列は、1 個または複数、例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、30 個、35 個、40 個、45 個、50 個、55 個、60 個、65 個、70 個、75 個、76 個、77 個、78 個、79 個、80 個、またはそれ以上の修飾型ヌクレオチドを有し得る。ある例では、スキャフォールド配列は、少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、またはそれ以上の修飾型ヌクレオチドを含む。他の例では、スキャフォールド配列は、少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、19 個、20 個、またはそれ以上の修飾型ヌクレオチドを含む。修飾型ヌクレオチドは、スキャフォールド配列の任意の核酸位置に位置し得る。例えば、修飾型ヌクレオチドは、スキャフォールド配列の最初および / もしくは最後のヌクレオチドの地点、もしくはその近くに、ならびに / またはその間の任意の位置にあり得る。例えば、約 80 ヌクレオチド長であるスキャフォールド配列について、1 個または複数の修飾型ヌクレオチドは、そ

の配列の核酸 1 位、2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、20 位、21 位、22 位、23 位、24 位、25 位、26 位、27 位、28 位、29 位、30 位、31 位、32 位、33 位、34 位、35 位、36 位、37 位、38 位、39 位、40 位、41 位、42 位、43 位、44 位、45 位、46 位、47 位、48 位、49 位、50 位、51 位、52 位、53 位、54 位、55 位、56 位、57 位、58 位、59 位、60 位、61 位、62 位、63 位、64 位、65 位、66 位、67 位、68 位、69 位、70 位、71 位、72 位、73 位、74 位、75 位、76 位、77 位、78 位、79 位、および/または 80 位に位置し得る。ある例では、スキャフォールド配列の約 1 % から約 10 % まで、例えば、約 1 % ~ 約 8 %、約 1 % ~ 約 5 %、約 5 % ~ 約 10 %、または 3 % ~ 約 7 % が修飾型ヌクレオチドを含み得る。他の例では、スキャフォールド配列の約 1 % から約 10 % まで、例えば、約 1 %、約 2 %、約 3 %、約 4 %、約 5 %、約 6 %、約 7 %、約 8 %、約 9 %、または約 10 % が修飾型ヌクレオチドを含み得る。

10

#### 【0092】

s g RNA の修飾型ヌクレオチドは、リボース（例えば、糖）基、リン酸基、核酸塩基、またはそれらの任意の組合せにおける修飾を含み得る。いくつかの実施形態において、リボース基における修飾は、リボースの 2' 位での修飾を含む。

#### 【0093】

いくつかの実施形態において、修飾型ヌクレオチドには、2'フルオロ-アラビノ核酸、三環性 DNA (tc-DNA)、ペプチド核酸、シクロヘキセン核酸 (CeNA)、ロ

20

ックド核酸 (LNA)、エチレン架橋核酸 (ENA)、ホスホロジアミデートモルホリノ、またはそれらの組合せが挙げられる。

#### 【0094】

修飾型ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体は、糖修飾型および/またはバックボーン修飾型リボヌクレオチドを含む（すなわち、リン酸-糖バックボーンへの修飾を含む）ことができる。例えば、天然または自然の RNA のホスホジエステル結合が、窒素またはイオウのヘテロ原子の少なくとも 1 個を含むように修飾され得る。いくつかのバックボーン修飾型リボヌクレオチドにおいて、隣接するリボヌクレオチドへ連結するホスホエステル基が、修飾型基、例えばホスホロチオエート基によって置換され得る。好ましい、糖修飾型リボヌクレオチドにおいて、2' 部分は、H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub> または ON から選択される基であり、R は C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、ハロは F、Cl、Br、または I である。

30

#### 【0095】

いくつかの実施形態において、修飾型ヌクレオチドは糖修飾を含有する。糖修飾の非限定的例には、2' - デオキシ - 2' - フルオロ - オリゴリボヌクレオチド (2' - フルオロ - 2' - デオキシシチジン - 5' - 三リン酸、2' - フルオロ - 2' - デオキシウリジン - 5' - 三リン酸)、2' - デオキシ - 2' - デアミノオリゴリボヌクレオチド (2' - アミノ - 2' - デオキシシチジン - 5' - 三リン酸、2' - アミノ - 2' - デオキシウリジン - 5' - 三リン酸)、2' - O - アルキルオリゴリボヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - C - アルキルオリゴリボヌクレオチド (2' - O - メチルシチジン - 5' - 三リン酸、2' - メチルウリジン - 5' - 三リン酸)、2' - C - アルキルオリゴリボヌクレオチド、およびそれらの異性体 (2' - アラシチジン - 5' - 三リン酸、2' - アラウリジン - 5' - 三リン酸)、アジド三リン酸 (azido triphosphate) (2' - アジド - 2' - デオキシシチジン - 5' - 三リン酸、2' - アジド - 2' - デオキシウリジン - 5' - 三リン酸)、ならびにそれらの組合せが挙げられる。

40

#### 【0096】

いくつかの実施形態において、修飾型 s g RNA は、1 個または複数の 2' - フルオロ、2' - アミノ、および/または 2' - チオ修飾を含有する。ある例では、修飾は、2' - フルオロ - シチジン、2' - フルオロ - ウリジン、2' - フルオロ - アデノシン、2' - フルオロ - グアノシン、2' - アミノ - シチジン、2' - アミノ - ウリジン、2' - ア

50

ミノ - アデノシン、2' - アミノ - グアノシン、2, 6 - ジアミノプリン、4 - チオ - ウリジン、5 - アミノ - アリル - ウリジン、5 - プロモ - ウリジン、5 - ヨード - ウリジン、5 - メチル - シチジン、リボ - チミジン、2 - アミノプリン、2' - アミノ - ブチリル - ピレン - ウリジン、5 - フルオロ - シチジン、および/または 5 - フルオロ - ウリジンである。

#### 【0097】

哺乳類RNA上に見出される96個より多い天然に存在するヌクレオシド修飾がある。例えば、Limbach et al., Nucleic Acids Research, 22(12):2183-2196 (1994) 参照。ヌクレオチドならびに修飾型ヌクレオチドおよびヌクレオシドの調製は、当技術分野においてよく知られており、例えば、米国特許第4,373,071号、第4,458,066号、第4,500,707号、第4,668,777号、第4,973,679号、第5,047,524号、第5,132,418号、第5,153,319号、第5,262,530号、および第5,700,642号に記載されている。本明細書に記載されているような使用に適している多数の修飾型ヌクレオシドおよび修飾型ヌクレオチドは市販されている。そのヌクレオシドは、天然に存在するヌクレオシドの類似体であり得る。ある場合では、その類似体は、ジヒドロウリジン、メチルアデノシン、メチルシチジン、メチルウリジン、メチルプソイドウリジン、チオウリジン、デオキシシチジン、およびデオキシウリジンである。

#### 【0098】

ある場合では、本明細書に記載された修飾型sgRNAは、核酸塩基修飾型リボヌクレオチド、すなわち、天然に存在する核酸塩基の代わりに少なくとも1個の天然に存在しない核酸塩基を含有するリボヌクレオチドを含む。修飾型ヌクレオシドおよび修飾型ヌクレオチドへ組み入れることができる修飾型核酸塩基の非限定的例には、m5C(5 - メチルシチジン)、m5U(5 - メチルウリジン)、m6A(N6 - メチルアデノシン)、s2U(2 - チオウリジン)、Um(2' - O - メチルウリジン)、m1A(1 - メチルアデノシン)、m2A(2 - メチルアデノシン)、Am(2 - 1 - O - メチルアデノシン)、ms2m6A(2 - メチルチオ - N6 - メチルアデノシン)、i6A(N6 - イソペンテニルアデノシン)、ms2i6A(2 - メチルチオ - N6 イソペンテニルアデノシン)、io6A(N6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン)、ms2io6A(2 - メチルチオ - N6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン)、g6A(N6 - グリシニルカルバモイルアデノシン)、t6A(N6 - スレオニルカルバモイルアデノシン)、ms2t6A(2 - メチルチオ - N6 - スレオニルカルバモイルアデノシン)、m6t6A(N6 - メチル - N6 - スレオニルカルバモイルアデノシン)、hn6A(N6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)、ms2hn6A(2 - メチルチオ - N6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)、Ar(p)(2' - O - リボシルアデノシン(リン酸))、I(イノシン)、m1I(1 - メチルイノシン)、m'I(1, 2' - O - ジメチルイノシン)、m3C(3 - メチルシチジン)、Cm(2T - O - メチルシチジン)、s2C(2 - チオシチジン)、ac4C(N4 - アセチルシチジン)、f5C(5 - フォニル(fonnyl)シチジン)、m5Cm(5, 2 - O - ジメチルシチジン)、ac4Cm(N4アセチル2TOMethylシチジン)、k2C(リシジン)、m1G(1 - メチルグアノシン)、m2G(N2 - メチルグアノシン)、m7G(7 - メチルグアノシン)、Gm(2' - O - メチルグアノシン)、m22G(N2, N2 - ジメチルグアノシン)、m2Gm(N2, 2' - O - ジメチルグアノシン)、m22Gm(N2, N2, 2' - O - トリメチルグアノシン)、Gr(p)(2' - O - リボシルグアノシン(リン酸))、yW(ワイプトシン)、o2yW(ペルオキシワイプトシン)、OHyW(ヒドロキシワイプトシン)、OHyW\*(未修飾(undermodified)ヒドロキシワイプトシン)、imG(ワイオシン)、mimG(メチルグアノシン)、Q(クエオシン)、oQ(エポキシクエオシン)、galQ(ガラクトシル - クエオシン)、manQ(マンノシル - クエオシン)、preQo(7 - シアノ - 7 - デアザグアノシン)、preQi(7 - アミノメチル - 7 - デアザグアノシン)、G(アルカエ

10

20

30

40

50

オシン)、D(ジヒドロウリジン)、m5Um(5, 2'-O-ジメチルウリジン)、s4U(4-チオウリジン)、m5s2U(5-メチル-2-チオウリジン)、s2Um(2-チオ-2'-O-メチルウリジン)、acp3U(3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン)、ho5U(5-ヒドロキシウリジン)、mo5U(5-メトキシウリジン)、cmo5U(ウリジン5-オキシ酢酸)、mcmo5U(ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル)、chm5U(5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン)、mchm5U(5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル)、mcm5U(5-メトキシカルボニルメチルウリジン)、mcm5Um(S-メトキシカルボニルメチル-2-O-メチルウリジン)、mcm5s2U(5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン)、nm5s2U(5-アミノメチル-2-チオウリジン)、nmnm5U(5-メチルアミノメチルウリジン)、nmnm5s2U(5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン)、nmnm5se2U(5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン)、ncm5U(5-カルバモイルメチルウリジン)、ncm5Um(5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン)、cmnm5U(5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン)、cnmm5Um(5-カルボキシメチルアミノメチル-2-L-Oメチルウリジン)、cmnm5s2U(5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン)、m62A(N6, N6-ジメチルアデノシン)、Tm(2'-O-メチルイノシン)、m4C(N4-メチルシチジン)、m4Cm(N4, 2-O-ジメチルシチジン)、hm5C(5-ヒドロキシメチルシチジン)、m3U(3-メチルウリジン)、cm5U(5-カルボキシメチルウリジン)、m6Am(N6, T-O-ジメチルアデノシン)、rn62Am(N6, N6, O-2-トリメチルアデノシン)、m2'7G(N2, 7-ジメチルグアノシン)、m2'2'7G(N2, N2, 7-トリメチルグアノシン)、m3Um(3, 2T-O-ジメチルウリジン)、m5D(5-メチルジヒドロウリジン)、f5Cm(5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン)、m1Gm(1, 2'-O-ジメチルグアノシン)、m'Am(1, 2-O-ジメチルアデノシン)イリノメチルウリジン)、tm5s2U(S-タウリノメチル-2-チオウリジン)、imG-14(4-デメチルグアノシン)、imG2(イソグアノシン)、またはac6A(N6-アセチルアデノシン)、ヒポキサンチン、イノシン、8-オキソ-アデニン、その7-置換誘導体、ジヒドロウラシル、プソイドウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-アミノウラシル、5-(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)-アルキルウラシル、5-メチルウラシル、5-(C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>)-アルケニルウラシル、5-(C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>)-アルキニルウラシル、5-(ヒドロキシメチル)ウラシル、5-クロロウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-ヒドロキシシトシン、5-(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)-アルキルシトシン、5-メチルシトシン、5-(C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>)-アルケニルシトシン、5-(C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>)-アルキニルシトシン、5-クロロシトシン、5-フルオロシトシン、5-プロモシトシン、N<sup>2</sup>-ジメチルグアニン、7-デアザグアニン、8-アザグアニン、7-デアザ-7-置換グアニン、7-デアザ-7-(C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>)アルキニルグアニン、7-デアザ-8-置換グアニン、8-ヒドロキシグアニン、6-チオグアニン、8-オキソグアニン、2-アミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、2, 4-ジアミノプリン、2, 6-ジアミノプリン、8-アザプリン、置換7-デアザプリン、7-デアザ-7-置換プリン、7-デアザ-8-置換プリン、およびそれらの組合せが挙げられる。

#### 【0099】

いくつかの実施形態において、修飾型sgRNAのリン酸バックボーンが変化している。その修飾型sgRNAは、1個または複数のホスホロチオエート、ホスホラミデート(例えば、N3'-P5'-ホスホラミデート(NP))、2'-O-メトキシ-エチル(2'MOE)、2'-O-メチル-エチル(2'ME)、および/またはメチルホスホネート結合を含み得る。

#### 【0100】

特定の実施形態において、修飾型sgRNAの、ガイド配列の修飾型ヌクレオチドの1個もしくは複数、および/またはスキヤフォールド配列の修飾型ヌクレオチドの1個もし

10

20

30

40

50

くは複数は、2' - O - メチル (M)ヌクレオチド、2' - O - メチル 3' - ホスホロチオエート (MS)ヌクレオチド、2' - O - メチル 3' チオP A C E (M S P)ヌクレオチド、またはそれらの組合せを含む。ある例では、修飾型 s g R N A は、1個または複数のMSヌクレオチドを含む。他の例では、修飾型 s g R N A は、1個または複数のM S Pヌクレオチドを含む。さらに他の例では、修飾型 s g R N A は、1個または複数のMSヌクレオチド、および1個または複数のM S Pヌクレオチドを含む。さらなる例では、修飾型 s g R N A はMヌクレオチドを含まない。ある特定の例では、修飾型 s g R N A は、1個もしくは複数のMSヌクレオチド、および/または1個もしくは複数のM S Pヌクレオチドを含み、1個または複数のMヌクレオチドをさらに含む。ある特定の他の例では、M Sヌクレオチドおよび/またはM S Pヌクレオチドが、修飾型 s g R N A に存在する唯一の修飾型ヌクレオチドである。

10

#### 【0101】

本明細書に記載された修飾のいずれかが、修飾型 s g R N A のガイド配列および/またはスキャフォールド配列において組み合わされて、組み入れられ得ることは留意されるべきである。

#### 【0102】

ある場合では、修飾型 s g R N A はまた、ステムループ、例えば、M2ステムループまたはテトラループなどの構造的修飾を含む。

#### 【0103】

修飾型 s g R N A は、当業者に知られた任意の方法により合成することができる。いくつかの実施形態において、修飾型 s g R N A は化学合成される。修飾型 s g R N A は、2' - O - チオノカルバメート保護ヌクレオシドホスホラミダイトを用いて合成することができる。方法は、例えば、D e l l i n g e r e t a l . , J . A m e r i c a n C h e m i c a l S o c i e t y 133, 11540 - 11556 (2011); T h r e l f a l l e t a l . , O r g a n i c & B i o m o l e c u l a r C h e m i s t r y 10, 746 - 754 (2012); および D e l l i n g e r e t a l . , J . A m e r i c a n C h e m i c a l S o c i e t y 125, 940 - 950 (2003) に記載されている。

20

#### 【0104】

化学修飾型 s g R N A は、任意のC R I S P R 関連技術、例えば、RNAガイド型技術と共に用いることができる。本明細書に記載されているように、修飾型 s g R N A は、任意の人工、または人造のC a s 9 ポリペプチドを含む任意のC a sヌクレアーゼまたはそのバリエーションもしくは断片についてのガイドとしての役割を果たすことができる。修飾型 s g R N A は、エクスピボ治療用の単離された初代細胞において、またはインビボで(例えば、動物において)、DNAおよび/またはRNA分子を標的にすることができる。本明細書に開示された方法は、ゲノム編集、遺伝子調節、画像化、および任意の他のC R I S P R に基づいた適用に適用することができる。

30

#### 【0105】

##### 3. ドナー修復鋳型

いくつかの実施形態において、本発明は、C a sヌクレアーゼ(例えば、C a s 9ヌクレアーゼ)切断部位の両側に、標的DNA配列(例えば、標的遺伝子または遺伝子座)の部分に相同である2つの相同アームを含む組換えドナー修復鋳型を提供する。ある特定の例では、組換えドナー修復鋳型は、レポーターポリペプチド(例えば、検出可能なポリペプチド、蛍光ポリペプチド、または選択マーカー)をコードするヌクレオチド配列を含むレポーターカセット、およびC a sヌクレアーゼ切断部位の両側における、そのレポーターカセットに隣接し、かつ標的DNAの部分に相同である2つの相同アームを含む。レポーターカセットは、自己切断ペプチド、1個もしくは複数の核移行シグナル、および/または蛍光ポリペプチド、例えば、スーパーフォルダーG F P ( s f G F P ) をコードする配列をさらに含み得る。

40

#### 【0106】

50

いくつかの実施形態において、相同アームは同じ長さである。他の実施形態において、相同アームは異なる長さである。相同アームは、少なくとも約10塩基対(bp)、例えば、少なくとも約10bp、15bp、20bp、25bp、30bp、35bp、45bp、55bp、65bp、75bp、85bp、95bp、100bp、150bp、200bp、250bp、300bp、350bp、400bp、450bp、500bp、550bp、600bp、650bp、700bp、750bp、800bp、850bp、900bp、950bp、1000bp、1.1キロベース(kb)、1.2kb、1.3kb、1.4kb、1.5kb、1.6kb、1.7kb、1.8kb、1.9kb、2.0kb、2.1kb、2.2kb、2.3kb、2.4kb、2.5kb、2.6kb、2.7kb、2.8kb、2.9kb、3.0kb、3.1kb、3.2kb、3.3kb、3.4kb、3.5kb、3.6kb、3.7kb、3.8kb、3.9kb、4.0kb、またはそれ以上であり得る。相同アームは、約10bp~約4kb、例えば、約10bp~約20bp、約10bp~約50bp、約10bp~約100bp、約10bp~約200bp、約10bp~約500bp、約10bp~約1kb、約10bp~約2kb、約10bp~約4kb、約100bp~約200bp、約100bp~約500bp、約100bp~約1kb、約100bp~約2kb、約100bp~約4kb、約500bp~約1kb、約500bp~約2kb、約500bp~約4kb、約1kb~約2kb、約1kb~約4kb、または約2kb~約4kbであり得る。

10

【0107】

20

ドナー修復鋳型は、発現ベクターへクローニングすることができる。当業者に知られた通常のウイルスおよび非ウイルスに基づいた発現ベクターを用いることができる。

【0108】

組換えドナー修復鋳型の代わりに、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド(ssODN)ドナー鋳型を、相同組換え媒介性修復に用いることができる。ssODNは、標的DNA内に短い改変を導入するのに有用である。例えば、ssODNは、SNPなどの遺伝子変異を正確に正すのに適している。ssODNは、Casヌクレアーゼ切断の標的部位のそれぞれの側における2つの隣接する相同配列を含有し得、標的DNAに対してセンス方向またはアンチセンス方向に配向することができる。各隣接配列は、少なくとも約10塩基対(bp)、例えば、少なくとも約10bp、15bp、20bp、25bp、30bp、35bp、40bp、45bp、50bp、55bp、60bp、65bp、70bp、75bp、80bp、85bp、90bp、95bp、100bp、150bp、200bp、250bp、300bp、350bp、400bp、450bp、500bp、550bp、600bp、650bp、700bp、750bp、800bp、850bp、900bp、950bp、1kb、2kb、4kb、またはそれ以上であり得る。いくつかの実施形態において、各相同アームは、約10bp~約4kb、例えば、約10bp~約20bp、約10bp~約50bp、約10bp~約100bp、約10bp~約200bp、約10bp~約500bp、約10bp~約1kb、約10bp~約2kb、約100bp~約200bp、約100bp~約500bp、約100bp~約1kb、約100bp~約2kb、約100bp~約4kb、約500bp~約1kb、約500bp~約2kb、約500bp~約4kb、約1kb~約2kb、約1kb~約4kb、または約2kb~約4kbである。ssODNは、長さが少なくとも約25ヌクレオチド(nt)、例えば、少なくとも約25nt、30nt、35nt、40nt、45nt、50nt、55nt、60nt、65nt、70nt、75nt、80nt、85nt、90nt、95nt、100nt、150nt、200nt、250nt、300nt、またはそれ以上であり得る。いくつかの実施形態において、ssODNは、約25~約50；約50~約100；約100~約150；約150~約200；約200~約250；約250~約300；または約25nt~約300nt長である。

30

40

【0109】

50



いくつかの実施形態において、ssODN鑄型は、本明細書に記載された、少なくとも1個、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、200個、300個、400個、500個、またはそれ以上の修飾型ヌクレオチドを含む。ある例では、ssODNの配列の少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または99%が、修飾型ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、修飾型ヌクレオチドは、ssODNの末端の1つまたは両方に位置する。修飾型ヌクレオチドは、終端から1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、9番目、もしくは10番目のヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せであり得る。例えば、修飾型ヌクレオチドは、ssODN鑄型の両端における3個の終端ヌクレオチドであり得る。追加として、修飾型ヌクレオチドが、内部から末端まで位置し得る。

10

#### 【0110】

##### 4. 標的DNA

CRISPR/Casシステムにおいて、標的DNA配列は、DNAターゲティングRNA（例えば、修飾型sgRNA）の断片に相補的であり得、その直後に、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列が続き得る。標的DNA部位は、PAM配列から5'側すぐにあり得、そのPAM配列は、用いられるCas9の細菌種に特異的である。例えば、化膿性連鎖球菌由来のCas9のPAM配列はNGGであり、髄膜炎菌由来のCas9のPAM配列はNNNNGATTであり、ストレプトコッカス・サーモフィラス由来のCas9のPAM配列はNNAAGAAであり、トレボネマ・デンティコーラ由来のCas9のPAM配列はNAAAAACである。いくつかの実施形態において、PAM配列は、5'-NGG（ただし、Nは任意のヌクレオチドである）、5'-NRG（ただし、Nは任意のヌクレオチドであり、Rはプリンである）、または5'-NNGRR（ただし、Nは任意のヌクレオチドであり、Rはプリンである）であり得る。化膿性連鎖球菌システムについて、選択される標的DNA配列は、5'-NGG（ただし、Nは任意のヌクレオチドである）PAMの直前にある（例えば、5'側に位置する）べきであり、その結果、DNAターゲティングRNA（例えば、修飾型sgRNA）のガイド配列が、逆ストランドと塩基対形成して、PAM配列から約3塩基対上流での切断を媒介する。

20

#### 【0111】

いくつかの実施形態において、DNAターゲティングRNA（例えば、修飾型sgRNA）のガイド配列とそれの対応する標的DNA配列の間の相補性の程度は、適切なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントされた場合、約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上、または約50%より高く、55%より高く、60%より高く、65%より高く、70%より高く、75%より高く、80%より高く、85%より高く、90%より高く、91%より高く、92%より高く、93%より高く、94%より高く、95%より高く、96%より高く、97%より高く、98%より高く、99%より高く、もしくはそれ以上である。最適なアラインメントは、配列をアラインメントするための任意の適切なアルゴリズムを用いて決定され得、そのアルゴリズムの非限定的例には、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）、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign（Novocraft Technologies, Selangor, Malaysia）、およびELAND（Illumina, San Diego, CA）に基づいたアルゴリズムが挙げられる。

30

40

#### 【0112】

標的DNA部位は、ZiFiT Targeterソフトウェア（Sander et al., 2007, Nucleic Acids Res, 35:599-60

50

5 ; Sander et al., 2010, Nucleic Acids Res, 38:462-468)、E-CRISP (Heigwer et al., 2014, Nat Methods, 11:122-123)、RGEN Tools (Bae et al., 2014, Bioinformatics, 30(10):1473-1475)、CasFinder (Aach et al., 2014, bioRxiv)、DNA2.0 gNRA Design Tool (DNA2.0, Menlo Park, CA)、およびCRISPR Design Tool (Broad Institute, Cambridge, MA)などのウェブに基づいたソフトウェアを用いて、所定のゲノム配列(遺伝子)内で選択することができる。そのようなツールは、ゲノム配列(例えば、関心対象となる遺伝子または遺伝子座)を分析し、遺伝子編集のための適切な標的部位を同定する。各DNAターゲティングRNA(例えば、修飾型sgRNA)についてのオフターゲット遺伝子改変を評価するために、オフターゲット部位のコンピュータ的予測を、塩基対形成ミスマッチのアイデンティティ、位置、および分布の定量的特異性分析に基づいて行う。

10

#### 【0113】

##### 5. 遺伝子発現のモジュレーション

遺伝子発現を阻害すること、または遺伝子発現を活性化することなどの遺伝子発現を調節するCRISPR/Casシステムは、野生型または天然のCasヌクレアーゼのバリエーションまたは断片(例えば、Cas9ポリペプチドのバリエーションまたは断片)、およびDNAターゲティングsgRNAまたはRNAターゲティングsgRNAのいずれかを含み得る。非限定的例として、Cas9バリエーションまたは断片と、sgRNAの一部に相補的な標的DNA配列と結合することができるsgRNAとを含む複合体は、RNAポリメラーゼによる転写開始および伸長をブロックまたは邪魔することができる。これは、次に、標的DNAの遺伝子発現を阻害または抑制することができる。あるいは、異なるCas9バリエーションまたは断片と、sgRNAの一部に相補的な標的DNA配列と結合することができるsgRNAとを含む複合体は、標的DNAの遺伝子発現を誘導または活性化することができる。

20

#### 【0114】

遺伝子発現を不活性化し、または低下させるCRISPR干渉(CRISPRi)を実施するための方法の詳細な説明は、例えば、Larson et al., Nature Protocols, 2013, 8(11):2180-2196、およびQi et al., Cell, 152, 2013, 1173-1183に見出される。CRISPRiにおいて、sgRNA-Cas9バリエーション複合体は、タンパク質コード領域の非鋳型DNA鎖と結合し、転写伸長をブロックすることができる。ある場合では、sgRNA-Cas9バリエーション複合体が遺伝子のプロモーター領域と結合する場合、その複合体は、転写開始を阻止または邪魔する。

30

#### 【0115】

遺伝子発現を増加させるCRISPR活性化を実施するための方法の詳細な説明は、例えば、Cheng et al., Cell Research, 2013, 23:1163-1171、Koneran et al., Nature, 2015, 517:583-588、および米国特許第8,697,359号に見出される。

40

#### 【0116】

遺伝子発現をモジュレートするためのCRISPRに基づいたRNA結合および/または切断についての方法の詳細な説明は、例えば、O'Connell et al., Nature, 2014, 516:263-266、および米国特許出願公開第2014/0302563号に見出される。

#### 【0117】

遺伝子発現のCRISPRに基づいた制御について、ヌクレオチド鎖切断活性を欠くCasヌクレアーゼ(例えば、Cas9ポリペプチド)の触媒的不活性のバリエーションを用いることができる。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、RuvC様およ

50

びHNHヌクレアーゼドメインにおいて少なくとも2つの点変異を含有するCas9バリエーションである。いくつかの実施形態において、Cas9バリエーションは、D10AおよびH840Aアミノ酸置換を有し、それはdCas9と呼ばれている(Jinek et al., Science, 2012, 337:816-821; Qi et al., Cell, 152(5):1173-1183)。ある場合では、化膿性連鎖球菌由来のdCas9ポリペプチドは、位置D10、G12、G17、E762、H840、N854、N863、H982、H983、A984、D986、A987、またはそれらの任意の組合せにおける少なくとも1個の変異を含む。そのようなdCas9ポリペプチドおよびそのバリエーションの説明は、例えば、国際特許公開第WO2013/176772号に提供されている。dCas9酵素は、D10、E762、H983、またはD986における変異、加えて、H840またはN863における変異を含有することができる。ある場合では、dCas9酵素はD10AまたはD10N変異を含有する。また、dCas9酵素は、H840A、H840Y、またはH840Nを含み得る。ある場合では、dCas9酵素は、D10AおよびH840A；D10AおよびH840Y；D10AおよびH840N；D10NおよびH840A；D10NおよびH840Y；またはD10NおよびH840Nの置換を含む。置換は、Cas9ポリペプチドを触媒的不活性にし、かつ標的DNAと結合することができるようにする、保存的または非保存的置換であり得る。

#### 【0118】

ある特定の実施形態において、dCas9ポリペプチドは、ヌクレアーゼ活性の欠陥など触媒的不活性である。ある例では、dCas9酵素またはそのバリエーションもしくは断片は、標的配列の転写をブロックすることができ、場合によっては、RNAポリメラーゼをブロックすることができる。他の例では、dCas9酵素またはそのバリエーションもしくは断片は、標的配列の転写を活性化することができる。

#### 【0119】

ある特定の実施形態において、ヌクレオチド鎖切断活性を欠くCas9バリエーション(例えば、dCas9)は、転写抑制ドメイン、例えば、Kruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン、または転写活性化ドメイン、例えば、VP16トランス活性化ドメインと融合することができる。いくつかの実施形態において、Cas9バリエーションは、dCas9および転写因子、例えば、RNAポリメラーゼ 因子、熱ショック因子1、またはその断片を含む融合ポリペプチドである。他の実施形態において、Cas9バリエーションは、dCas9およびDNAメチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、またはその断片を含む融合ポリペプチドである。

#### 【0120】

RNA結合および/またはRNA切断により媒介される遺伝子発現のCRISPRに基づく制御について、例えば、O'Connell et al., Nature, 2014, 516:263-266に記載されているような、エンドリボヌクレアーゼ活性を有する適切なCasヌクレアーゼ(例えば、Cas9ポリペプチド)バリエーションを用いることができる。他の有用なCasヌクレアーゼ(例えば、Cas9)バリエーションは、例えば、米国特許出願公開第2014/0302563号に記載されている。RNAを切断することができる他のCRISPR関連酵素には、Csy4エンドリボヌクレアーゼ、CRISPR関連Cas6酵素、Cas5ファミリーメンバー酵素、Cas6ファミリーメンバー酵素、I型CRISPRシステムエンドリボヌクレアーゼ、II型CRISPRシステムエンドリボヌクレアーゼ、III型CRISPRシステムエンドリボヌクレアーゼ、およびそれらのバリエーションが挙げられる。

#### 【0121】

CRISPRに基づいたRNA切断のいくつかの実施形態において、PAM配列を含有するDNAオリゴヌクレオチド(例えば、PAMmer)が、一本鎖RNA転写産物と結合し、それを切断するために、本明細書に記載された修飾型sgRNAおよびCasヌクレアーゼ(例えば、Cas9)バリエーションと共に用いることができる。適切なPAMme

10

20

30

40

50

r 配列の詳細な説明は、例えば、O'Connell et al., Nature, 2014, 516:263-266に見出される。

#### 【0122】

Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片は、ポリペプチド、そのポリペプチドをコードするmRNA、またはそのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターとして供給することができる。追加の詳細は上記で見出すことができる。

#### 【0123】

いくつかの実施形態において、複数の修飾型sgRNAが、標的遺伝子の異なる領域を標的にして、その標的遺伝子の遺伝子発現を調節するために用いられる。複数の修飾型sgRNAは、各修飾型sgRNA単独と比較して、単一の標的遺伝子の遺伝子発現の相乗的モジュレーション（例えば、阻害または活性化）を提供することができる。他の実施形態において、複数の修飾型sgRNAは、少なくとも2つの標的遺伝子の遺伝子発現を調節するために用いられる。

#### 【0124】

##### B. 初代細胞

本発明は、関心対象となる任意の初代細胞において標的核酸の遺伝子調節を誘導するために用いることができる。初代細胞は、任意の多細胞生物体から単離された細胞、例えば、植物細胞（例えば、イネ細胞、コムギ細胞、トマト細胞、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）細胞、トウモロコシ（*Zea mays*）細胞など）、多細胞原生生物由来の細胞、多細胞真菌由来の細胞、無脊椎動物（例えば、ショウジョウバエ、刺胞動物、棘皮動物、線形動物など）由来の細胞または脊椎動物（例えば、魚、両生類、爬虫類、鳥、哺乳類など）由来の細胞などの動物細胞、ヒト由来の細胞、健康なヒト由来の細胞、ヒト患者由来の細胞、癌患者由来の細胞などであり得る。ある場合では、遺伝子調節を誘導された初代細胞は、対象（例えば、患者）へ移植することができる。例えば、初代細胞は、処置されることになっている対象（例えば、患者）に由来し得る。

#### 【0125】

任意の型の初代細胞が関心対象となり得、例えば、幹細胞、例えば、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、成体幹細胞（例えば、間葉系幹細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、臓器幹細胞）、前駆細胞、体細胞（例えば、線維芽細胞、肝実質細胞、心臓細胞、肝臓細胞、膵臓細胞、筋肉細胞、皮膚細胞、血液細胞、神経細胞、免疫細胞）、および身体、例えば、ヒト身体の任意の他の細胞である。細胞は、対象、例えば、動物対象またはヒト対象に由来した初代細胞または初代細胞培養物であり得、限られた数の継代の間、インビトロで成長することができる。いくつかの実施形態において、細胞は、疾患細胞であり、または疾患を有する対象に由来する。例えば、細胞は癌または腫瘍細胞であり得る。

#### 【0126】

初代細胞は、任意の標準方法により対象から採取することができる。例えば、皮膚、筋肉、骨髄、脾臓、肝臓、腎臓、膵臓、肺、腸、胃などの組織由来の細胞は、組織生検または細針吸引により採取することができる。血液細胞および/または免疫細胞は、全血、血漿、または血清から単離することができる。ある場合では、適切な初代細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）、末梢血リンパ球（PBL）、および他の血液細胞サブセット、例えば、限定されるわけではないが、T細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、ナチュラルキラーT細胞、単球前駆細胞、造血幹細胞・造血前駆細胞（HSPC）、例えばCD34+HSPC、または非多能性幹細胞が挙げられる。ある場合では、細胞は、任意の免疫細胞であり得、それには、任意のT細胞、例えば、腫瘍浸潤細胞（TIL）、CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、または任意の他の型のT細胞が挙げられるが、それらに限定されない。T細胞にはまた、メモリーT細胞、メモリーT幹細胞、またはエフェクターT細胞が挙げられ得る。T細胞はまた、特定の集団および表現型に偏ることができる。例えば、T細胞は、表現型的に、CD45RO(-)、CCR7(+）、CD45RA(+）、CD62L(+）、CD27(+）、CD28(+）、および/またはIL-

10

20

30

40

50

7 R ( + ) を含むように偏ることができる。C D 4 5 R O ( - )、C C R 7 ( + )、C D 4 5 R A ( + )、C D 6 2 L ( + )、C D 2 7 ( + )、C D 2 8 ( + )、および / または I L - 7 R ( + ) を含むリストから選択される 1 個または複数のマーカーを含む適切な細胞を選択することができる。誘導多能性幹細胞は、例えば、米国特許第 7, 6 8 2, 8 2 8 号、第 8, 0 5 8, 0 6 5 号、第 8, 5 3 0, 2 3 8 号、第 8, 8 7 1, 5 0 4 号、第 8, 9 0 0, 8 7 1 号、および第 8, 7 9 1, 2 4 8 号に記載された標準プロトコールに従って、分化細胞から作製することができる。

#### 【 0 1 2 7 】

いくつかの実施形態において、初代細胞はインビトロである、他の実施形態において、初代細胞はエクスピボである。

10

#### 【 0 1 2 8 】

##### C . エクスピボ治療

本明細書に記載された方法は、エクスピボ治療に用いることができる。エクスピボ治療は、生物体の外側で作製または改変された組成物（例えば、細胞）を対象（例えば、患者）に投与することを含み得る。いくつかの実施形態において、組成物（例えば、細胞）は、本明細書に開示された方法により作製または改変することができる。例えば、エクスピボ治療は、生物体の外側で作製または改変された初代細胞を対象（例えば、患者）に投与することを含み得、本明細書に記載された 1 つまたは複数の修飾型 s g R N A、および C a s ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9 ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片、C a s ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9 ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片をコードする m R N A、あるいは C a s ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9 ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターと初代細胞における標的核酸を接触させることを含む、本発明の方法に従って、前記初代細胞がインビトロで培養されている。

20

#### 【 0 1 2 9 】

いくつかの実施形態において、組成物（例えば、細胞）は、エクスピボ治療により処置されることになっている対象（例えば、患者）に由来し得る。いくつかの実施形態において、エクスピボ治療は、養子免疫治療などの細胞に基づいた治療を含み得る。

#### 【 0 1 3 0 】

いくつかの実施形態において、エクスピボ治療に用いられる組成物は、細胞であり得る。その細胞は、初代細胞であり得、それには、末梢血単核細胞（P B M C）、末梢血リンパ球（P B L）、および他の血液細胞サブセットが挙げられるが、それらに限定されない。初代細胞は免疫細胞であり得る。初代細胞は、T 細胞（例えば、C D 3 + T 細胞、C D 4 + T 細胞、および / または C D 8 + T 細胞）、ナチュラルキラー細胞、単球、ナチュラルキラー T 細胞、単球前駆細胞、造血幹細胞もしくは非多能性幹細胞、幹細胞、または前駆細胞であり得る。初代細胞は、C D 3 4 + H S P C などの造血幹細胞または造血前駆細胞（H S P C）であり得る。初代細胞はヒト細胞であり得る。初代細胞は、単離、選択、および / または培養することができる。初代細胞は、エクスピボで増殖することができる。初代細胞は、インビボで増殖することができる。初代細胞は、C D 4 5 R O ( - )、C C R 7 ( + )、C D 4 5 R A ( + )、C D 6 2 L ( + )、C D 2 7 ( + )、C D 2 8 ( + )、および / または I L - 7 R ( + ) であり得る。初代細胞は、必要としている対象の自己性であり得る。初代細胞は、必要としている対象の非自己性であり得る。初代細胞は、製造管理および品質管理に関する基準（G M P）適合の試薬であり得る。初代細胞は、必要としている対象における、癌、感染症、自己免疫障害、または移植片対宿主病（G V H D）を含む疾患を処置するための併用療法の一部であり得る。

30

40

#### 【 0 1 3 1 】

エクスピボ治療の非限定的例として、初代細胞は、その初代細胞内の標的核酸を、C a s ヌクレアーゼおよび修飾型 s g R N A と接触させる前に、多細胞生物体（例えば、植物、多細胞原生生物、多細胞真菌、無脊椎動物、脊椎動物など）から単離することができる。標的核酸を C a s ヌクレアーゼおよび修飾型 s g R N A と接触させた後、初代細胞また

50

はその子孫（例えば、初代細胞に由来した細胞）を多細胞生物体へ戻すことができる。

【0132】

D．核酸を標的細胞へ導入するための方法

ポリペプチドおよび核酸を標的細胞（宿主細胞）へ導入するための方法は当技術分野において知られており、ヌクレアーゼまたは核酸（例えば、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列、DNAターゲティングRNA（例えば、修飾型単一ガイドRNA）、相同組換え修復（HDR）のためのドナー修復鋳型など）を細胞、例えば、幹細胞、前駆細胞、または分化細胞などの初代細胞へ導入するために用いることができる。適切な方法の非限定的例には、エレクトロポレーション、ウイルスまたはバクテリオファージの感染、トランスフェクション、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、リポフェクション、リン酸カルシウム沈殿法、ポリエチレンジイミン（PEI）媒介性トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リボソーム媒介性トランスフェクション、パーティクルガン技術、リン酸カルシウム沈殿法、直接的マイクロインジェクション、ナノ粒子媒介性核酸送達などが挙げられる。

10

【0133】

いくつかの実施形態において、CRISPR/Cas媒介性遺伝子調節の成分は、送達系を用いて細胞へ導入することができる。ある特定の例では、送達系は、（ポリペプチドとして、または発現構築物によりコードされた）ヌクレアーゼ成分、ならびにDNAターゲティングRNA（例えば、修飾型単一ガイドRNA）および/またはドナー修復鋳型などの1つもしくは複数の核酸成分を含む、ナノ粒子、微粒子（例えば、ポリマー微粒子）、リボソーム、ミセル、ピロソーム、ウイルス粒子、核酸複合体、トランスフェクション剤、（例えば、NEONTランスフェクションシステムを用いる）エレクトロポレーション剤、ヌクレオフェクション剤、リポフェクション剤、および/またはバッファー系を含む。例えば、成分は、それらが、陽イオンの $\mu\text{m}$ 未満の水油エマルジョンへカプセル化またはパッケージング化されるようにリポフェクション剤と混合することができる。あるいは、成分は、送達系なしで、例えば、水溶液として送達することができる。

20

【0134】

リボソームを調製し、リボソーム内にポリペプチドおよび核酸をカプセル化する方法は、例えば、Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers: Methods and Protocols. (ed. Weissig). Humana Press, 2009およびHeyes et al. (2005) J Controlled Release 107: 276 - 87に記載されている。微粒子を調製し、ポリペプチドおよび核酸をカプセル化する方法は、例えば、Functional Polymer Colloids and Microparticles volume 4 (Microspheres, microcapsules & liposomes). (eds. Arshady & Guyot). Citus Books, 2002およびMicroparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. (eds. Cohen & Bernstein). CRC Press, 1996に記載されている。

30

40

【0135】

E．ゲノム編集の効率を評価するための方法

正しいゲノム編集改変の存在を機能的に検査するために、標的DNAを、当業者に知られた標準方法によって分析することができる。例えば、インデル変異は、SURVEYOR（登録商標）変異検出キット（Integrated DNA Technologies、Coralville、IA）またはGuide-it（商標）インデル同定キット（Clontech、Mountain View、CA）を用いてシーケンシングすることにより同定することができる。相同組換え修復（HDR）は、PCRに基づいた方法により、かつシーケンシングまたはRFLP分析と組み合わせて、検出することができ

50

る。PCRに基づいたキットの非限定的例には、Guide-it変異検出キット(Clonontech)およびGeneArt(登録商標)ゲノム切断検出キット(Life Technologies、Carlsbad、CA)が挙げられる。ディープシーケンシングもまた、特に多数の試料または候補のターゲット/オフターゲット部位について、用いることができる。

#### 【0136】

ある特定の実施形態において、ゲノム編集の効率(例えば、特異性)は、オンターゲットおよびオフターゲット事象を含む全てのゲノム切断事象の数またはパーセンテージに対する、オンターゲットゲノム切断事象の数またはパーセンテージに対応する。

#### 【0137】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された修飾型sgRNAは、対応する非修飾型sgRNAと比較して、初代細胞などの細胞において標的DNA配列のゲノム編集を増強する能力がある。ゲノム編集は、相同組換え修復(HDR)(例えば、挿入、欠失、または点変異)または非相同末端結合(NHEJ)を含み得る。

#### 【0138】

ある特定の実施形態において、細胞における標的DNA配列のヌクレアーゼ媒介性ゲノム編集効率は、対応する非修飾型sgRNA配列と比較して、本明細書に記載された修飾型sgRNAの存在下で、少なくとも約0.5倍、0.6倍、0.7倍、0.8倍、0.9倍、1倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、またはそれ以上、増強される。

#### 【0139】

F. 細胞における標的核酸の遺伝子調節のための方法

細胞において標的核酸の遺伝子調節、例えば、ゲノム編集、および/または遺伝子発現をモジュレートすること(例えば、阻害し、または活性化すること)を誘導するための方法が本明細書に提供される。細胞は、インビトロ(例えば、エクスピボ治療用の初代細胞)またはインビボ(例えば、ヒトなどの対象の器官または組織における細胞)であり得る。

#### 【0140】

ゲノム編集を誘導するための方法は、本明細書に記載された修飾型sgRNA、およびCasヌクレアーゼ(例えば、Cas9ポリペプチド)またはそのバリエーションもしくは断片か、Casヌクレアーゼ(例えば、Cas9ポリペプチド)またはそのバリエーションもしくは断片をコードするmRNAか、Casヌクレアーゼ(例えば、Cas9ポリペプチド)またはそのバリエーションもしくは断片をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターかのいずれかを細胞へ導入することを含む。修飾型sgRNAは、Casヌクレアーゼ(例えば、Cas9ポリペプチド)またはそのバリエーションもしくは断片を標的核酸(例えば、標的DNA)へ導く。修飾型sgRNAは、対応する非修飾型sgRNA配列と比較して、活性、安定性、および/または標的DNAに対する特異性が増強している。ある場合では、ゲノム編集は標的DNAの非相同末端結合(NHEJ)である。他の場合では、ゲノム編集は、標的DNAの相同組換え修復(HDR)である。HDRのいくつかの実施形態において、組換えドナー修復鋳型が細胞へ加えられる。組換えドナー修復鋳型は、標的DNAの2つの重複していない、相同部分を含む2つのヌクレオチド配列を含み得、そのヌクレオチド配列は、標的DNAに対応するヌクレオチド配列の5'末端および3'末端に位置する。いくつかの実施形態において、組換えドナー修復鋳型は、一塩基多型(SNP)を正すための変異をコードするヌクレオチド配列、および標的DNAの2つの重複していない、相同部分を含む2つのヌクレオチド配列を含む合成一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド(ssODN)を含み、前記2つのヌクレオチド配列が、変異をコードするヌクレオチド配列の5'末端および3'末端に位置する。修飾型sgRNA、および/またはCasヌクレアーゼ(例えば、Cas9ポリペプチド)もしくはそのバリエーションも

10

20

30

40

50

しくは断片か、C a sヌクレアーゼ（例えば、C a s 9ポリペプチド）もしくはそのバリエーションもしくは断片をコードするmRNAか、C a sヌクレアーゼ（例えば、C a s 9ポリペプチド）もしくはそのバリエーションもしくは断片をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターかのいずれかは、エレクトロポレーションによるなどの任意の適切な方法を用いて細胞へ導入される。

#### 【0141】

細胞において標的核酸、例えば、標的DNAの遺伝子発現をモジュレートする（例えば、阻害または活性化する）ための方法は、本明細書に記載された修飾型sgRNA、およびC a sヌクレアーゼ（例えば、C a s 9ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片か、C a sヌクレアーゼ（例えば、C a s 9ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片をコードするmRNAか、C a sヌクレアーゼ（例えば、C a s 9ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターかのいずれかを細胞へ導入する（例えば、エレクトロポレーションする）ことを含む。いくつかの実施形態において、C a sヌクレアーゼ（例えば、C a s 9）バリエーションはエンドヌクレアーゼ欠損C a s（例えば、d C a s 9）ポリペプチドである。ある例では、C a s 9バリエーションは、野生型C a s 9ポリペプチドと比較して2つ以上のアミノ酸置換を有し得る。他の例では、C a s 9バリエーションは、二本鎖DNAを切断することができない。C a sヌクレアーゼバリエーションは、C a s（例えば、d C a s 9）融合ポリペプチドであり得る。いくつかの実施形態において、その融合ポリペプチドは、転写抑制ドメイン、転写活性化ドメイン、転写因子、ヒストン修飾酵素（例えば、ヒストンデアセチラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ）、DNA修飾酵素（例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ）などを含む。

#### 【0142】

細胞において標的核酸、例えば、標的RNAの遺伝子発現をモジュレートする（例えば、阻害または活性化する）ための方法は、本明細書に記載された修飾型sgRNA、およびC a sヌクレアーゼ（例えば、C a s 9ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片か、C a sヌクレアーゼ（例えば、C a s 9ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片をコードするmRNAか、C a sヌクレアーゼ（例えば、C a s 9ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターかのいずれかを細胞へ導入する（例えば、エレクトロポレーションする）ことを含む。いくつかの実施形態において、C a sヌクレアーゼ（例えば、C a s 9）バリエーションは、ヌクレオチド鎖切断活性が低下し、または不足している。C a sヌクレアーゼバリエーションは、そのポリペプチドが二本鎖DNAを切断することができないように2つ以上のアミノ酸置換を含有することができる。C a sヌクレアーゼ（例えば、C a s 9）バリエーションは、エンドリボヌクレアーゼ活性を有し得、かつ標的RNAを切断することができる。

#### 【0143】

G. 対象において遺伝的疾患を予防または処置するための方法

本明細書に記載された修飾型sgRNAは、遺伝子調節の効率をモジュレートするために用いることができる。例えば、修飾型sgRNAは、対応する非修飾型sgRNAと比較して増強した活性で遺伝子調節を誘導することができる。ある場合では、増強した活性は、修飾型sgRNAの安定性の増加、および/または修飾型sgRNAの標的核酸に対する特異性の増加を含む。別の例として、修飾型sgRNAは、対応する非修飾型sgRNAと比較して細胞毒性を減少させて、遺伝子調節を誘導することができる。

#### 【0144】

修飾型sgRNAは、遺伝的疾患の標的化されたヌクレアーゼに基づいた治療法に適用することができる。患者の初代細胞のゲノムにおいて遺伝子変異を正確に正すための現在のアプローチは、非常に非効率的である（細胞の1パーセント未満が正確に編集され得る）。本明細書に記載された修飾型sgRNAは、ゲノム編集の活性を増強し、ゲノム編集に基づいた治療の効力を増加させることができる。特定の実施形態において、修飾型sg



R N A は、遺伝的疾患を有する対象における遺伝子のインビボ遺伝子編集に用いられ得る。修飾型 s g R N A は、任意の適切な投与経路を介して、ヌクレアーゼに基づいた治療の効果を増強する（例えば、ゲノム編集効率を向上させる）のに十分な用量または量で対象に投与することができる。

#### 【 0 1 4 5 】

疾患に関連した遺伝子変異を正すことにより、必要としている対象において遺伝的疾患を予防または処置するための方法が本明細書に提供される。方法は、本明細書に記載された修飾型 s g R N A を、変異を正すのに十分である量で対象に投与することを含む。疾患に関連した遺伝子変異を正すことにより、必要としている対象において遺伝的疾患を予防または処置するための薬物の製造における、本明細書に記載された修飾型 s g R N A の使用もまた本明細書に提供される。修飾型 s g R N A は、C a s ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9 ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片、C a s ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9 ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片をコードする m R N A、あるいは C a s ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9 ポリペプチド）またはそのバリエーションもしくは断片をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターも含む組成物中に含まれ得る。ある例では、修飾型 s g R N A は、上記の送達系内に含まれる。

10

#### 【 0 1 4 6 】

本方法により正され得る遺伝的疾患には、X連鎖重症複合免疫不全症、鎌状赤血球貧血、サラセミア、血友病、腫瘍症、癌、加齢黄斑変性、統合失調症、トリヌクレオチドリピート障害、脆弱X症候群、プリオン関連障害、筋萎縮性側索硬化症、薬物依存、自閉症、アルツハイマー病、パーキンソン病、嚢胞性線維症、血液凝固性疾患または障害、炎症、免疫関連疾患または障害、代謝性疾患、肝臓疾患および障害、腎臓疾患および障害、筋肉/骨格疾患および障害（例えば、筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー）、神経学的および神経細胞の疾患および障害、心血管疾患および障害、肺疾患および障害、眼疾患および障害、ウイルス感染症（例えば、H I V 感染症）などが挙げられるが、それらに限定されない。

20

#### 【実施例】

#### 【 0 1 4 7 】

以下の実施例は、主張された発明を例証するために提供されるが、限定するために提供されるのではない。

30

#### 【 0 1 4 8 】

#### [ 実施例 1 ]

化学修飾型ガイド R N A は、ヒト初代細胞において C R I S P R / C a s ゲノム編集を増強する

C R I S P R / C a s 媒介性ゲノム編集は、C a s エンドヌクレアーゼにより促進される部位特異的 D N A 切断を方向づけるガイド R N A に頼る。ここで、本発明者らは、化学合成された単一ガイド R N A ( s g R N A ) の使用に関して報告し、化学的变化による s g R N A の修飾が、ヒト初代 T 細胞および C D 3 4 + 造血幹細胞・造血前駆細胞においてゲノム編集を劇的に増強することを示す。このアプローチは、ゲノム編集の開発を合理化する簡便かつ非常に効果的な方法であり、C R I S P R / C a s 技術の多様な生物工学的および治療的適用を加速させる可能性をもつ。

40

#### 【 0 1 4 9 】

人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集は、関心対象となる、本質的にいかなるゲノム配列をも改変するための画期的技術である ( P o r t e u s , M . H . & C a r r o l l , D . , N a t u r e b i o t e c h n o l o g y 2 3 , 9 6 7 - 9 7 3 ( 2 0 0 5 ) ) 。この技術は、人工ヌクレアーゼを利用して、部位特異的二本鎖切断 ( D S B ) を生じさせ、続いて、内因性細胞修復機構により D S B を回復させる。その結果は、切断の部位において挿入もしくは欠失 ( イン / デル ) を生じる、変異原性の非相同末端結合 ( N H E J ) による特定部位の変異か、または外因的に導入されたドナー鋳型を用いる相同組換え ( H R ) によるゲノム配列の正確な変化かのいずれかであり得る ( H e n

50

del et al., Trends in Biotechnology 33, 132-140 (2015))。この技術への最近の主な追加は、RNAガイド型ヌクレアーゼ(Cas)および短鎖ガイドRNA(sgRNA)からなるクラスター化された規則的な配置の回文配列リピート(CRISPR)/Casシステムである(Jinek, M. et al., Science 337, 816-821 (2012)、Mali, P. et al., Science 339, 823-826 (2013)、Cong, L. et al., Science 339, 819-823 (2013)、Hsu et al., Cell 157, 1262-1278 (2014))。ガイドRNAは、CRISPR RNA(crRNA)およびトランス活性化型crRNA(tracrRNA)と名付けられた2つのRNAで構成されており、それらは、遺伝子編集を目的として、典型的には、キメラ単一ガイドRNA(sgRNA)として融合している。sgRNAは、100ヌクレオチド(nt)からなり、そのうちの5'末端における20ntが、ワトソン・クリック塩基対形成によって標的DNA配列とハイブリダイズし、標的ゲノムDNAを切断するようにCasエンドヌクレアーゼを導くことができる(図1A)。sgRNAは、例えばインビトロ転写により調製された、RNAとして、またはsgRNAがRNAポリメラーゼIIIプロモーターから発現する、DNAベクターを用いることにより、細胞へ送達することができる。CRISPR/Casシステムを用いるゲノム編集はヒト細胞株において非常に効率的であるが、ヒト初代細胞におけるCRISPR/Casゲノム編集は、一般的により困難である。この活性の減少についての理由は、捉えにくいままであるが、要因は、トランスフェクション率、プロモーター活性、エキソヌクレアーゼ活性、核酸を送達した時のインターフェロン自然免疫応答、およびDNA修復忠実度の差に関与し得る。ここで、本発明者らは、化学合成されたsgRNAが、高レベルのゲノム編集を誘導し得ることを実証し、かつさらに、sgRNAの化学的变化が、ヒト初代T細胞とCD34+造血幹細胞・造血前駆細胞(HSPC)の両方においてゲノム編集を劇的に増強し得ることを示す。化学修飾型sgRNAを用いてのこれらの細胞型におけるゲノム編集の増加は、DNA発現プラスミドを通してよりもむしろ、mRNAまたはタンパク質としてCas9を送達することにより、したがって、CRISPR/Casシステムのための単純かつ完全なRNAまたはリボ核タンパク質(RNP)に基づいた送達系を作製することにより、さらに向上する。

#### 【0150】

##### 結果

RNA合成技術における最近の進歩により、100nt長より長いRNAの化学合成が実行可能になった(Dellinger, D.J. et al., Journal of the American Chemical Society 133, 11540-11556 (2011))。ゲノム編集のための化学合成されたsgRNAの有用性を試験するために、本発明者らは、以前に記載された手順(Dellinger, D.J. et al., Journal of the American Chemical Society 133, 11540-11556 (2011))に従い、ABI 394合成機および2'-O-チオカルバメート保護ヌクレオシドホスホラミダイトを用いて、100ntの完全長sgRNAを合成した。本発明者らはまた、両終端に様々な化学修飾を有するsgRNAを合成して、それらの効力への効果を評価した(図1Aおよび1B、および表1)。存在する場合、2'-O-メチル(M)、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート(MS)、または2'-O-メチル3'チオPACÉ(MSP)を含む化学修飾を、5'末端と3'末端の両方における3個の終端ヌクレオチドに組み入れた。これらの3つの修飾は、それらの以前に報告された、血清およびヘビ毒ホスホジエステラーゼに対する安定性、および核酸の免疫賦活性へのそれらの広範な、報告された効果により、評価のために選択された(Deleavey, G.F. & Damha, M.J., Journal of the American Chemical Society 125, 940-950 (2003)、Hendel et al., Cell Reports 7, 293-305 (2014))

。本発明者らは、以前報告された3つのsgRNAを選択して、ヒト遺伝子、(i) IL2RG (その中の変異は、先天性原発性免疫不全症SCID-X1の原因である)、(ii) HBB (その中の変異は、鎌状赤血球貧血およびサラセミアの原因である)、および(iii) CCR5 (それは、HIVの共受容体をコードし、現在、抗HIV臨床試験において治療的遺伝子編集のための標的として研究中である) (Tebas, P. et al., The New England Journal of Medicine 370, 901-910 (2014))のそれぞれの細胞株において高い遺伝子編集率を得た(Hendel et al., Cell Reports 7, 293-305 (2014), Cradick et al., Nucleic Acids Research 41, 9584-9592 (2013))。本発明者らはまず、インビトロで、精製組換えCas9タンパク質および合成sgRNAのそれぞれの存在下で標的DNA切断を試験した。全ての、化学合成され、かつ修飾されたsgRNAは、Cas9タンパク質の存在下でそれらのDNA標的を効率的に切断した(図3および4)。

#### 【0151】

本発明者らは、次に、合成sgRNAが、ヒト細胞株において、変異原性NHEJおよび遺伝子破壊を示している標的化イン/デルを誘導することができるかどうかを調べた。本発明者らは、Cas9をコードするDNAプラスミドと共に各sgRNAをK562細胞へヌクレオフェクションにより送達し、イン/デル頻度を分析した。IL2RG遺伝子座を標的にする1μgの合成非修飾型sgRNAの送達は、2.4%の標的化イン/デル頻度を生じ、その機能性を実証した(図1C、明るい色調のバー)。M修飾型sgRNAについて、本発明者らは、非修飾型sgRNAと比較して、安定性の中程度の向上を示唆する、13.5%へのイン/デル頻度の小さい増加を観察した。顕著なことには、同じ量の化学修飾型sgRNAが、MS修飾型sgRNAおよびMSP修飾型sgRNAについて、それぞれ、68.0%および75.7%へイン/デル頻度を増加させた。修飾型sgRNAの量を20倍、増加させることは、全ての場合においてイン/デル頻度をさらに増加させ、MS sgRNAおよびMSP sgRNAについてそれぞれ、75.3%および83.3%に達し(図1C、暗い色調のバー)、CRISPR/Casシステムをプラスミドから発現させることにより得られる頻度に匹敵した。HBBおよびCCR5標的について非常に類似した結果が得られ(図1C)、ヒト細胞において高レベルの標的化遺伝子変異を方向づける化学修飾型sgRNAの全般的な能力を実証した。本発明者らは次に、これらの合成sgRNAが、HRによる遺伝子ターゲティングを刺激することができるかどうかを決定した。本発明者らは、CRISPR切断部位の5'側および3'側に相同性の約0.8kbのアームを有する、3つの遺伝子座のそれぞれについてのターゲティングベクターを設計した。相同アーム間に、本発明者らは、HR成功時に標的遺伝子座に安定的に組み込まれ得るGFP発現カセットを含めた(Lombard, et al., Nature Methods, 8, 861-869 (2011); Voit et al., Nucleic Acids Research 42, 1365-1378 (2014))。全ての3つの標的遺伝子座において、MS sgRNAおよびMSP sgRNAは、非修飾型およびM修飾型sgRNAより有意に高いレベルのHRを刺激した(図1D)。より高いsgRNAレベル(20μg)において、本発明者らは、IL2RG、HBB、およびCCR5において、それぞれ、MSP sgRNAについて、20.6%、25.5%、および50.0%のHR率を測定した。これらの頻度は、CRISPR/Casシステムを完全にプラスミドから発現させることにより得られる頻度に匹敵し、またはそれより高い。

#### 【0152】

化学修飾型sgRNAがオフターゲット活性に影響するかどうかを調べるために、本発明者らは、ディープシーケンシングを用いて、各sgRNAについて3つの異なる遺伝子座におけるオフターゲット変異頻度を測定した。8個のこれらのオフターゲット部位は、インシリコ予測ツールにより予測され(Hsu et al., Nature Bio

10

20

30

40

50

technology 31, 827-832 (2013)、Cradick et al., Molecular therapy. Nucleic acids, 3, e214 (2014))、HBB sgRNAについて、本発明者らは、sgRNAが高レベルのオフターゲット活性を有することが以前に示されている1個のオフターゲット部位を含めた(Cradick et al., Nucleic Acid Research, 42, 9584-9592, (2013))。8個の予測部位のうち4個について、本発明者らは、修飾型sgRNAに関して高レベルのオンターゲット活性を検出したにも関わらず、全ての化学修飾型sgRNAに関してバックグラウンド近くのオフターゲット活性を見出した(図1Eおよび5、表5)。sgRNAの化学修飾は、他の4個の予測部位においてより高いオフターゲット活性を生じる傾向にあったが、その活性レベルは変化しやすかった。ある場合では、オフターゲットのイン/デル頻度に対するオンターゲットのイン/デル頻度の比率は、修飾型sgRNAに関して向上し、相対的な特異性の向上が示唆された。これらの結論の詳細は、下記に要約されている。本発明者らは、2個のオフターゲット部位(IL2RG「オフターゲット2」およびHBB「オフターゲット1」(その部位において、HBB sgRNAが有意なオフターゲット活性を以前、示した))において、非修飾型sgRNAについて、活性を検出ただけで、それにより、非修飾型sgRNAと修飾型sgRNAの間で、オンターゲット：オフターゲット比率を比較することができた。IL2RG部位において、オンターゲット：オフターゲット比率は、MSP sgRNAと比較して、非修飾型sgRNAについて5.8倍、良かったが(図1Eおよび表5)、HBB部位について、この比率は、非修飾型sgRNAと比較してMSP sgRNAについて、2.6倍および1.5倍(1μgおよび20μgについて)、良かった(図1Eおよび5、表5)。修飾型sgRNAのオンターゲット：オフターゲット比率をsgRNAプラスミドのオンターゲット：オフターゲット比率と比較すると、sgRNAプラスミドは、CCR5「オフターゲット2」およびIL2RG「オフターゲット2」においてより良い比率を有し、一方、HBB「オフターゲット1」について、MSP sgRNAは、より良いオンターゲット：オフターゲット比率を有した(図1Eおよび表5)。HBBオフターゲット1部位を除いて、測定された最も高いオフターゲット頻度は、IL2RG sgRNAに関する「オフターゲット2」においてであり、1μgおよび20μg MS sgRNAを用いた場合、それぞれ、1.0%および7.8%のイン/デル頻度を生じた。興味深いことに、同じ部位におけるIL2RG MSP sgRNAのオフターゲット活性は、MS sgRNAと比較して、より高いオンターゲット活性を有したにも関わらず、それぞれ、2.7分の1および2.8分の1であった。同様に、MSP sgRNAのオフターゲット活性は、HBBオフターゲット1部位(その部位において、HBB sgRNAが有意なオフターゲット活性を以前、示した)においてMS sgRNAと比較して良かった。CCR5「オフターゲット2」において、その正反対が観察され、MSP sgRNAが、MS sgRNAと比較して、より高いオフターゲット活性を有した。まとめて考えると、これらの結果は、典型的には、化学修飾型sgRNAが高特異性を保持することを示唆している。オンターゲット：オフターゲット比率において観察された差は、sgRNAへの化学的変化が、オンターゲット：オフターゲット活性をモジュレートする潜在能力を有し得るが、所定の化学的変化の影響は、配列依存性であるように思われ、かつ細胞型および送達条件などの他の因子にも依存し得るという可能性を示唆している。これらの観察が、異なる種における異なる遺伝子座を標的にする他のsgRNAへ一般化可能であるかどうかは、さらなる研究を必要とするだろう。

#### 【0153】

ヒト細胞株において化学修飾型sgRNAのパフォーマンスをさらに探求するために、本発明者らは、Cas9をコードするmRNAと共にsgRNAを同時送達する「全RNA」送達プラットフォームに変えた。本発明者らは、様々な量のMSP sgRNA(1~20μg)と共に様々な量のCas9 mRNA(1~15μg)を用いて、IL2RG遺伝子座におけるイン/デル頻度を測定した(図6)。本発明者らは、Cas9 mR

10

20

30

40

50

NAおよびMSP sgRNAのそれぞれ1  $\mu$ gを用いた場合の70%イン/デルへの中程度の減少を除いて、試験された全ての濃度について81~90%の間のイン/デルの高率を同様に観察し、この「全RNA」アプローチの高効率が実証された。化学修飾が、sgRNA活性の半減期へ効果を生じるかどうかを探索するために、本発明者らは、Cas9 mRNA、およびIL2RGを標的にする様々な合成sgRNAをヌクレオフェクションにより同時送達するか、または連続的に送達するかのいずれかである実験を実施した(図7)。Cas9 mRNA、およびMSP sgRNAかまたはMSP sgRNAのいずれかの同時送達は、それぞれ、87%および84%イン/デルの高い編集頻度を生じた(図1F)。M sgRNAが66%イン/デルを生じたが、非修飾型sgRNAは、中程度の7.0%を生じ、Cas9 mRNAと同時に送達する場合のsgRNA修飾の重要性を明らかに表している。興味深いことに、最初にCas9 mRNAを送達し、4時間または8時間後にsgRNAを送達することは、全ての4個のsgRNAにわたって、イン/デルの高く、かつ同等のレベル(83.1%~92.4%)を生じ、非修飾型sgRNAと化学修飾型sgRNAの間での効率に差がなかった(図1F)。対照的に、最初にsgRNAを送達し、続いて、4時間後、8時間後、12時間後、または24時間後にCas9 mRNAを送達した場合、非修飾型sgRNAを用いて得られたイン/デル頻度は、4時間時点までにすでに、バックグラウンド近くのレベルへ降下した。M sgRNAについて、本発明者らはまた、イン/デル頻度のバックグラウンド近くのレベルへの減少を観察したが、この降下は、わずかに遅れ、非修飾型sgRNAより優る、安定性の中程度の向上を示唆した。MSP sgRNAについて、本発明者らは、24時間時点(その時点において、率は53%へ降下した)までイン/デル頻度の減少を観察しなかった。顕著なことには、MSP sgRNAについて、本発明者らは、sgRNA送達とCas9送達との間の24時間遅延後さえも、活性の有意な減退を検出しなかった。これらの結果は、sgRNA末端修飾が、細胞内安定性を増強し、それにしただって、Cas9 mRNAおよびsgRNAがヒト細胞へ同時送達された場合、ゲノム編集の効力の増加を可能にするという本発明者らのモデルと一致している。非修飾型sgRNAによって方向づけられたイン/デル頻度は、Cas9が最初に送達された場合、低下しなかったという事実は、Cas9タンパク質がsgRNAを分解から保護することを示唆している。この仮説を調べるために、本発明者らは、非修飾型またはMSP IL2RG sgRNAを組換えCas9タンパク質と複合体化し、その後、この活性RNPを2つの異なる量でK562細胞へエレクトロポレーションした(図1Gおよび8)。低量のRNPに関して、本発明者らは、非修飾型sgRNAと比較して、MSP sgRNAを用いた場合、3.8倍高いイン/デル頻度を観察し(35.7%対9.5%)、高量のRNPについて、この増加は、2.3倍であった(81.0%対35.9%)。しかしながら、MSP sgRNAと非修飾型sgRNAの間のこの比率は、sgRNAをCas9 mRNAと同時に送達した場合に観察されたものより(図1F「同時送達」と比較して)有意に低く、Cas9タンパク質が非修飾型sgRNAを分解から部分的に保護することを示している。それでもなお、sgRNAへの修飾は、Cas9タンパク質とあらかじめ複合体化したsgRNAを送達する場合、遺伝子編集効率をさらに向上させる。次に、本発明者らは、Cas9プラスミドと共に、Cas9 mRNAと共に、またはcas9タンパク質とあらかじめ複合体化して送達された場合、3つの以前に調べられたオフターゲット部位において、非修飾型IL2RG sgRNAとMSP IL2RG sgRNAのオフターゲット活性を比較した。非修飾型sgRNAに関して、本発明者らは、全ての3つのCas9供給源および全ての3つのオフターゲット部位にわたって、低レベル(<0.37%)のイン/デルを検出した(図9A~B)。MSP sgRNAについて、本発明者らは、Cas9 mRNAと比較して、Cas9プラスミドを送達した場合、全ての3つのオフターゲット部位においてオンターゲット：オフターゲット比率の向上を観察した(2.6~3.0倍)。とりわけ、MSP sgRNAとのCas9 RNP送達に関して、本発明者らは、Cas9プラスミドおよびmRNAと比較して、全ての3つの部位について、有意により良いオンターゲット：オフターゲット比率を検出し、それらの部位のうちの2つにおいてはバック

10

20

30

40

50

グラウンド近くのオフターゲット活性であった。要約すれば、化学修飾型 sgRNA は、Cas9 mRNA と同時送達され、または RNP として送達される場合、ヒト細胞株における遺伝子編集について非修飾型 sgRNA より有意な優位性を示している。

#### 【0154】

本発明者らは、次に、初代細胞において化学修飾型 sgRNA を試験した。CD4 + T 細胞におけるジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を用いたCCR5 遺伝子破壊は、抗HIV処置としての臨床試験において現在、探求中である (Tebas et al., New Eng Jour of Med, 370, 901-910 (2014))。しかしながら、最近の研究により、ヒト初代T細胞が、単一sgRNAを用いるCRISPR/Cas9 プラスミドシステムで編集することは本質的に困難であること、および細胞株において高い対立遺伝子改変頻度を生じるsgRNAが、トランスフェクトされた細胞について濃縮した場合でさえも、T細胞における効力を実質的に低下させていることが見出された (Mandal et al., Cell Stem Cell, 15, 643-652 (2014))。本発明者らは、刺激ヒト初代T細胞において、Cas9コードmRNAと同時に送達される、化学修飾型CCR5 sgRNAを試験した。注目すべきことには、GFP mRNAを用いて、本発明者らは、フローサイトメトリにより測定された場合、T細胞において98%より高いヌクレオフェクション効率を一貫して観察し (図10)、トランスフェクトされた細胞について濃縮する必要はなくなった。sgRNAとCas9の両方をコードするsgRNAプラスミドのヌクレオフェクションは、バックグラウンドより上の対立遺伝子改変頻度を生じなかった (図2A)。しかしながら、MSP sgRNAの、Cas9についてのDNA発現プラスミドとの同時トランスフェクションは、活性を9.3%イン/デル頻度まで救出することができた。Cas9 mRNAの非修飾型sgRNAまたはM sgRNAとのヌクレオフェクションは、バックグラウンドより上の対立遺伝子改変率を生じなかった。対照的に、Cas9 mRNAのMS sgRNAまたはMSP sgRNAのいずれかとのヌクレオフェクションは、それぞれ、著しい48.7%および47.9%イン/デル頻度を生じた。sgRNAまたはCas9 mRNAの量を増加させることは、より高いイン/デル頻度を生じなかった (図11)。Cas9 mRNAおよびMSP sgRNAでヌクレオフェクションされた細胞について、本発明者らは、CD4 +、CD8 +、および総T細胞集団において、同等の対立遺伝子改変頻度を見出した (図12)。重要なことには、観察された高い改変頻度は、21日間の時間経過にわたって、MSP sgRNAについて測定された場合、安定であり (図13)、本発明者らは、有意な細胞死を引き起こし、かつ増殖ポテンシャルを減少させたプラスミドヌクレオフェクションとは対照的に、修飾型sgRNAでのヌクレオフェクション後、細胞生存率および増殖へわずかな影響を観察しただけであった (図14および15)。本発明者らはまた、刺激T細胞より編集することがより困難であることが示されている非刺激T細胞において (Yi et al., Molecular Therapy Nucleic Acids, 3, e198 (2014))、MS sgRNAを試験した。刺激T細胞とは対照的に、非刺激T細胞におけるイン/デル頻度は、6.6%から22.2%までの範囲であり、より高いドナー変動性を示した (図16)。刺激T細胞においてより低い、非刺激T細胞におけるこれらの編集頻度は、特に、活性化および長期培養が細胞のその後の生物学的機能性に影響し得る、T細胞を操作することにおいて、なお有用性を有し得る。本発明者らは、次に、刺激初代T細胞において非修飾型sgRNAおよびMS sgRNAを用いるRNP送達を試験した (図2B)。K562細胞において得られた結果と同様に、本発明者らは、非修飾型sgRNAよりMS sgRNAのイン/デル頻度の2.4倍の向上を観察し (30.7%対12.8%)、Cas9タンパク質とあらかじめ複合体化して送達される場合の化学修飾型sgRNAの使用をさらに支持している。

#### 【0155】

HSPCにおける遺伝子治療は、造血系の遺伝的または後天性障害を処置するために広く探求されている。本発明者らは、IL2RGおよびHBBを標的にする化学修飾型sg

10

20

30

40

50

RNAが、動員化末梢血から単離されたCD34 + HSPCにおいて機能するかどうかを試験した。この場合も先と同様に、sgRNAとCas9の両方を発現するsgRNAプラスミドは、検出可能なイン/デル頻度を生じなかったが、Cas9 DNA発現プラスミドとのMSP sgRNAの同時トランスフェクションが、IL2RGおよびHBBについて、それぞれ、3.2%および5.2%までイン/デル頻度を救出した(図2Cおよび17)。T細胞における本発明者らの観察と同様に、本発明者らは、Cas9 mRNAと同時トランスフェクトされた場合、非修飾型sgRNAまたはM sgRNAを用いて、いずれの遺伝子座においてもイン/デルを検出しなかったが、MSP sgRNAおよびMSP sgRNAは、それぞれ、高いイン/デル頻度を生じ、IL2RGに関して、本発明者らは、MSP sgRNAおよびMSP sgRNAについて、それぞれ、17.5%および17.7%のイン/デル頻度を検出し、HBBに関して、頻度は、それぞれ、23.4%および22.0%で、さらに高かった。さらなる研究により、化学修飾型sgRNAによるHSPCの遺伝子改変が、それらの多分化能に影響するかどうかを、または編集効率が、長期増殖幹細胞と系列コミットされた前駆細胞との間で異なるかどうかを解明することができた。

#### 【0156】

最近の研究により、2つのsgRNAの同時使用が、ヒト初代T細胞およびCD34 + HSPCにおいて遺伝子破壊を向上させ得ることが示された(Mandal et al., Cell Stem Cell, 15, 643-652 (2014))。本発明者らは、205bpを切り離すその研究において報告された配列(「D」および「Q」と名付けられた)を有するMSおよびMSP CCR5 sgRNAを化学合成した。本発明者らは、それらを、Cas9 mRNAと同時送達されたT細胞およびCD34 + HSPCにおいて試験した。その2つのsgRNAが個々に用いられた場合、本発明者らは、TIDE分析を用いて対立遺伝子改変頻度を定量化した。両方が用いられた場合、本発明者らは、クローニングされたPCR産物のシーケンシングにより対立遺伝子改変頻度を定量化し、そのシーケンシングはまた、以前報告された、その2つのsgRNA標的部位間の配列の欠失の高い発生率を含む、編集事象の全範囲を定量化することを可能にした。初代T細胞において個々に用いられた場合、「D」sgRNAは、MS sgRNAおよびMSP sgRNAについて、それぞれ、56.0%および56.3%を生じ、「Q」sgRNAは、それぞれ、62.6%および69.6%を生じた(図2Dおよび18A)。組み合わせで用いられた場合、対立遺伝子改変の頻度は、本発明者らがMS sgRNAおよびMSP sgRNAについて、それぞれ、73.9%および93.1%を観察したように、増加し、それらのうち、改変事象の大部分は、2つのsgRNA標的部位間の欠失であった(図18B)。CD34 + HSPCにおいて、本発明者らの観察は類似していたが、全体的な頻度はより低かった。したがって、本発明者らは、MS sgRNAおよびMSP sgRNAについて、それぞれ、「D」sgRNAについては9.8%および11.2%、および「Q」sgRNAについては17.8%および19.2%の対立遺伝子改変頻度を観察した(図2Dおよび18B)。組み合わせで用いられた場合、その頻度は、MS sgRNAおよびMSP sgRNAについて、それぞれ、37.8%および43.0%へ増加した。本発明者らは、2つの化学修飾型sgRNAの使用が、ヒト初代T細胞およびCD34 + HSPCにおいて遺伝子破壊を促進する非常に効果的な方法であると結論づける。

#### 【0157】

図19は、MS修飾型sgRNAが、CD34 + HSPCにおいて対応する非修飾型sgRNAより良く機能することを示す追加の実験データを提供する。図20は、修飾型sgRNAが、効率的な多重化ゲノム編集に用いられ得ることを示す。

#### 【0158】

この研究において、本発明者らは、化学合成されたsgRNAが、標的化ゲノム編集へ効果的に用いられ得ることを示し、かつ化学修飾型sgRNAが、ヒト初代T細胞およびCD34 + HSPCにおいてゲノム編集効率を有意に増強することを実証している。化学

合成され、かつ修飾された sgRNA は、発現した、またはインビトロで転写された sgRNA に優る利点を提供し、その中で、(1) 効力の増加、(2) 生物工学的および治療的適用のための高度に純粋な sgRNA のロバストかつスケーラブルな製造、(3) sgRNA のプラスミド発現またはインビトロ転写、それぞれに典型的に用いられる、U6 または T7 プロモーターにより強要される最初の転写されるヌクレオチドにおける制約とは対照的な、sgRNA デザインにおけるより高い柔軟性、および(4) DNA プラスミドに基づいた系より初代細胞において細胞毒性が低く、高活性の「RNA のみ」または RNP CRISPR プラットフォームの使用可能性がある。CRISPR/Cas システムの純粋な RNA または RNP CRISPR システムへの単純化は、インビボでの送達用の異なるナノ粒子ベクターにおける製剤に役立ち、その結果、ヌクレアーゼは、それがウイルスベクターの一部として送達された時の場合のように連続的に発現することはないだろう。さらに、本発明者らは、化学修飾型 sgRNA が、多重化ゲノム編集、およびハイスループットマルチウェル実験を増強するだろうと予測する。本発明者らはまた、修飾型 sgRNA が、遺伝子発現の阻害および活性化のための CRISPRi/CRISPRa システム (Gilbert, L. A. et al., Cell 159, 647-661 (2014))、ゲノム遺伝子座の動的可視化のための CRISPR 画像化ツール (Chen, B. et al., Cell 155, 1479-1491 (2013))、ならびに CRISPR 媒介性 RNA 認識および切断 (O'Connell, M. R. et al., Nature 516, 263-266 (2014)) などの幅広い範囲の CRISPR 関連技術を精巧にするだろうと予測する。その技術は、標的細胞または組織への細胞内送達を向上させ、かつ画像化および生化学的研究のために様々な分子へのコンジュゲーションを可能にするように、さらに開発され得る。将来の研究は、より多様な化学修飾を調べ、最適化 sgRNA の合理的デザインのために修飾の種々の位置、加えて、修飾型 sgRNA の活性の増強についての機構を探求することができる。結論として、本発明者らは、本明細書に提示されたもののような化学修飾型 sgRNA が、幅広い CRISPR/Cas 生物工学的および治療的適用を有意に向上させるだろうと信じている。

#### 【0159】

##### 材料および方法

##### 1. sgRNA 合成

全ての RNA オリゴマーを、ABI 394 合成機 (Life Technologies、Carlsbad、CA、USA) において、2'-O-チオノカルバメート保護ヌクレオシドホスホラミダイト (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA または Thermo Fisher、Waltham、MA、USA) を用いて、以前、記載された手順 (Dellinger et al., Journal of the American Chemical Society 133, 11540-11556 (2011)) に従って合成した。2'-O-メチルホスホラミダイトを、Thermo Scientific、Grand Island、NY から購入し、2'-O-チオノカルバメート保護ヌクレオシドホスホラミダイトと同じ条件下で RNA オリゴマーへ組み入れた。チオホスホノアセテート (チオPACE) 修飾型 RNA の合成に用いられる 2'-O-メチル-3'-O-(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ酢酸-1, 1-ジメチルシアノエチルエステル-5'-O-ジメトキシトリチルヌクレオシドを、本質的に、公開された方法 (Threlfall et al., Organic & biomolecular chemistry, 10, 746-754 (2012); Dellinger et al., Journal of the American Chemical Society, 125, 940-950 (2003)) に従って合成した。ホスホロチオエート含有オリゴマーについて、カップリング反応後のヨウ素酸化ステップを、ピリジン-アセトニトリル (3:2) 混合物中、6 分間の 3-(N,N-ジメチルアミノメチリデン)アミノ-3H-1, 2, 4-ジチアゾール-5-チオンの 0.05 M 溶液を用いる硫化ステップに置き換えた。特に断



りのない限り、固相RNA合成のための試薬は、Glen Research (Sterling, VA, USA) から購入された。

【0160】

全てのオリゴヌクレオチドを、逆相HPLCを用いて精製し、Agilent 6520 Q-TOF質量分析計 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) と連結されたAgilent 1290 Infinity シリーズLCシステムを用いるLC-MSにより分析した。表1は、用いられた全てのsgRNAの配列、および見出されたピークの電荷状態シリーズのデコンボリューションから得られた質量を示す。デコンボリューションは、Mass Hunter Qualitative Analysis (バージョンB.06.00) ソフトウェア (Agilent) を用いて行われた。

10

【0161】

【表 1】

表 1. 本研究に用いられた全ての sgRNA の概観

配列番号	名称	配列	計算された質量 (Da)	観察された質量 (Da)
配列番号 4	HBB 非修飾型 sgRNA	CUUGCCCCACAGGGCAGUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	32187.4 2	32187.8 4
配列番号 5	HBB M sgRNA	<u>CUUGCCCCACAGGGCAGUAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG</u> <u>CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA</u> <u>GUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU</u>	32271.5 4	32271.3 5
配列番号 6	HBB MS sgRNA	<u>C●U●U●GCCCCACAGGGCAGUAAGUUUUAGAGCUAGAAA</u> <u>UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA</u> <u>AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU●U●U●U</u>	32367.4 2	32367.3 1
配列番号 7	HBB MSP sgRNA	<u>C●U●U●GCCCCACAGGGCAGUAAGUUUUAGAGCUAGAAU</u> <u>AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA</u> <u>AAGUGGCACCGAGUCGGUGCU●U●U●U</u>	32619.9 3	32619.3 9
配列番号 8	IL2G 非修飾型 sgRNA	UGGUAAUGAUGGCUUCAACAGUUUUAGAGCUAGAAAUUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	32214.4 0	32214.3 7
配列番号 9	IL2G M sgRNA	<u>UGGUAAUGAUGGCUUCAACAGUUUUAGAGCUAGAAAUUA</u> <u>GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA</u> <u>AGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU</u>	32298.5 2	32297.0 1
配列番号 10	IL2G MS sgRNA	<u>U●G●G●UAAUGAUGGCUUCAACAGUUUUAGAGCUAGAAA</u> <u>UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA</u> <u>AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU●U●U●U</u>	32394.4	32395.4 3
配列番号 11	IL2G MSP sgRNA	<u>U●G●G●UAAUGAUGGCUUCAACAGUUUUAGAGCUAGAAA</u> <u>UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA</u> <u>AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU●U●U●U</u>	32646.9 1	32645.3 9
配列番号 12	CCR5 非修飾型 sgRNA	GGCAGCAUAGUGAGCCAGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	32290.5 1	32289.0 7
配列番号 13	CCR5 M sgRNA	<u>GGCAGCAUAGUGAGCCAGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAG</u> <u>CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA</u> <u>GUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU</u>	32374.6 3	32375.3
配列番号 14	CCR5 MS sgRNA	<u>G●G●C●AGCAUAGUGAGCCAGAGUUUUAGAGCUAGAAA</u> <u>UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA</u> <u>AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU●U●U●U</u>	32470.5 1	32469.9 2
配列番号 15	CCR5 MSP sgRNA	<u>G●G●C●AGCAUAGUGAGCCAGAGUUUUAGAGCUAGAAA</u> <u>UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA</u> <u>AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU●U●U●U</u>	32723.0 2	32721.9 6
配列番号 16	CCR5 'D' MS sgRNA	<u>U●C●A●CUAUGCUGCCGCCAGUGUUUUAGAGCUAGAAA</u> <u>UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA</u> <u>AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU●U●U●U</u>	32281.3 2	32282.5 2
配列番号 17	CCR5 'D' MSP sgRNA	<u>U●C●A●CUAUGCUGCCGCCAGUGUUUUAGAGCUAGAAU</u> <u>AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA</u> <u>AAGUGGCACCGAGUCGGUGCU●U●U●U</u>	32533.8 3	32533.5 5
配列番号 18	CCR5 'Q' MS sgRNA	<u>G●C●U●GUGUUUGGUCUCUCCCGUUUUAGAGCUAGAAA</u> <u>UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA</u> <u>AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU●U●U●U</u>	32252.2 2	32253.2 1
配列番号 19	CCR5 'Q' MSP sgRNA	<u>G●C●U●GUGUUUGGUCUCUCCCGUUUUAGAGCUAGAAU</u> <u>AGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA</u> <u>AAGUGGCACCGAGUCGGUGCU●U●U●U</u>	32504.7 3	32504.6 3

【 0 1 6 2 】

sgRNA 配列、ならびに、計算された、および観察された分子量が示されている。2'-O-メチル修飾を有するヌクレオチドは下線が引かれている。リン酸バックボーンにおける修飾は、黒丸 (MS) および菱形 (MSP) で示されている。

【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

50

## 2. インビトロ切断アッセイ

4 kb PAMアドレス可能な標的を、プラスミド由来のヒト配列の調製用PCR増幅により調製した。20 µL反応体積において、50 nM sgRNA、39 nM 組換え精製Cas9タンパク質(Agilent)、および10 mM MgCl<sub>2</sub>の存在下、pH 7.6で50フェントモルの直線化されたDNA標的を、37 °Cで30分間、インキュベートした。完了時に、0.5 µLのRNase-It(Agilent)を加え、インキュベーションを37 °Cで5分間、その後、70 °Cで15分間、継続した。その後、0.5 µLのプロテイナーゼK(分子生物学グレード、NEB)を加え、37 °Cで15分間、インキュベートした。アリコートでDNA 7500 LabChipにローディングし、Bioanalyzer 2200で分析した。切断頻度を、式： $(a/b) \times 100$  (式中、「a」は、2つの切断生成物のバンド強度の合計であり、bは、切断された、および切断されていないDNAのバンド強度の合計である)により計算した。

【0164】

## 3. プラスミド

sgRNA発現ベクターを、ヒトコドン最適化SpCas9発現カセット、およびキメラsgRNAの発現を作動させるヒトU6プロモーターを含有するpX330(Addgeneプラスミド#42230)への20 bpオリゴヌクレオチド標的配列のクローニングにより構築した(sgRNA配列について表1参照)。

【0165】

全ての3つのプラスミドターゲティングベクターは、相同性のおよそ2 × 800 bpアームを有し、それらのアームは、K562細胞から単離されたゲノムDNAを用いた対応する遺伝子座のPCR増幅により作製された。その後、相同アームを、標準クローニング方法を用いて、pBluescript SK+に基づいた約2,900塩基対ベクターへクローニングした。相同アーム間に、HBBドナーとCCR5ドナーの両方は、GFPの発現を作動させるEF1プロモーターを含有する。IL2RGドナーは、プロモーターを欠き、GFP発現を作動させるためにIL2RG遺伝子の内因性活性に頼る。IL2RGターゲティングベクターの核酸配列は配列番号1として示されている。HBBターゲティングベクターの核酸配列は配列番号2として示されている。CCR5ターゲティングベクターの核酸配列は配列番号3として示されている。

【0166】

## 4. 細胞培養およびヌクレオフェクション

K562細胞およびT細胞を、37 °C、5%CO<sub>2</sub>、および周囲酸素レベルで培養した。CD34+造血幹細胞/造血前駆細胞(HSPC)を、37 °C、5%CO<sub>2</sub>、および5%O<sub>2</sub>で培養した。K562細胞を、10%ウシ成長血清、100 mg/mLストレプトマイシン、100ユニット/mLペニシリン、および2 mM L-グルタミンを追加したRPMI 1640(Hyclone)中で維持した。K562細胞を、Lonza Nucleofector 2b(プログラムT-016)、および100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、15 mM NaHCO<sub>3</sub>、12 mM MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O、8 mM ATP、2 mM グルコースを含有するヌクレオフェクションバッファー(pH 7.4)を用いてヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクション条件は、100 µLヌクレオフェクション溶液、10<sup>6</sup>個の細胞、1~20 µg 化学修飾型sgRNA、1~15 µg Cas9 mRNA(Cas9 mRNA、5meC、製品コード:L-6125、TriLink BioTechnologies、San Diego、CA、USA)、2 µg sgRNA/Cas9コードプラスミド、または5 µg HRドナープラスミドである。CD3+T細胞を、ヒトPan T細胞単離キット(Miltenyi Biotec、San Diego、CA、USA)を用いて、Stanford School of Medicine Blood Centerから入手されたパフィーコートから単離した。CD3+細胞を、5%ヒト血清(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)、100 IU/mL ヒト組換えIL-2(PeproTech、Rocky Hill、NJ、USA)、および10 ng/mL ヒト組換

えIL-7 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を追加したX-VIVO 15 (Lonza, Walkersville, MD, USA)中で維持した。ヌクレオフェクション前に、T細胞を、固定化抗CD3抗体(クローン: OKT3、eBioscience, San Diego, CA, USA)および可溶性抗CD28抗体(クローン: CD28.2、eBioscience)で3日間、活性化した。非活性化CD3+T細胞について、細胞を、単離後すぐにヌクレオフェクションした。T細胞を、Lonza Nucleofector 2b(プログラムU-014)およびヒトT細胞Nucleofectorキット(VPA-1002、Lonza)を用いてヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクション条件は、100 $\mu$ Lヌクレオフェクション溶液、10<sup>6</sup>個の細胞、10~20 $\mu$ g 化学修飾型sgRNA、15~30 $\mu$ g Cas9(または15 $\mu$ g eGFP mRNA、TriLink BioTechnologies, San Diego, CA, USA)、1 $\mu$ g sgRNA/Cas9コードプラスミドである。動員化ヒト末梢血CD34+HSPCを、AllCellsから購入し、製造会社の使用説明書に従って解凍した。CD34+HSPCを、SCF(100ng/ml)、TPO(100ng/ml)、Flt3-リガンド(100ng/ml)、IL-6(100ng/ml)、およびStemRegenin1(0.75mM)を追加したX-VIVO 15(Lonza)中で維持した。CD34+HSPCを、Lonza 4D-Nucleofector(プログラムEO-100)およびP3初代細胞4D-Nucleofectorキット(V4XP-3024)を用いて、ヌクレオフェクションした。ヌクレオフェクション条件は、100 $\mu$ Lヌクレオフェクション溶液、5 $\times$ 10<sup>5</sup>個の細胞、10 $\mu$ g 化学修飾型sgRNA、15 $\mu$ g Cas9 mRNA、1 $\mu$ g プラスミドである。Cas9 RNP実験について、Cas9タンパク質をPNA Bio(Thousand Oaks, CA, USA)またはLife Technologies(Carlsbad, CA, USA)から購入した。図8を除く全てのRNP実験について、PNA Bio社製のCas9タンパク質を用いた。Cas9タンパク質を、sgRNAと、1:2.5のCas9:sgRNAモル比で、25で10分間、複合体化させた。RNPを、上記のように、100 $\mu$ Lのそれぞれのヌクレオフェクション溶液中の10<sup>6</sup>個の細胞を用いて、K562細胞またはT細胞へヌクレオフェクションした。二重sgRNA実験について、全sgRNA量は、10 $\mu$ gであった(個々に用いられる場合は10 $\mu$ g、一緒に用いられる場合は2 $\times$ 5 $\mu$ g)。T細胞とCD34+HSPCの両方について、sgRNAを、15 $\mu$ g Cas9 mRNAと共に10<sup>6</sup>個の細胞へヌクレオフェクションした。T細胞ヌクレオフェクションを上記のように実施したが、CD34+HSPCのヌクレオフェクションは、Lonza Nucleofector 2b(プログラムU-014)およびヒトT細胞Nucleofectorキット(VPA-1002、Lonza)を用いるT細胞ヌクレオフェクションと同様であった。ヌクレオフェクション後すぐに、CD34+HSPCを、30で24時間、インキュベートし、その後、それらを、ゲノムDNAの採取まで、37へ移した。

#### 【0167】

##### 5. フローサイトメトリおよび蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)

HR実験について、エピソームプラスミドからのeGFP発現が残存していない時点の、細胞型に依存してヌクレオフェクションから2~3週間後、細胞を分析した。eGFP発現を、Accuri C6フローサイトメーター(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)において測定した。細胞死を、LIVE/DEAD Fixable Red Dead Cell Stain Kit(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて、製造会社の使用説明書に従って測定し、細胞をAccuri C6フローサイトメーターで分析した。CD3+T細胞のCD4+集団およびCD8+集団へのソーティングについて、細胞を、PE-Cy7抗ヒトCD4(クローン: RPA-T4、Tonbo Biosciences, San Diego, CA, USA)およびAPC抗ヒトCD8a(クローン: RPA-T8、Tonbo Biosciences)の混合物で染色し、その2つの集団をFAC

S A r i a I I S O R Pにおいてソーティングした。

# 【 0 1 6 8 】

6 . T I D EおよびT7アッセイを用いる対立遺伝子改変頻度の測定

T I D EおよびT7アッセイについて、（他に指示がない場合には）ヌクレオフェクションから3日後、gDNAを細胞から、Q u i c k E x t r a c t DNA抽出溶液（E p i c e n t r e、M a d i s o n、W I、U S A）を用いて製造会社の使用説明書に従って抽出した。s g R N Aゲノム標的部位に及ぶP C Rアンプリコンを、i P r o o f H i g h - F i d e l i t y M a s t e r M i x（B i o - R a d、H e r c u l e s、C A、U S A）を用いて、以下のプライマー対で作製した：

I L 2 R G \_ f w（配列番号84）：5' - T C A C A C A G C A C A T A T T T G C C A C A C C C T C T G - 3'、

I L 2 R G \_ R V（配列番号85）：5' - T G C C C A C A T G A T T G T A A T G G C C A G T G G - 3'、

H B B \_ f w（配列番号86）：5' - C C A A C T C C T A A G C C A G T G C C A G A A G A G - 3'、

H B B \_ r v（配列番号87）5' - A G T C A G T G C C T A T C A G A A A C C C A A G A G - 3'、

C C R 5 \_ f w（配列番号88）：5' - G C A C A G G G T G G A A C A A G A T G G - 3'、

C C R 5 \_ r v（配列番号89）：5' - C A C C A C C C C A A A G G T G A C C G T - 3'。

# 【 0 1 6 9 】

T7アッセイについて、P C Rアンプリコンを精製し、製造会社のプロトコールに従って、200ngを、サーモサイクラーにおいて変性および再アニールさせ、T7エンドヌクレアーゼI（New England Biolabs、Waltham、MA、USA）で消化した。消化されたDNAを、4～20% TBEポリアクリルアミドゲル上に流し、Diamond核酸色素（Promega、Madison、WI、USA）で染色し、Chemidoc XRS+（Bio-Rad）において可視化した。バンド強度を、Image Labソフトウェア（Bio-Rad）を用いて分析し、対立遺伝子改変頻度を、式： $100 \times (1 - (1 - \text{切断された割合})^0.5)$ で計算した。T I D E（Tracking of Indels by Decomposition（分解によるイン/デルのトラッキング）、Brinkman et al., Nucleic Acids Research 42, e168（2014））を用いる対立遺伝子改変頻度の分析について、精製P C R産物を、両方のプライマーを用いてサンガーシーケンシングし、各配列クロマトグラムを、ウェブサイトtide.nki.nlで入手できるオンラインT I D Eソフトウェアで分析した。mockでトランスフェクトされた試料からの参照配列を用いて分析を実施した。パラメータを、10ヌクレオチドの最大イン/デルサイズ、および高品質トレースでできる限り最大のウィンドウを網羅する分解ウィンドウに設定した。3.5%の検出感度未満の全てのT I D E分析を0%に設定した。T O P OクローニングされたP C R断片のシーケンシングについて、切断部位に及ぶ2.1 kbアンプリコン（WTサイズ）を、i P r o o f H i g h - F i d e l i t y M a s t e r M i xならびにプライマー5' - G G C T G T T G T C A T C T A T G A C C T T C C C - 3'（配列番号90）および5' - T G T A A A C T G A G C T T G C T C G C T C G - 3'（配列番号91）を用い、72 のアニーリング温度および2分間の伸長時間を含む25サイクルで作製した。P C R反応産物を、Zero Blunt TOPO P C Rクローニングキット（Life Technologies）を用いて、製造会社のプロトコールに従って、プラスミドへ直接、サブクローニングした。T O P O反応を、XL-1 Blueコンピテント細胞へ形質転換し、カナマイシンを含む寒天プレート上に蒔き、単一コロニーは、プレートから直接的に、McLab（South San Francisco、CA、USA）により、ローリングサークル増幅、続いて、ブ

ライマー 5' - G C A C A G G G T G G A A C A A G A T G G - 3' (配列番号 92) を用いるシーケンシングによって、シーケンシングされた。

#### 【0170】

##### 7. 増殖アッセイ

ヌクレオフェクション後の T 細胞の増殖を測定するために、Cell Titer - Glo 2.0 アッセイ (Promega, Madison, WI, USA) を用いた。ヌクレオフェクション後すぐに、T 細胞を、マルチプル 96 ウェル U 底 96 ウェルプレートへ、 $3 \times 10^4$  細胞 / ウェルで移した。ヌクレオフェクション後すぐに、および 24 時間間隔で、細胞を、白色 96 ウェルプレート内の  $100 \mu\text{L}$  培地中へ移し、製造会社のガイドライン通り、 $100 \mu\text{L}$  Cell Titer - Glo 2.0 を加えた。発光を、Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Switzerland) において 1 秒間積分時間を用いて、読み取った。

10

#### 【0171】

##### 8. ゲノム改変の効率および特異性を定量化するためのディープシーケンシング

各遺伝子ターゲティング実験について、ゲノム DNA を、トランスフェクションから 48 時間後、様々な CRISPR 処理された K562 細胞および対照 K562 細胞から抽出した。CRISPR 標的に隣接するゲノム領域および 3 つのオフターゲット (表 2) を、2 ラウンドの PCR により増幅して、(処理特異的) バーコードおよび Illumina シーケンシングアダプターを付着させた (表 3)。バーコード付き PCR アンプリコンを等モルでプールし、スピンカラムにより精製し、Illumina MiSeq DNA シーケンサープラットフォームにおいてシーケンシングした。さらなる詳細については、下記の「9. ディープシーケンシングのための CRISPR オンターゲットおよび予測オフターゲットアンプリコンの作製」セクションを参照。

20

#### 【0172】

表 2 は、PCR アンプリコンのディープシーケンシングにより問い合わせられたオンターゲットおよびオフターゲット遺伝子座のリストを提供する。CCR5、HBB、および IL2RG ターゲティング CRISPR 実験について、意図されたゲノム標的配列 (「オン」) および 3 つのコンピュータ的に予測された OFF 標的配列 (「OFF 1 ~ 3」) は、それらのゲノム位置 (ヒトゲノム構築アセンブリ hg38) と共に提示されている。選択されたオフターゲット配列は、HBB - OFF 3 (それは、COSMID によって有意な活性を有すると予測されただけだった) を除いて、COSMID (Cradic et al., Molecular therapy. Nucleic acids 3, e214 (2014)) および最適化 CRISPR デザイン (Hsu et al., Nature Biotechnology, 31, 827 - 832 (2013)) ウェブツール (MIT デザイン) の両方による予測された上位スコアラーであった。予測標的活性は、COSMID スコア値の増加および「MIT デザイン」スコア値の減少と共に増加する。PAM 部位およびオフターゲット配列におけるミスマッチは、それぞれ、赤色テキストおよび太字のテキストにより示されている。

30

#### 【0173】

## 【表 2】

表 2. PCR アンプリコンのディープシーケンシングにより問い合わせられたオンターゲットおよびオフターゲット遺伝子座のリスト

配列番号	標的 ID	標的部位配列 (5'→3')	ゲノム位置	ストラ ンド	標的スコア	
					COSMID	MIT デ ザイン
	CCR5 ターゲティングガイド RNA					
配 列 番 号 20	ON	GGCAGCATAGTGAGCCCAGAAG G	Chr3:46373153- 46373175	-	0	56
配 列 番 号 21	OFF1	ATCATCATAGTGAGCCCAGAGA G	Chr3:15440658- 15440680	+	0.44	2.4
配 列 番 号 22	OFF2	ACCAGCAGAGTGAGCCCAGAGG G	Chr4:3744369- 3744391	+	0.52	2.6
配 列 番 号 23	OFF3	AGGAGCAGAGTGAGCCCAGAGA G	Chr15:92469456 -92469478	+	0.54	2.6
	HBB ターゲティングガイド RNA					
配 列 番 号 24	ON	CTTGCCCCACAGGGCAGTAACG G	Chr11:5226968- 5226990	+	0	65
配 列 番 号 25	OFF1	TCAGCCCCACAGGGCAGTAAGG G	Chr9:101833584 -101833606	+	0.4	2.3
配 列 番 号 26	OFF2	CCTCTCCCACAGGGCAGTAAAG G	Chr17:68628098 -68628120	-	0.49	2.4
配 列 番 号 27	OFF3	ITTTCCCCAAAGGGCAGTAATAG G	Chr13:10916598 8-109166010	+	0.79	N/A
	IL2RG ターゲティングガイド RNA					
配 列 番 号 28	ON	TGGTAATGATGGCTTCAACATGG G	ChrX:71111519- 71111541	+	0	49
配 列 番 号 29	OFF1	TGGGAAGGATGGCTTCAACACA G	Chr7:151485304 -151485326	-	0.4	3.9
配 列 番 号 30	OFF2	TGGTGAGGATGGCTTCAACACG G	Chr1:167730172 -167730194	-	0.42	3.7
配 列 番 号 31	OFF3	TGGTAATGATGACTTCAACATAG G	Chr3:72764801- 72764823	-	0.8	49.2

## 【0174】

表 3 は、ディープシーケンシングによりイン/デル頻度を定量化するためのオンターゲットおよびオフターゲットアンプリコンの作製に用いられるオリゴヌクレオチドプライマーのリストを提供する。遺伝子特異的アンプリコンプライマーの遺伝子特異的ハイブリダイゼーション配列、および Illumina バーコーディングプライマーのバーコードは、それぞれ、下線および太字のテキストで示されている。

## 【0175】

【表 3 A】

表 3. ディープシーケンシングによりイン/デル頻度を定量化するためのオンターゲットおよびオフターゲットアンプリコンの作製に用いられるオリゴヌクレオチドプライマーのリスト

配列番号	プライマー名	プライマー配列 (5'→3')
遺伝子特異的アンプリコンプライマー		
配列番号 32	CCR5_ON-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCCAAAC ACAGCATGGACGACA
配列番号 33	CCR5_ON-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCT GAAGAGCATGACTGACA
配列番号 34	CCR5_OFF1-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCGGGGA AGCAGTCTGGACTTAGA
配列番号 35	CCR5_OFF1-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTG CCATTAAATCCACCAA
配列番号 36	CCR5_OFF2-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCAGCGA GTCGAGTTCAGGTG
配列番号 37	CCR5_OFF2-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCT ACCTACCCAGGTTCT
配列番号 38	CCR5_OFF3-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCTCTCAC CAACACTGCCGAAT
配列番号 39	CCR5_OFF3-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGC ATATAGTGCTCCCCACT
配列番号 40	HBB_ON-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCTCTGTC TCCACATGCCCACT
配列番号 41	HBB_ON-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGG GCAGAGCCATCTATTG
配列番号 42	HBB_OFF1-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCTCCCGT TCTCCACCCAATAG
配列番号 43	HBB_OFF1-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATT TCCAGGCTATGCTTCCA
配列番号 44	HBB_OFF2-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCGTTGG CAGGGAGACTTACCA
配列番号 45	HBB_OFF2-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCA TGGTACGACTGTTCTCA
配列番号 46	HBB_OFF3-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCTGGGG CCTTCAAGTGTCTT
配列番号 47	HBB_OFF3-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGT GCTCCTATGCCTGGTT
配列番号 48	IL2RG_ON-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCCATTG GGCGTCAGAAATTGTC
配列番号 49	IL2RG_ON-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGT TCTTCCACCGGAAGC
配列番号 50	IL2RG_OFF1-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCTCCGG AAGTTATTCAAGTCTGA
配列番号 51	IL2RG_OFF1-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCT GGCATCAGAGCACAAA
配列番号 52	IL2RG_OFF2-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCCCTGG GCCATATCAAGAGAC
配列番号 53	IL2RG_OFF2-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTT TGGGGTGATGTTTGTG
配列番号 54	IL2RG_OFF3-fwd	CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCCACAA CAGTTGACCCAGGAA
配列番号 55	IL2RG_OFF3-rev	GTGACTGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCA ACCCAGGTCTCTGAAC
Illumina バーコーディングプライマー		
配列番号 56	P5-BC_A-fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGAGCTC CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC
配列番号 57	P5-BC_B-fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCATAGCG CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC
配列番号 58	P5-BC_C-fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTAGCACT CGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC

10

20

30

40



【表 3 B】

配列番号 59	P5-BC_D-fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCATAGCGACAGGTTCTACAGTCCGACGATC
配列番号 60	P5-BC_E-fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATGCATCGCGACAGGTTCTACAGTCCGACGATC
配列番号 61	P5-BC_F-fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGTCGATCGACAGGTTCTACAGTCCGACGATC
配列番号 62	P5-BC-G_fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCACTGTGACGACAGGTTCTACAGTCCGACGATC
配列番号 63	P5-BC-H_fwd	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGAGTATCGACAGGTTCTACAGTCCGACGATC
配列番号 64	P7-BC-A_rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTAGAGCTCGTGA
配列番号 65	P7-BC_B rev	CTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
配列番号 66	P7-BC_C rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTCAGTCTGTGA
配列番号 67	P7-BC_D rev	CTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
配列番号 68	P7-BC_E_rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATGCATCGGTGA
配列番号 69	P7-BC_F_rev	CTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
配列番号 70	P7-BC-G_rev	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGTCGATCGTGA
配列番号 71	P7-BC-H_rev	CTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT

10

20

## 【0176】

遺伝子特異的アンプリコンプライマーの遺伝子特異的ハイブリダイゼーション配列、および Illumina パーコーディングプライマーのバーコードは、それぞれ、下線および太字のテキストで示されている。

## 【0177】

シーケンシングデータの分析について、異なる処理からの読み取りを、それらの対応する処理バーコードにより区分けし、デフォルトパラメータで BWA-MEM (Li et al., Bioinformatics 26, 589-595 (2010)) (bwa-0.7.10) を用いてゲノムへマッピングした。不一致の対形成された末端マッピング (>1 Kbp 離れた) を、BWA-MEM におけるデフォルトパラメータにより定義されているような低品質マッピングされ、かつ二次アラインメントされた読み取りと共に、分析から取り除いた。オンターゲットおよびオフターゲット領域のそれぞれについて、本発明者らは、予測切断部位 (予測切断部位は、PAM 部位から上流へ 3 番目と 4 番目の間の位置であると推定される) の周囲のイン/デルを有する読み取りの % を計算した。ゲノムにおける各位置についてのイン/デル % を、 $\text{イン/デル}[i] = (I[i] + D[i]) / C[i]$  (式中、 $D[i]$  および  $I[i]$  は、それぞれ、位置  $i$  における任意のサイズの欠失または挿入を有する読み取りの数を示し、 $C[i]$  は、位置  $i$  を含有する任意のゲノム区間にマッピングされた読み取りの数を示す) を用いることにより計算した。その後、各標的についてのイン/デル % を、 $\text{イン/デル}[c]$  (式中、 $c$  は、PAM 部位から上流へ 4 番目の位置である予想された切断部位である) により計算した。位置 4 におけるホモヌクレオチド配列、IL2RG における「AA」および CCR5 における「CCC」、および挿入事象を有する場合、BWA-MEM アライナーは、その挿入されたヌクレオチドの位置を決定することができない。これは、位置 4 の代わりにアラインメントレポートにおいて関連位置を選ぶこと、具体的には、IL2RG および CCR5 オフターゲットについて、それぞれ、位置 3 および 6 を選ぶことにより是正された。

30

40

## 【0178】

9. ディープシーケンシングのための CRISPR オンターゲットおよび予測オフター

50

### ゲットアンプリコンの作製

各標的遺伝子座について、 $10^6$  個の K562 細胞に、 $1\text{ }\mu\text{g}$  かもしくは  $20\text{ }\mu\text{g}$  のいずれかの合成ガイド RNA (非修飾型、M、MS、または MSP) および  $2\text{ }\mu\text{g}$  の Cas9 発現プラスミド (PX330)、sgRNA と Cas9 タンパク質の両方をコードする  $2\text{ }\mu\text{g}$  の sgRNA プラスミド (陽性対照)、または  $2\text{ }\mu\text{g}$  の PX330 のみ (Cas9 のみ、陰性対照) をトランスフェクトした。追加として、IL2RG 遺伝子座を標的にする実験について、 $10^6$  個の K562 細胞に、 $15\text{ }\mu\text{g}$  Cas9 mRNA および  $10\text{ }\mu\text{g}$  の合成ガイド RNA (非修飾型または MS)、 $7.6\text{ }\mu\text{g}$  合成ガイド RNA (非修飾型または MS) とあらかじめ複合体化した  $15\text{ }\mu\text{g}$  Cas9 タンパク質をトランスフェクトした。これらの試料および mock トランスフェクション試料 (第 2 の陰性対照) 由来のゲノム DNA を、トランスフェクションから 72 時間後、QuickExtract (商標) DNA 抽出溶液 (Episentre, Madison, WI) を用いて、製造会社の仕様書に従って、抽出した。PfuUltra II HS 2x Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)、および MiSeq (Illumina, San Diego, CA) プラットフォームによるディープシーケンシングにおいて利用されるシーケンシングプライマーと共にアンプリコン末端をタグ付けする遺伝子特異的プライマー (表 3) を用いる、オンターゲットおよび 3 つのコンピュータ的に予測されたオフターゲット遺伝子座 (表 2) の PCR 増幅のための鋳型として、 $40\text{ ng}$  のゲノム DNA を用いた。オンターゲットおよびオフターゲットアンプリコン (表 4) に 2 回目の PCR 反応を行って、追加の Illumina シーケンシングアダプター (すなわち、P5、P7)、および対応するトランスフェクション処理を一意的に同定するカスタムの二重 8 bp バーコードを付加した。2 回目の PCR 後、バーコード付きアンプリコンを、Agilent D1000 TapeStation により定量化し、等モル濃度でプールし、その後、QIAquick PCR 精製キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、製造会社の使用説明書に従って精製した。精製されたライブラリーは、NGS DNA シーケンシングサービス (Seqmatic, Fremont, CA) により、Illumina MiSeq DNA シーケンサーにおいて、二重インデキシングで  $2 \times 20^1$  サイクルで、シーケンシングされた。

【0179】

表 4 は、インデル頻度のディープシーケンシング分析のために作製された CCR5、HBB、および IL2RG のオンターゲットおよびオフターゲットアンプリコンのリストを提供する。(編集されていないゲノム DNA の) アンプリコンサイズは、 $183 \sim 220\text{ bp}$  の範囲であり、標的部から遺伝子特異的プライマーのハイブリダイゼーション配列まで最短  $50\text{ bp}$  である。ゲノム DNA からのアンプリコン産生に用いられるハイブリダイゼーション配列および推定 CRISPR 標的部は、それぞれ、下線および太字のテキストで示されている。

【0180】

【表 4 A】

表 4. イン/デル頻度のディープシーケンシング分析のために作製された CCR5、HBB、および IL2RG のオンターゲットおよびオフターゲットアンプリコンのリスト

配列番号	標的 ID	標的アンプリコン配列 (5'→3')
CCR5 ターゲティングガイド RNA		
配列番号 72	ON	CAAACACAGCATGGACGACAGCCAGGTACCTATCGATTGTCAGGA GGATGATGAAGAAGATTCCAGAGAAGAAGCCTATAAAATAGAGCC CTGTCAAGAGTTGACACATTGTATTTCCAAAGTCCCACTGGGCGGC <b>AGCATAGTGAGCCCAGAAGGGGACAGTAAGAAGGAAAAACAGG</b> TCAGAGATGGCCAGGTTGAGCAGGTAGATGTCAGTCATGCTCTTCA GCC
配列番号 73	OFF1	GGGGAAGCAGTCTGGACTTAGAAAGGAAATAGGTGGTCTGTCATA GGGGCTTTCATTAGAGTTAACTTCATAGAGTCAACTGTTTCATCA <b>TCATAGTGAGCCCAGAGAGCCACTGCCAGCAGCATGCTCACACC</b> ACCTACCCTAGTGTAGGTAATAGGTCTACGCTAGGACCCCGTGCTG GGCTCTCAGCCCATCATGAGATTTTGGTGGATTTAATGGCAGG
配列番号 74	OFF2	AGCGAGTCGAGTTCAGGTGGGAGCAGAGGGCGCCACCAGCAGAG CGAGTCGAGTCCAGCGGGAGCAGAGGGCGCACACC <b>AGCAGAGT</b> <b>GAGCCCAGAGGGTTTAAAGAAGGGGCGGTCTCTACGGTATGGGT</b> GAGTCAGGGGAAC TAGGAAAGGACAGAGCAGAACCTGGGGTAGGT AGCC
配列番号 75	OFF3	TCTCACCAACACTGCCGAATGTCATCTCTTCTCATCTTTATCTCTAT TCTTTGCTTCTGTCTTCAGGGCTCTTCCCTTGGCATTACC <b>AGGAG</b> <b>CAGAGTGAGCCCAGAGAGCTGAGTGGTATCCCTTCTTCTTGGGTC</b> CCTGAGCCCTGACCTGGAGCAATGCTGTGAGACAGCAGGAAAGGA GGGGAGTGTGGAGTGGGGAGCACTATATGCCA
HBB ターゲティングガイド RNA		
配列番号 76	ON	TCTGTCTCCACATGCCAGTTTCTATTGGTCTCCTTAAACCTGTCTT GTAACCTTGATACCAACCTGCCAGGGCCTCACCACCAACTTCATC CACGTTCACTT <b>GCCCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCCTC</b> AGGAGTCAGATGCACCATGGTGTCTGTTTGAGGTTGCTAGTGAACA CAGTTGTGTCAGAAGCAAATGTAAGCAATAGATGGCTCTGCCCTG
配列番号 77	OFF1	TCCCGTTCTCCACCCAATAGCTATGGAAAGGGGAAGATCCAGAGA ACTTGGATAGGAAAGGTGAAGTCAGAGCAGTGCTT <b>CAGCCCCACA</b> <b>GGGCAGTAAGGGCAGCCTTCTCTAAATACCAGATTCCCAAATCT</b> GGCTGTGCTTTCATTTGGGAGTTGGACATACTGCTAAACTATAAT TTCTTAGGCCGTACCTAAATATATTATGGAAGCATAGCCTGGAAA TC
配列番号 78	OFF2	GTGGCAGGGGAGACTTACCAGCTTCCCGTATCTCCCTCCACATGGA GGCAGGACACGCTCTGGCCTTGCCACCCTCCCACTAGCCT <b>CTCCC</b> <b>ACAGGGCAGTAAAGGTGAGTCTGGGAGAAAGAACCGGTCAGACT</b> TAGTTCAGCTCCACCCTTCTCCTGGGAGTGAGTCTTTCCAAGACA GAGCATGTTTTTTCTACCCCTCAGTGAGAACAGTCGTACCATGGG
配列番号 79	OFF3	TGGGGCCTTCAAGTGTCTTCCCAAGAGTCAGAGTGAACCAGAAC AAGAACCATGTTGAGTTGCCAGATGTAACCAGGCCTACAGGTACC TGGGAGAAACACGTGTACATTTTCCCA <b>AAAGGGCAGTAATAGCA</b> TCCTAGGCTTCAAAACATTCATAGAAACCATTTTCAAATGCAAAG TCCAACACAGTTAGAAATAACCAGGCATAGGAGCACAC
IL2RG ターゲティングガイド RNA		
配列番号 80	ON	CATTGGGCGTCAGAATTGTCGTGTTTCCAGCCCCACTCCAGCAGGGG CAGCTGCAGGAATAAGAGGGATGTGAAT <b>TGGTAATGATGGCTTCA</b> <b>ACATGGCGCTTGCTCTTCACTCCCTGGGTGAGTCTGTCTGTGTCAG</b> GAACCTGGGTCCCTCACCCACTACCCCTCCCAACCCACACGTTTCT CTGTCATAGCTTCCGGTGGAAAGAACCT
配列番号 81	OFF1	TCCGGAAGTTATTCAAGTCTGATTTTCTTCTCCCTTGTGAGGGAA AAGAAGTTGTGACAAATTGCTTGGATCCTTAAGCTTAAG <b>TGGGAA</b> <b>GGATGGCTTCAACACAGAACATCTGTTTCATTGCTGTTTTATCCGT</b> CAGTAAACTGTTACTTCTTTTATGTACTAAAAGTTCTTAGCACTTA ACTAATATTAGCTCTTGTGCTCTGATGCCAGAC

10

20

30

40

【表 4 B】

配列番号 82	OFF2	<u>CCTGGGCCATATCAAGAGACTCTGCCTCAAAAAAGAAAAGAAAGA</u> AAGAAAAAGAAAAAAAAAAGAACATCATTAAAAATCCCTGAGGA GCATTTAGAGTATTGGGTGGCACAAACAGATTCTGCATGATT <b>GGTG</b> <b>AGGATGGCTTCAACACGGCAGCTTTATTCCTCTTTAACAGAGTCA</b> GCAGCATCAAGGCATGAGGGATCTTGGC <b>CACAAACATCACCCCAAA</b> <b>GA</b>
配列番号 83	OFF3	<u>CACAACAGTTGACCCAGGAACAGGGGGAACCTCCCACCATTCCCAT</u> CCCCTGTTTGATCAGATCCAAGAATCCACAATATTGAGAGTGAAT GAAAAGTGTCAGCT <b>GGTAATGATGACTTCAACATAGTCAGAACT</b> CTTTGGGGTGTTCCAAACATCATGGTGCATATGTATTACCTGGGAG TCTTGTTAAAAAGACTCCTGTT <b>CAGAGACCTGGGTTGGG</b>

10

## 【0181】

(編集されていないゲノムDNAの)アンプリコンサイズは、183～220bpの範囲であり、標的部から遺伝子特異的プライマーのハイブリダイゼーション配列まで最短50bpである。ゲノムDNAからのアンプリコン産生に用いられるハイブリダイゼーション配列および推定CRISPR標的部は、それぞれ、下線および太字のテキストで示されている。

## 【0182】

10. 化学修飾型sgRNAのオンターゲットおよびオフターゲット活性

表5は、図1C、1E、および5に基づいている数を示す。2μg Cas9プラスミド、および1μg sgRNA(上部パネル)かまたは20μg sgRNA(下部パネル)のいずれかに関して、図1Cにおいて実施されているような合成sgRNAによって媒介される標的化切断の特異性。インデル頻度を、標的ゲノム遺伝子座由来のPCRアンプリコン、および各遺伝子についてバイオインフォマティクスの予測されたオフターゲット遺伝子座のディープシーケンシングにより測定した。平均値は、+/-SEM、n=3で示されている。

20

## 【0183】

【表 5】

表 5

2 $\mu$ g Cas9 プラスミドおよび 1 $\mu$ g sgRNA						
		Mock	非修飾型	M	MS	MSP
<b>IL2RG</b>	オンターゲット	0.16 $\pm$ 0.03	2.43 $\pm$ 0.23	13.47 $\pm$ 0.54	68 $\pm$ 1.06	75.73 $\pm$ 1.30
	オフターゲット 1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	オフターゲット 2	0.00	0.00	0.10 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.10	0.37 $\pm$ 0.03
	オフターゲット 3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>HBB</b>	オンターゲット	0.15 $\pm$ 0.05	1.3 $\pm$ 0.08	12.4 $\pm$ 0.28	48.17 $\pm$ 0.39	38.68 $\pm$ 0.85
	オフターゲット 1	0.01 $\pm$ 0.01	0.84 $\pm$ 0.07	7.01 $\pm$ 0.36	27.31 $\pm$ 0.60	9.51 $\pm$ 0.25
	オフターゲット 2	0.00	0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.00	0.00
	オフターゲット 3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>CCR5</b>	オンターゲット	0.02 $\pm$ 0.01	4.26 $\pm$ 0.18	3.41 $\pm$ 0.23	24.6 $\pm$ 1.25	22.78 $\pm$ 1.76
	オフターゲット 1	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00
	オフターゲット 2	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.10
	オフターゲット 3	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00

2 $\mu$ g Cas9 プラスミドおよび 20 $\mu$ g sgRNA						
		非修飾型	M	MS	MSP	sgRNA プラスミド
<b>IL2RG</b>	オンターゲット	23.4 $\pm$ 1.8	48.13 $\pm$ 0.4	75.3 $\pm$ 5.1	83.27 $\pm$ 0.7	70.53 $\pm$ 0.01
	オフターゲット 1	0.00	0.03 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.03	0.00	0.00
	オフターゲット 2	0.13 $\pm$ 0.03	1.20 $\pm$ 0.06	7.83 $\pm$ 0.58	2.77 $\pm$ 0.24	0.07 $\pm$ 0.00
	オフターゲット 3	0.00	0.10 $\pm$ 0.00	0.30 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	0.17 $\pm$ 0.00
<b>HBB</b>	オンターゲット	19.42 $\pm$ 0.27	40.99 $\pm$ 1.4	65.91 $\pm$ 0.62	60.71 $\pm$ 0.25	31.11 $\pm$ 0.04
	オフターゲット 1	9.2 $\pm$ 0.38	33.56 $\pm$ 2.3	55.1 $\pm$ 0.97	19.08 $\pm$ 0.49	25.44 $\pm$ 0.04
	オフターゲット 2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	オフターゲット 3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>CCR5</b>	オンターゲット	11.04 $\pm$ 2.5	14.87 $\pm$ 2.1	56.3 $\pm$ 3.3	52.19 $\pm$ 4.5	45.86 $\pm$ 0.03
	オフターゲット 1	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
	オフターゲット 2	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	1.75 $\pm$ 0.18	5.32 $\pm$ 0.68	0.02 $\pm$ 0.00
	オフターゲット 3	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00

【 0 1 8 4 】

[ 実施例 2 ]

化学修飾型ガイド RNA および合成一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) 鋳型を用いた CRISPR/Cas に基づいた相同組換え

3 つの異なるドナー由来の刺激ヒト初代 T 細胞に、10  $\mu$ g CCR5 sgRNA (非修飾型または MS)、15  $\mu$ g Cas9 mRNA、および 2.81  $\mu$ g の 183 nt CCR5 ssODN (両末端における 3 個の終端ヌクレオチド間のホスホロチオエート (「PS」) 結合の有りまたは無し) をヌクレオフェクションした。ssODN は、WT CCR5 配列には存在しない、中央の HindIII 制限部位を含有した。ゲノム DNA (gDNA) を、ヌクレオフェクションから 3 日後、抽出し、標的部から (ssODN に相同的な配列の外側へ) 及び PCR 産物を作製し、HindIII で消化した。制限断片を、2% TBE アガロースゲル上で分析し、HDR 頻度を計算した。

【 0 1 8 5 】

図 2 1 は、H D R 実験からのアガロースゲルを描く。修飾型 s g R N A が用いられた場合、H D R 頻度は増加した。加えて、s s O D N が両末端における 3 個の終端ヌクレオチド間にホスホロチオエート結合を含有した場合、H D R 頻度はさらに増加した。

#### 【 0 1 8 6 】

前述の発明は、理解を明りょうにするために、例証および例としてかなり詳細に記載されているが、当業者は、ある特定の変化および改変が、添付の特許請求の範囲内で実施され得ることを認識しているだろう。加えて、本明細書に提供された各参考文献は、各参考文献を個々に引用することにより本明細書の一部をなすものとするのと同じ程度でその全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

なお、出願時の特許請求の範囲は、以下のとおりである。

10

#### [ 請求項 1 ]

初代細胞において標的核酸の遺伝子調節を誘導するための方法であって、

( a ) 標的核酸に相補的な第 1 のヌクレオチド配列、および C R I S P R 関連タンパク質 ( C a s ) ポリペプチドと相互作用する第 2 のヌクレオチド配列を含む修飾型単一ガイド RNA ( s g R N A ) であって、前記第 1 のヌクレオチド配列および / または前記第 2 のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの 1 個または複数が修飾型ヌクレオチドである、修飾型単一ガイド RNA ; ならびに

( b ) C a s ポリペプチド、C a s ポリペプチドをコードする m R N A 、および / または C a s ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを初代細胞へ導入するステップ

20

を含み、

前記修飾型 s g R N A が前記 C a s ポリペプチドを標的核酸へ導き、

前記修飾型 s g R N A が、対応する非修飾型 s g R N A と比較して増強した活性で標的核酸の遺伝子調節を誘導する、方法。

#### [ 請求項 2 ]

前記増強した活性が、前記修飾型 s g R N A の増加した安定性および / または前記修飾型 s g R N A の標的核酸に対する増加した特異性を含む、請求項 1 に記載の方法。

#### [ 請求項 3 ]

前記標的核酸が標的 D N A または標的 R N A を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

#### [ 請求項 4 ]

前記遺伝子調節が前記標的 D N A のゲノム編集を含む、請求項 3 に記載の方法。

30

#### [ 請求項 5 ]

前記ゲノム編集が、標的 D N A の相同組換え修復 ( H D R ) または非相同末端結合 ( N H E J ) を含む、請求項 4 に記載の方法。

#### [ 請求項 6 ]

組換えドナー修復鋳型を前記初代細胞へ導入するステップをさらに含む、請求項 4 または 5 に記載の方法。

#### [ 請求項 7 ]

前記組換えドナー修復鋳型が、前記標的 D N A の 2 つの重複しない相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、ゲノム編集を受ける前記標的 D N A に対応するヌクレオチド配列の 5 ' 末端および 3 ' 末端に位置する、請求項 6 に記載の方法。

40

#### [ 請求項 8 ]

前記組換えドナー修復鋳型が、一塩基多型 ( S N P ) を正すための変異をコードするヌクレオチド配列を含む合成の一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド ( s s O D N ) 鋳型、および標的 D N A の 2 つの重複しない相同部分を含む 2 つのヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が、変異をコードするヌクレオチド配列の 5 ' 末端および 3 ' 末端に位置する、請求項 6 に記載の方法。

#### [ 請求項 9 ]

前記遺伝子調節が、エンドヌクレアーゼ欠損 C a s ポリペプチドを用いた、前記標的 D

50

N A または前記標的 R N A の遺伝子発現の阻害または活性化を含む、請求項 3 に記載の方法。

[ 請求項 1 0 ]

前記修飾型 s g R N A および前記 C a s ポリペプチドを前記初代細胞へ導入する前に、前記初代細胞が多細胞生物体から単離される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 1 1 ]

前記多細胞生物体が、植物、多細胞原生生物、多細胞真菌、または動物である、請求項 1 0 に記載の方法。

[ 請求項 1 2 ]

前記初代細胞が、幹細胞、免疫細胞、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 1 3 ]

前記幹細胞が、造血幹細胞・造血前駆細胞 ( H S P C )、間葉幹細胞、神経幹細胞、臓器幹細胞、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

[ 請求項 1 4 ]

前記免疫細胞が、T 細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、末梢血単核細胞 ( P B M C )、末梢血リンパ球 ( P B L )、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

[ 請求項 1 5 ]

前記修飾型 s g R N A および前記 C a s ポリペプチドを前記初代細胞へ導入した後に、前記初代細胞またはその子孫が前記多細胞生物体へ戻される、請求項 1 0 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 1 6 ]

前記初代細胞が初代細胞集団を含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 1 7 ]

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも約 3 0 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 1 6 に記載の方法。

[ 請求項 1 8 ]

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも約 4 0 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 1 6 に記載の方法。

[ 請求項 1 9 ]

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも約 5 0 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 1 6 に記載の方法。

[ 請求項 2 0 ]

前記修飾型 s g R N A が、前記初代細胞集団の少なくとも約 6 0 % において前記標的核酸の遺伝子調節を誘導する、請求項 1 6 に記載の方法。

[ 請求項 2 1 ]

前記修飾型ヌクレオチドが、リボース基、リン酸基、核酸塩基、またはそれらの組合せにおける修飾を含む、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 2 2 ]

前記リボース基における修飾が、前記リボース基の 2 ' 位における修飾を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

[ 請求項 2 3 ]

前記リボース基の 2 ' 位における修飾が、2 ' - O - メチル、2 ' - フルオロ、2 ' - デオキシ、2 ' - O - ( 2 - メトキシエチル)、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 2 2 に記載の方法。

[ 請求項 2 4 ]

前記リン酸基における修飾が、ホスホロチオエート修飾を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

[ 請求項 2 5 ]

前記修飾型ヌクレオチドが、2' - O - メチル ( M ) ヌクレオチド、2' - O - メチル 3' - ホスホロチオエート ( M S ) ヌクレオチド、2' - O - メチル 3' - チオ P A C E ( M S P ) ヌクレオチド、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 2 6 ]

前記第 1 のヌクレオチド配列が約 2 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 2 7 ]

前記第 1 のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、またはそれ以上が、修飾型ヌクレオチドである、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

[ 請求項 2 8 ]

前記修飾型ヌクレオチドが、前記第 1 のヌクレオチド配列の 5' 末端に、もしくは 5' 末端の近くに、および / または前記第 1 のヌクレオチド配列内の内部の位置に位置する、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 2 9 ]

前記第 1 のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの約 1 0 % から約 3 0 % まだが修飾型ヌクレオチドである、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

[ 請求項 3 0 ]

前記第 2 のヌクレオチド配列が約 8 0 ヌクレオチド長である、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 3 1 ]

前記第 2 のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、またはそれ以上が、修飾型ヌクレオチドである、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 3 2 ]

前記修飾型ヌクレオチドが、前記第 2 のヌクレオチド配列の 3' 末端に、もしくは 3' 末端の近くに、および / または前記第 2 のヌクレオチド配列内の内部の位置に位置する、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

[ 請求項 3 3 ]

前記第 2 のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの約 1 % から約 1 0 % まだが修飾型ヌクレオチドである、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 3 4 ]

前記修飾型 s g R N A が、前記第 1 のヌクレオチド配列の 5' 末端、または 5' 末端の近くにおける 1 個、2 個、または 3 個の連続した、または非連続の修飾型ヌクレオチド、および前記第 2 のヌクレオチド配列の 3' 末端、または 3' 末端の近くにおける 1 個、2 個、または 3 個の連続した、または非連続の修飾型ヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 3 5 ]

前記修飾型 s g R N A が、前記第 1 のヌクレオチド配列の 5' 末端における 3 個の連続した修飾型ヌクレオチド、および前記第 2 のヌクレオチド配列の 3' 末端における 3 個の連続した修飾型ヌクレオチドを含む、請求項 3 4 に記載の方法。

40

[ 請求項 3 6 ]

前記修飾型 s g R N A が化学合成される、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 3 7 ]

前記修飾型 s g R N A が少なくとも 2 個の異なる修飾型 s g R N A を含み、各修飾型 s g R N A が、異なる標的核酸へ方向づけられている、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

50



[ 請求項 3 8 ]

前記 C a s ポリペプチドが、前記 C a s ポリペプチドをコードする m R N A である、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 3 9 ]

前記 C a s ポリペプチドが、C a s 9 ポリペプチド、そのバリエーション、またはその断片である、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 4 0 ]

前記初代細胞へ導入するステップが、前記初代細胞をエレクトロポレーションすることを含む、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 4 1 ]

対象において遺伝的疾患を予防または処置するための方法であって、  
前記遺伝的疾患に関連した標的遺伝子における変異を正すのに十分な量で修飾型単一ガイド RNA ( s g R N A ) を前記対象に投与するステップであって、前記修飾型 s g R N A が、前記標的遺伝子に相補的な第 1 のヌクレオチド配列、および C R I S P R 関連タンパク質 ( C a s ) ポリペプチドと相互作用する第 2 のヌクレオチド配列を含み、かつ前記第 1 のヌクレオチド配列および / または前記第 2 のヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの 1 個または複数が修飾型ヌクレオチドである、ステップを含む、方法。

[ 請求項 4 2 ]

前記遺伝的疾患が、X 連鎖重症複合免疫不全症、鎌状赤血球貧血、サラセミア、血友病、腫瘍症、癌、H I V 感染症、加齢黄斑変性、統合失調症、トリヌクレオチドリピート障害、脆弱 X 症候群、プリオン関連障害、筋萎縮性側索硬化症、薬物依存、自閉症、アルツハイマー病、パーキンソン病、嚢胞性線維症、血液凝固性疾患または障害、炎症、免疫関連疾患または障害、代謝性疾患、肝臓疾患および障害、腎臓疾患および障害、筋肉 / 骨格疾患および障害、神経学的および神経細胞の疾患および障害、心血管疾患および障害、肺疾患および障害、ならびに眼疾患および障害からなる群から選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

[ 請求項 4 3 ]

C a s ポリペプチド、C a s ポリペプチドをコードする m R N A、および / または C a s ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを対象に投与するステップをさらに含む、請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法。

[ 請求項 4 4 ]

前記 C a s ポリペプチドが、C a s 9 ポリペプチド、そのバリエーション、またはその断片である、請求項 4 3 に記載の方法。

[ 請求項 4 5 ]

組換えドナー修復鋳型を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 4 1 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 4 6 ]

前記修飾型 s g R N A の投与が、対応する非修飾型 s g R N A の投与と比較して、前記標的遺伝子において前記変異を正す前記 C a s ポリペプチドの効果を増強する、請求項 4 1 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 請求項 4 7 ]

前記修飾型 s g R N A、C a s ポリペプチド、および / または組換えドナー修復鋳型が、薬学的に許容される担体と共に前記対象に投与される、請求項 4 5 または 4 6 に記載の方法。

[ 請求項 4 8 ]

前記修飾型 s g R N A、C a s ポリペプチド、および / または組換えドナー修復鋳型が、ナノ粒子、リポソーム、ミセル、ピロソーム、核酸複合体、およびそれらの組合せからなる群から選択される送達系によって前記対象へ投与される、請求項 4 5 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

[ 請求項 4 9 ]

前記核酸複合体が、前記 C a s ポリペプチドと複合体化した前記修飾型 s g R N A を含む、請求項 4 8 に記載の方法。

[ 請求項 5 0 ]

前記修飾型 s g R N A、C a s ポリペプチド、および/または組換えドナー修復鋳型が、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、皮下、細動脈内、脳室内、頭蓋内、病巣内、髄腔内、局所的、経粘膜、鼻腔内、およびそれらの組合せからなる群から選択される送達経路によって対象へ投与される、請求項 4 5 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 1 8 7 】

非公式の配列表

配列番号 1

I L 2 R G ターゲティングベクター配列

[illegible]

40

## 【化 1 B】

cgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcggtcgctccaagctgggctgtgtgcacg  
 aaccccccggttcagcccgaccgctgcgccttatccggttaactatcgtcttgagtcacacccggtaagacacgact  
 tatcgccactggcagcagccactggttaacaggattagcagagcgaggatgtaggcgggtgctacagagttcttga  
 agtgggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatattgggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcg  
 gaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacacacacgctggtagcgggtggttttttgtttgcaagcagc  
 agattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacgggggtgacgctcagtggaacg  
 aaaactcacgttaagggattttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaatataaat  
 gaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaccttgggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcac  
 ctatctcagcgatctgtctatcttgcgttcacccatagttgctgactccccgctcggtgtagataactacgatacggg  
 agggcttaccatctggcccgagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcacgggtccagatttatcagcaa  
 taaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtgggtcctgcaactttatccgcctccatccagttctattaatt  
 gttgcggggaagctagagtaagtgttcgcccagttaatagtttgcgcaacgttgttgcattgctacaggcatcg  
 tggtgtcacgctcgctggtttgggtatggcttcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccc  
 ccatgttgtgcaaaaaagcgggttagctccttcgggtcctccgatcggtgtcagaagtaagttggccgcagtggtat  
 cactcatgggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtg  
 agtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcccgcagccaggttgctcttgcggggcgctcaatcggggata  
 ataccgcgcacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaaacggttcttcggggcgaaaactctcaagga  
 tcttacgctggtgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttca  
 ccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacgggaaatgtt  
 gaatactcatactcttctttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcgggatacatat  
 ttgaatgtatttagaaaaataacaaataggggttcgcgcacatttccccgaaaagtgcac

10

I L 2 R G 相同アームは太字でイタリック体である。キメラのイントロンは下線を付し  
 ている。G F P 配列は大文字でイタリック体である。B G H ポリ ( A ) 配列は二重線を付  
 している。

20

## 【 0 1 8 8 】

配列番号 2

H B B ターゲティングベクター配列

【化 2 A】

ctaaattgtaagcggttaatatTTTTgttaaaattcgcgttaaatTTTTgttaaatcagctcattttttaaccaata  
 ggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagataggggtgagtggtgttccagtttgga  
 caagagtcactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggccact  
 acgtgaaccatcacccaatcaagtttttggggcgaggtgcgttaaagcactaaatcggaaccctaaagggag  
 ccccgatttttagagcttgacggggaagccggcgaaacgtggcgagaaaggaaggaagaaagcgaaagggagcggg  
 cgctagggcgctggcaagtgtagcgggtcacgctgcgcgttaaccacacaccgcgcgttaattgcgcgctaca  
 gggcgctccattcgccattcaggtgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggctcttcgctattacg  
 ccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggtttccagtcacgagcttg  
 taaaacgacggccagtgagcgcgcgttaatacgcactcactatagggcgaaattgggtacctaactataacggctcta  
 aggtagcgatttaattaaaggcagaaacagtttagatgtccccagtttaacctcctatttgacaccactgattacccc  
 attgatagtcacactttgggttgtaagtgaacttttattttatttgatttttgactgcattaaagaggtctctagt  
 tttttatctcttggttcccaaacctaataagtaactaatgtcacagagcacattgatttgattttattctattttt  
 tagacataattttattagcatgcatgagcaatttaagaaaaacaacaacaatgaatgcataatatatgtatatgtat  
 tgtgtgtatatatacacacatatatatatatatttttcttttcttaccagaaggttttaattccaaataaggaga  
 agatatgcttagaacggaggttagagttttcatcattctgtcctgtaagtattttgcataattctggagacgcagg  
 aagagatccatctacatatcccaagctgaattatggtagacaaaactcttccacttttagtgcatcaactctct  
 atttggttaataagaaaattgggaaaacgatcttcaatatgcttaccagctgtgattccaaatattacgtaaat  
 acacttgcaagggaggtgttttagtagcaatttgtagtgatgggtatggggccaagagatatcttagagggga  
 gggctgaggggttgaaagtcacactcctaagccagtgccagaagagcgaaggacaggtacggctgtcactcacttag  
 acctcacctgtggagccacacccctaggggtggccaatctactcccaggagcagggagggcaggagccagggctg  
 ggcataaaagtcagggcagagccatctattgcttacatttgctcttgacacaactgtgttcaactagcaacctcaa  
 acagacaccatgggtgcacctgactcctgaggagaagtcgtcgttactgcccagatctgggctccggtgcccgtc  
 agtgggagagcgcacatcgccacagtcgccgagaagttggggggaggggtcggaattgaaccggtgcccaga  
 gaaggtggcgggggtaactgggaaagtgtatgctgtagctggtcgccttttcccgaggggtgggggagaac  
 cgtatataagtcggcctgctgcgcgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgcccagagaacacaggttaagtgcg  
 tgtgtggttcccgcggtcctggcctctttacgggttatggccttgcgctgcttgaattcactccactggctgc  
 agtacgtgattcttgatcccgagcttccgggttggaaagtgggtgggagagttcgagggcttgcgcttaaggagccc  
 ctgcgctcgtgcttgagttgagggcctggcctgggcgtggggcgccgcgctgcgaatctggtggcactctcgcg  
 cctgtctcgctgctttcgataagtccttagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgcttttttctggc  
 aagatagtccttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcgggtttttggggcgccggcgccgagggg  
 cccgtgcgtccagcgcacatgttcggcgagggcgggcctgcgagcgccggccaccgagaatcggaacggggtagt  
 ctcaagctggcggcctgctctgggtgctggcctgcgcgcgctgtatcgccccgcctggcgcgcaaggctgg  
 cccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggcgcttccccggcctgctgcaggagctcaaaatggagga  
 cggcgcgctcgggagagcggcggggtgagtcacccacacaaaggaaaaggcctttccgctcctcagccgtcgctt  
 catgtgactccacggagtaccggcgccgctccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtagctcgctctt  
 taggttggggggaggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtggtggagactgaagttagggcagctt  
 ggcacttgatgtaattctccttggaaatttgcctttttgagtttggatcttgggttcattctcaagcctcagacaq  
 tgggtcaagtttttttctccatttccagtgctgtaggtaccgagctcttcgaaggatccatcgccaccATGC  
 CCGCCATGAAGATCGAGTCCGATACCGGCACCTGAACGGCGTGGAGTTCGAGCTGGTGGCGCGGAGAGG  
 GCACCCCCGAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAAGGCGCCCTGACCTTACGCCCCACCTGC  
 TGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACCCAGCGGCTACGAGAACCCCTTCTGCACG  
 CCATCAACAACGGCGGCTACACCAACACCCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGTGCACGTGAGCTTCA  
 GCTACCGCTACGAGGCCGGCCGCTGATCGGCGAATTCAAGGTGGTGGGCACCGGCTTCCCCGAGGACAGCGTGA  
 TCTTACCAGCAAGATCATCCGACGCAACGCCACCGTGGAGCACTGCACCCCATGGGCGATAACGTGCTGGTGG  
 GCAGTTCCGCCGACCTTACGCTGCGGACGGCGGCTACTACAGCTTCGTGGTGGACAGCCACATGCACCTTCA  
 AGAGCGCCATCCACCCAGCATCCTGCAGAACGGGGGCCCATGTTTCGCTTCCGCCGCGTGGAGGAGCTGCACA  
 GCAACACCGAGCTGGGCATCGTGGAGTACCAGCACGCTTCAAGACCCCCATCGCCTTCGCCAGATCTCGAGTCT  
 agctcgagggcgccgctgatcagcctcgacctgtgcttctagtttccagccatctgttqtttgcctctccc  
 ccgtgcttcccttgacctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaqaaaattgcacgcatt  
 gtctgagtaggtgtcattctattctggggggtggggtggggcaggaacgaaggggagggatttgggaagacaata  
 gcaagcatgctggggtgaggtgggtctatggcttctgagggggaagaaacgtttcgcgccgtgggggcaaggt  
 gaacgtggatgaagttgggtggtagggccttgggaggggtgggtatcaaggttacaagacaggtttaaggagaccaa  
 tagaaactgggcatgtggagacagagaagactcttgggtttctgtaggactgactctctctgcctatttggtct  
 atttcccaaccttaggtgctgggtggtctaccttggaccagaggttctttgagtcctttggggatctgtcca  
 ctctgtatgctgttatgggcaacctaaaggtgaaggctcattggcaagaaagtgtctgggtgccttttagtgatggcc  
 tggctcacctggacaacctcaagggcaccttggccacactgagtgagctgcactgtgacaagctgcacgtggatc  
 ctgagaacttcagggtagtctatgggacgcttgatgtttctttccctctctttctatggttaagttcatgtc

10

20

30

40

## 【化 2 B】

ataggaaggggataagtaacaggggtacagtttagaatgggaaacagacgaatgattgcatcagtggtggaagtctc  
 aggatcggttttagtttcttttatttgcgtgttcataacaattgtttcttttgtttaattcttgcgttctttttt  
 ttcttctccgcaatttttactattatacttaatgccttaacatttgtgtataacaaaaggaaatatctctgagata  
 cattaagtaacttaaaaaaaaactttacacagctctgccttagtacattactatttgggaataatgtgtgcttattt  
 gcatattcataatctccctactttattttcttttatttttaattgatacataatcattatacatattttatgggtt  
 aaagtgtaatgttttaatatgtgtacacatatgtaccaaatcagggtaattttgcatttgttaattttaaaaaatg  
 ctttcttcttttaataatactttttgttttatcttatttcttaataactttccctaactctcttctttcagggcaata  
 atgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaaagaatcctgcaggggagtgagcagctgtaagatttgag  
 gggcgactccgattagtttatcttccacggactagagttggtgtcgaggtgccatttcattacctctttctccg  
 caccgcacatagatgagctccagcttttgttcccttttagtgagggtaattgcgcgcttggcgtaatcatgggtca  
 tagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacatttaattgcgttgcgctcactgccgctttccagtcgggaaac  
 gcctgggtgcttaatgagtgagctaaactcacatttaattgcgttgcgctcactgccgctttccagtcgggaaac  
 ctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaaacgcgcggggagagggcggtttgcgtattggggcgctctccgct  
 tctcgcctcactgactcgtcgcgtcggctcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggttaata  
 cgggttatccacagaatcaggggataaacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaaccgt  
 aaaaaggccgctgtgctggcggttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgagctcaagt  
 cagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctcgtgcgctctcct  
 gttccgacctgcgcttacgggataacctgtccgctttctcccttcgggaagcggtggcgctttctcatagctctcct  
 cgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccggtccagccc  
 gaccgctgcgcttatccggtaactatcgtcttgagtcacacccggtaagacacgacttatcgccactggcgagca  
 gccactggttaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactac  
 ggctacactagaaggacagtatttgggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagc  
 tcttgatccggcaaaacaaaccacgctggttagcggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaa  
 aaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaaggg  
 attttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagttttaaatacaatc  
 taaagtatatatgagtaaaacttgggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgt  
 ctatttcgttccatccatagttgcctgactccccgctcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggc  
 cccagtgctgcaatgatccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccgga  
 agggccgagcgcagaagtgggtcctgcaactttatccgctccatccagctctattaatgtgtgcgggaagctaga  
 gtaagttagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgcattgctacaggcatcgtgggtgtcacgctcgtcg  
 ttgggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaa  
 gcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtggttatcactcatgggttatggca  
 gcaactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtca  
 ttctgagaatagtgtatgcggcgacccaggttgccttgcggcggtcaatacgggataataccgcgccacatagc  
 agaactttaaaagtgtcatcattggaaaaaggttcttcggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgaga  
 tccagttcgatgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagecatcttttactttcaccagcggttctgggtga  
 gcaaaaacaggaaggcaaaatgcgcgcaaaaagggaataaaggcgacacggaaatgttgataactcatactcttc  
 ctttttcaatattattgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcggtacatatatttgaatgtatttagaaa  
 aataaaacaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgcac

10

20

30

H B B 相同アームは太字でイタリック体である。E F 1 プロモーターは下線を付している。G F P 配列は大文字でイタリック体である。B G H ポリ ( A ) 配列は二重線を付している。

【 0 1 8 9 】

配列番号 3

C C R 5 ターゲティングベクター配列

## 【化 3 A】

ctaaattgtaagcggttaatatattttgttaaaattcgcggttaaattttgttaaatcagctcattttttaaccaata  
 ggccgaaatcggaataatccctataaatcaaaagaatagaccgagataggggttgagtgttgttccagtttgga  
 caagagtcactatttaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaacgtctatcagggcgatggccact  
 acgtgaaccatcacccataatcaagttttttgggtcgaggtgcccgtaaagcactaaatcggaaccctaaagggag  
 ccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaaggaaggaagaaagcgaaagggagcggg  
 cgctagggcgctggcaagtgtagcgggtcacgctgcgcgttaaccaccacacccgcgcgcttaatgcgcgctaca  
 gggcgctccattcgccattcaggtgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggctcttcgctattacg  
 ccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgatgaagttgggtaacgcccagggtttccagctcacgagcttg  
 taaaacgacggccagtgagcgcggttaatacgactcactatagggcgaaattgggtacctaactataacggtccta  
 aggtagcgattaattaagaacagtgattggcatccagatattgtgcccctcgaggcctcttaattattactggcttgc  
 tcatagtgcattgttcttttgggttaactctagctcaataaaaaatgttaagactgagttgcagccgggcatgggt  
 gggtcatgctgttaatccagcattcttaggaggctgaggcaggaggatcgcttgagccaggagttcgagaccag  
 cctgggcaacatagtgtgatcttgtatctataaaaaaaacaaaaattagcttgggtgtgggtggcgctgtagtccc  
 cagccacttggaggggtgaggtgagaggattgcttgagcccggtgggtccaggctgcagtgagccatgatcggtg  
 ccactgcactccagcctgggcgacagagtgagaccctgtctcacacaacaacaacaacaacaaaaaggtcgagc  
 tgcacctgcttgaccaggtttcttaaaattgttgtcaagcttcattcactccatgggtgctatagagcacaaga  
 ttttatttgggtgaggtgcttctatgaattcccccaacagagccaagctctccatctagtggacaggggaagct  
 agcagcaaaccttcccttactacaaaacttcattgcttggccaaaagagagtttaattcaatgtgacatctcat  
 gtaggcaattaaaaacctatttgatgtataaaacagtttgcattcatggagggaactaaatacattctaggactt  
 tataaaagatcactttttatttgcacaggggtggaacaagatggattatcaagtgtcaagtcacatctatgaca  
 tcaattattatagcgctctagaattaccctgttatccctaagatctgggctccggtgcccgtcagtgggcgag  
 cgcacatcgccacagtcccccgagaagttggggggaggggtcggaattgaaccggtgcccagagaggtggcg  
 ggggtaaactgggaagtgatgtcgtgactggctccgctttttcccgagggtgggggagaaacglatataagt  
 gcagtagtcgctgtgaacgttcttttgcgaacgggttttgcgcgagaaacacaggttaagtgcggtgtgtgttcc  
 cgggggctggcctctttacgggttatggccttgcgtgcttgaattacttccacttgggtgagtcagtgatt  
 cttgatcccgagcttcgggttgggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagcccccttcgctcgt  
 gcttgagttgagggcctggcctggcgctggggcgccgcgctgcgaatctgggtggcaaccttcgcgctgtctcgt  
 gctttcgataagtccttagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgcttttttctggcaagatagtcctt  
 gtaaatgcccggcgaagatctgcacactggtatttcggtttttggggccgcccggcgccgagcggggcccgctgcgtcc  
 cagcgacatgttcggcgagggcgggcctgcgagcgccgcccacagagaatcggaacgggggtagctcacaagctggc  
 cggcctgctctggtgcttggcctgcgcgcgctgtattcgcccgccctggcgcgcaaggctggcccggtcgga  
 ccagttgcgtgagcggaagatggcgccttcccgccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcccgtctcg  
 ggagagcggcggggtgagtcacccacacaaaggaagggccttccgctcctcagccgtcgttcatgtgactcc  
 acggagtaccggcgccgctccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctttaggttggggg  
 gagggttttatgcgatggagtttccccacactgagtggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatg  
 taattctccttgggaatttgcctttttgagtttggatcttgggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaaagt  
 tttttcttcctatttcaggtgtcgtgaggtaccgagctcttcgaaggatccatcgccaccatgGTGAGCAAGGGC  
 GAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTCGAGCTCGACGGCGACGTAAACCGGCCACAAGTTTCAGCGTG  
 TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCC  
 GTGCCCTGGCCACCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCGCTACCCCGACCACATGAAG  
 CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGACGACGGC  
 AACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC  
 TTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAATAACAAGCCACAACGTCTATATCATGGCC  
 GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGACGCTGCC  
 GACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAG  
 TCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCATATGGTCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCGCGGGGATC  
 ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGtaactcgagggcgccctaatcaacctctggattacaaaatttgtgaa  
 agattgactgggtattcttaactatgttgcctctttacgctatgtggatagctgctttaaagcttctgtatcat  
 gctattgcttcccgatggctttcattttctcctccttgataaaatcctgggttgcgtgctcttcttatgaggaggtg  
 tggcccggttgcaggaacgtggcggtggtgtgactgtgttgcgtgacgcaacccccactggttggggcatttgc  
 accacctgtcagctccttccgggacttctgccttccctccttattgccaacggcggaactcatcgccgctgc  
 cttgcccgtgctggacaggggctcggtgttgggcaactgacaattccgtgggtgttgcgggaaatcatcgctcc  
 tttccttgggtgctcgcctgtgttgcacactggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctc  
 aatccagcgaccttcttcccgcgccctgctgcgcgctctgcggcctcttcccgctcttcgcttgcctcag  
 acgagtcggatctcccttggggcgccctcccgccctggcgcgcccgctgatcgccctcagctatgccttctagt  
 tgcagccatctgttgtttgcccctccccctgcttcttgcacctggaaggtgccactccactgtcctttcc  
 taataaaatgaggaaattgcatcgcatctgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggtgagcaggaac

10

20

30

40

## 【化 3 B】

agcaaggaggagattgqgaagacaataagcaggcatgctgggagatgcccgtgggctctatggettctgagggcgaa  
agaacgttttaaacactagtcctatgacatcaattattatcacatcgagccctgccccaaaaatcaatgtgaagcaaa  
tgcgagcccgctcctgctccgctctactcactgggtgttcatctttgggtttgtgggcaacatgctgggtcatcc  
tcatcctgataaaactgcaaaaggctgaagagcatgactgacatctacctgctcaacctggccatctctgacctgt  
ttttccttcttactgtcccttctggggtcactatgctgcccagtgaggactttggaaatacaatgtgtcaac  
tcttgacagggtctattttataggttcttctctggaatcttcttcatcatcctcctgacaatcgataggtaac  
tggtgtgctccatgctgtgtttgctttaaaagccaggacgggtcacctttgggggtgtgacaagtgtgatcaactt  
gggtggtggtgtgtttgctgtctctccagggaatcatctttaccagatctcaaaaagaaggcttctcattacacct  
gcagctctcattttccatacagtcagtatcaattctggaagaatttccagacattaaagatagtcattctggggc  
tggtcctgcccgtgcttgtcatggtcatctgctactcggaatcctaaaaactctgcttcgggtgtcgaaatgaga  
agaagaggcacagggtgtgaggcttatcttcaccatcatgattgtttattttctctctgggctccctacaaca  
ttgtccttctcctgaacaccttccagggaattctttggcctgaataattgcagtagcttcaacagggttggaaccaag  
ctatgcagggtgactgcccatttcttaccctcttctcgcacccgacatagatgagctccagcttttgttcccttt  
agtgagggttaattgctgctgttggcgtaatcatgggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcaca  
ttccacacacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaataagtgagctaaactcacattaa  
ttgctgtgctcactgcccgttctccagtcgggaacctgtcgtgcccagctgcattaatgaatcgcccaacgctg  
cggggagaggcggtttgctattgggctgtcttccgcttctcctgctcactgactcgtgctgctcggtcggttcggc  
tgcggcgagcggtatcagctcactcaaaaggcggttaacgggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaaga  
acatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacctgtaaaaggccgcttgcctggcggttttccatagggctcc  
gccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaaacccgacaggactataaagatacc  
agcgcttcccccctggaagctccctcgtgctgtctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgct  
ttctcccttcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggctcgttcgct  
ccaagctgggtgtgtgacgaaccccccttccagccgacccgctgccccttatccggtaactatcgtcttgagt  
ccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgagggtatgtag  
gcgggtgtacagagttcttgaagtgggtggcctaactacgggtacactagaaggacagttttggtatctgctgctc  
tgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccccgctggtagcggtg  
gttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacgg  
ggtctgagcctcagtggaacgaaaaactcacgttaagggttttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacct  
agatccttttaaatataaaatgaagtttttaaatcaatcaaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttacc  
aatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttgcgttcatccatagttgctgactccccgtcg  
tgtagataactacgatacgggaggggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcac  
cggtccagatttatcagcaataaaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccg  
cctccatccagctctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacggtg  
ttgccattgtcacaggcatcgtgggtgtcacgctcgtcgtttgggtatggcttcattcagctccgggttcccaacgat  
caaggcgagttacatcccccatggttgcaaaaaagcggttagctccttcgggtcctccgatcgttgtcagaa  
gtaagttggccgagtggttatcactcatgggtatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaa  
gatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcccgcacccaggttgctctt  
gccccgctgcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacggttctt  
cggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcaccccaactgat  
cttcagcatcttttactttccaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaaatgcgcgaaaaaaggaa  
taaggcgacacggaatggtgaatactcatactcttctttttcaatattattgaagcatttatcagggttatt  
gtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaataaggggttccgcgcacatttccccgaa  
aagtgcac

10

20

30

H B B 相同アームは太字でイタリック体である。E F 1 プロモーターは下線を付して  
 いる。G F P 配列は大文字でイタリック体である。W P R E 配列は破線が引かれている。  
 B G H ポリ ( A ) 配列は二重線が引かれている。

## 【 0 1 9 0 】

配列番号 4 ~ 1 9

表 1 参照。

配列番号 2 0 ~ 3 1

表 2 参照。

配列番号 3 2 ~ 7 1

表 3 参照。

配列番号 7 2 ~ 8 3

表 4 参照。

配列番号 8 4

I L 2 R G \_ f w : 5 ' - T C A C A C A G C A C A T A T T T G C C A C A C C C T C  
 T G - 3 '、

配列番号 8 5

I L 2 R G \_ R V : 5 ' - T G C C C A C A T G A T T G T A A T G G C C A G T G G -

40

50



3'

配列番号 8 6

HBB\_fw: 5' - CCAACTCCTAAGCCAGTGCCAGAAGAG - 3'

配列番号 8 7

HBB\_rv: 5' - AGTCAGTGCCTATCAGAAACCCAAGAG - 3'

配列番号 8 8

CCR5\_fw: 5' - GCACAGGGTGGAACAAGATGG - 3'

配列番号 8 9

CCR5\_rv: 5' - CACCACCCCAAAGGTGACCGT - 3'

配列番号 9 0

5' - GGCTGTTGTCATCTATGACCTTCCC - 3'

配列番号 9 1

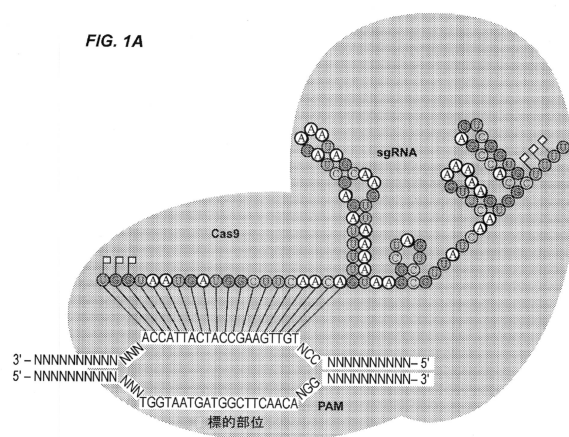
5' - TGTAAACTGAGCTTGCTCGCTCG - 3'

配列番号 9 2

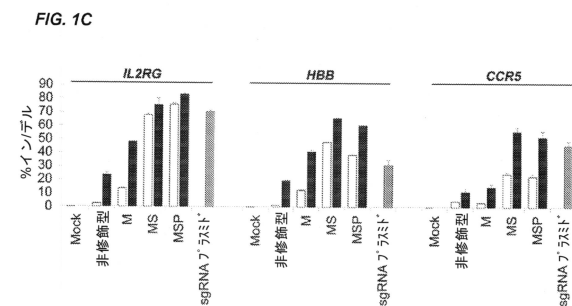
5' - GCACAGGGTGGAACAAGATGG - 3'

10

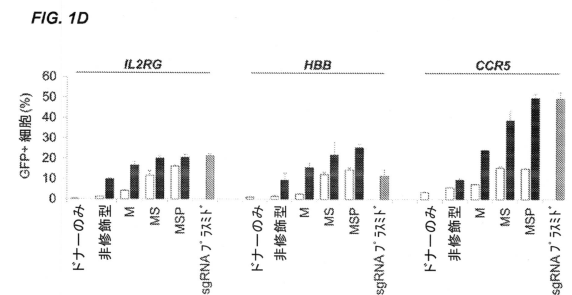
【図 1 A】



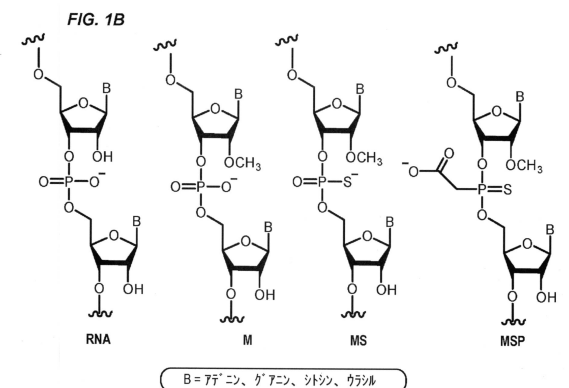
【図 1 C】



【図 1 D】

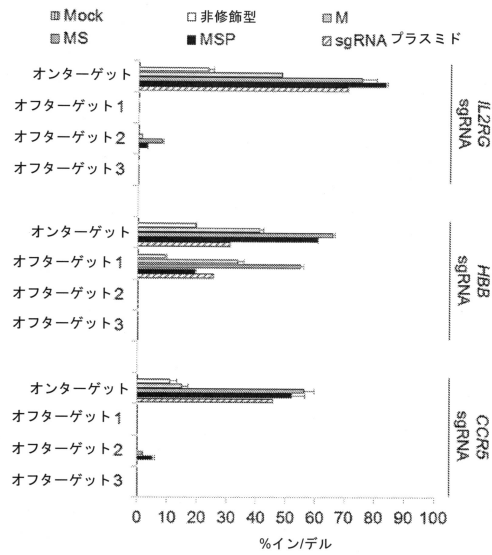


【図 1 B】



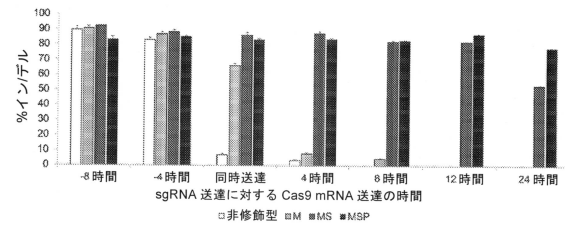
【図 1 E】

FIG. 1E



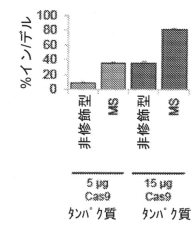
【図 1 F】

FIG. 1F



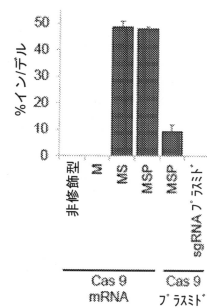
【図 1 G】

FIG. 1G



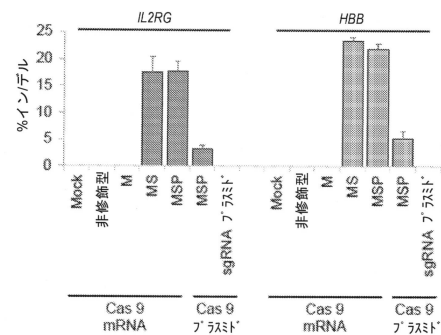
【図 2 A】

FIG. 2A



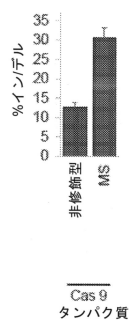
【図 2 C】

FIG. 2C



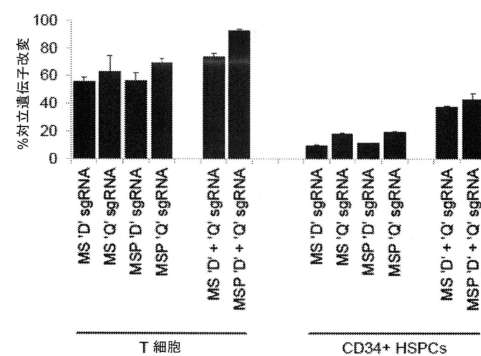
【図 2 B】

FIG. 2B



【図 2 D】

FIG. 2D



【図 3】

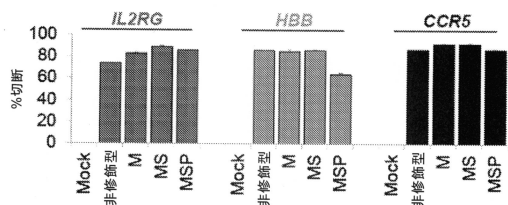


FIG. 3

【図 4】

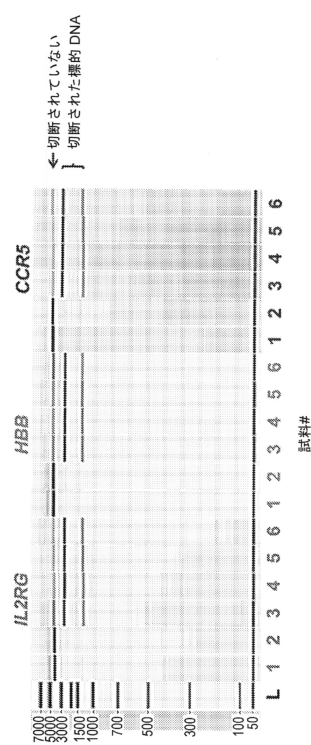


FIG. 4

【図 5】

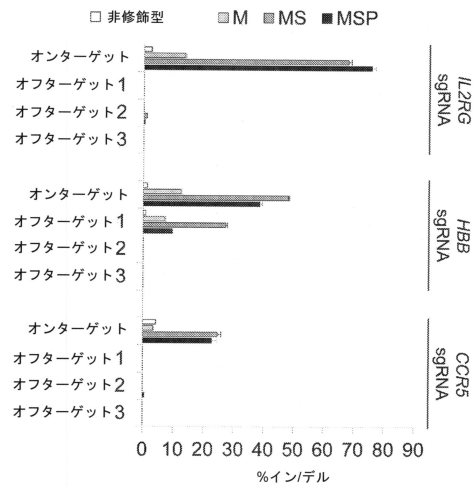


FIG. 5

【図 6】

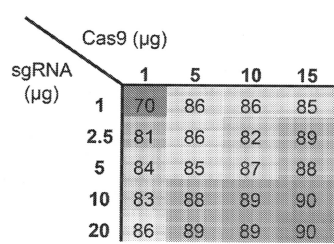


FIG. 6

【図 7】

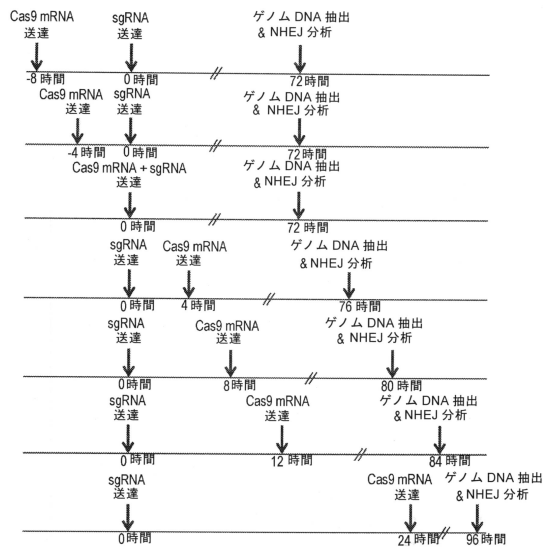


FIG. 7

【図 8】

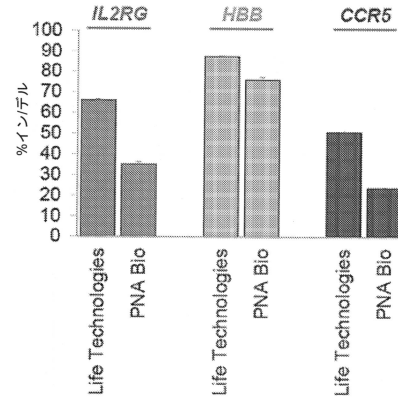
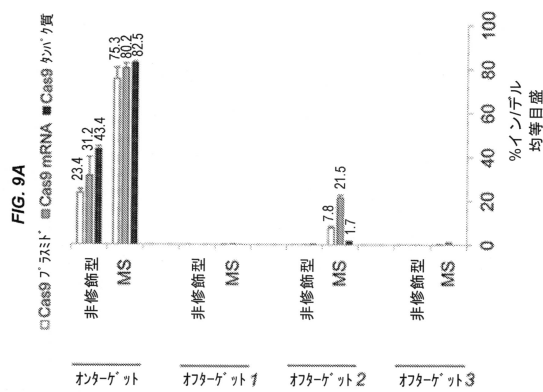


FIG. 8

【図 9 A】



【図 10】

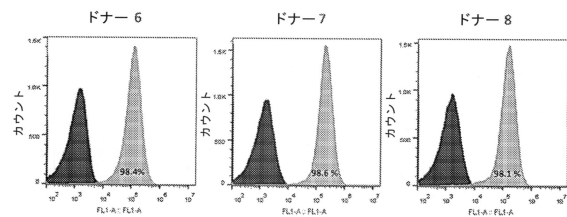
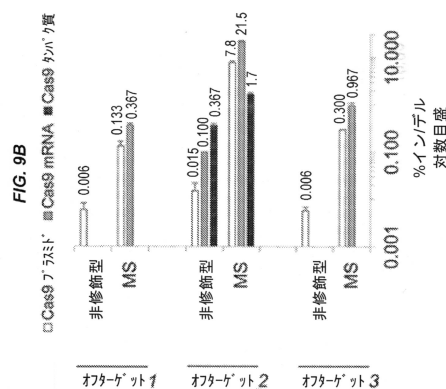


FIG. 10

【図 9 B】



【図 1 1】

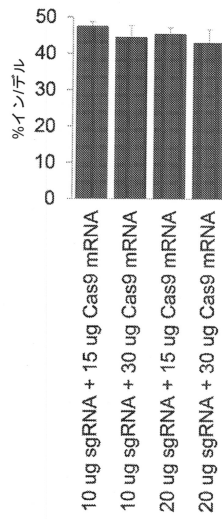


FIG. 11

【図 1 2】

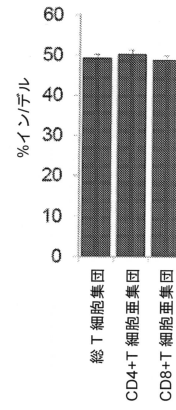


FIG. 12

【図 1 3】

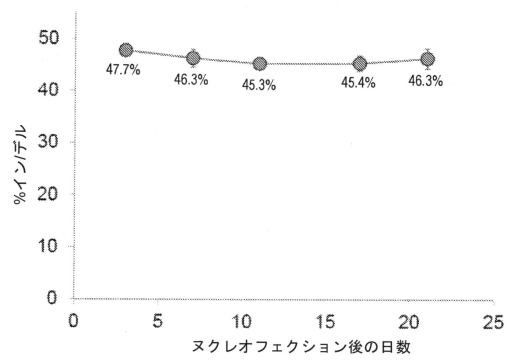


FIG. 13

【図 1 4】

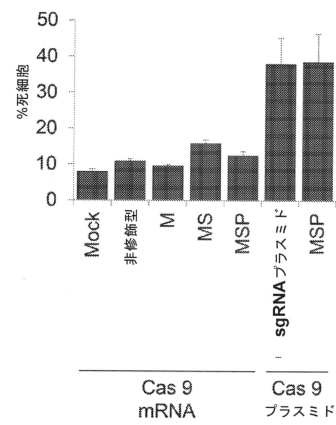


FIG. 14

【図 15】

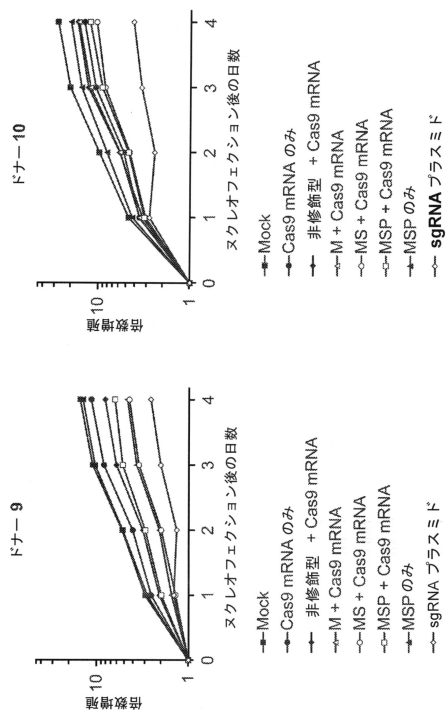


FIG. 15

【図 16】

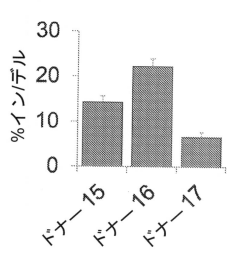


FIG. 16

【図 17】

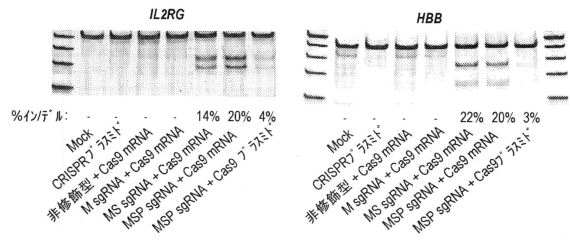
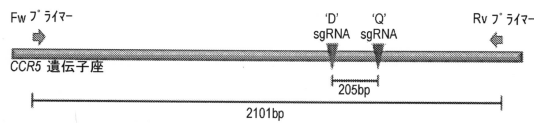


FIG. 17

【図 18 A】

FIG. 18A



【図 18 B】

FIG. 18B

	T 細胞		CD34+ HSPCs	
分析された総クローニング化 PCR 断片	181	186	222	216
%対立遺伝子改変±SEM	73.9 (±2.8)	93.1 (±1.1)	37.8 (±0.5)	43.0 (±4.3)
%WT 対立遺伝子±SEM	26.1 (±2.8)	6.9 (±1.1)	62.2 (±0.5)	57.0 (±4.3)
切断部位間の欠失を有する%対立遺伝子±SEM	53.4 (±4.2)	69.7 (±2.1)	21.1 (±1.6)	23.1 (±1.1)
切断部位間の逆方向配列を有する%対立遺伝子±SEM	5.3 (±2.2)	9.6 (±2.0)	5.9 (±2.6)	6.9 (±2.1)
両側部位にイン/デルの%±SEM	12.7 (±2.4)	12.6 (±1.6)	3.6 (±1.2)	7.9 (±1.9)
右側部位だけにイン/デルの%±SEM	2.4 (±1.7)	1.1 (±0.6)	3.6 (±0.9)	2.3 (±1.2)
左側部位だけにイン/デルの%±SEM	0	0	3.6 (±0.5)	2.8 (±0.8)

【図 19】

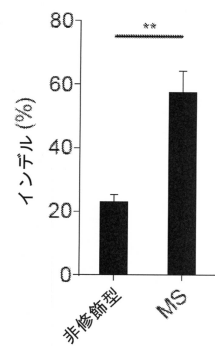


FIG. 19

【図 20】

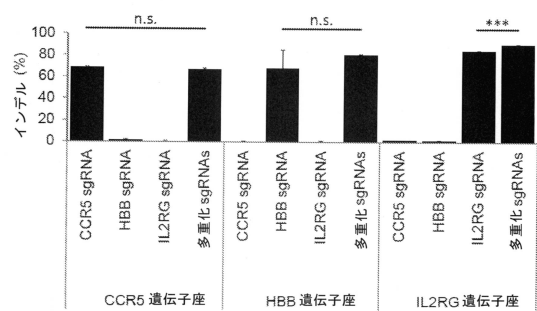


FIG. 20

【図 21】

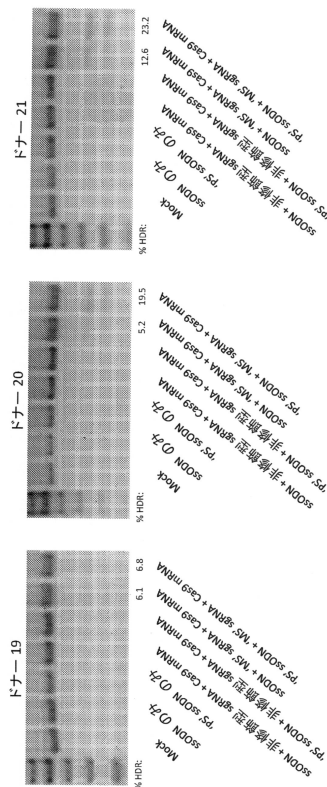


FIG. 21

【配列表】

0006873911000001.app



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/18	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	25/36	(2006.01)	A 6 1 P	25/36	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 1
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
			A 6 1 K	47/26	

(73)特許権者 399117121

アジレント・テクノロジーズ・インク

A G I L E N T   T E C H N O L O G I E S ,   I N C .

アメリカ合衆国カリフォルニア州サンタクララ   スティーブンス・クリーク・ブルバード   5 3  
0 1

(74)代理人 100099623

弁理士 奥山 尚一

(74)代理人 100096769

弁理士 有原 幸一

(74)代理人 100107319

弁理士 松島 鉄男

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74)代理人 100170379

- 弁理士 徳本 浩一
- (74)代理人 100180231  
弁理士 水島 亜希子
- (72)発明者 ポーテアス, マシュー・エイチ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 6 - 1 1 0 6, パロ・アルト, エル・カミーノ・レアル  
3 0 0 0, ザ・ボード・オブ・トラステイズ・オブ・ザ・レランド・スタンフォード・ジュニア・ユニバーシティー内
- (72)発明者 ヘンデル, エイアル  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 6 - 1 1 0 6, パロ・アルト, エル・カミーノ・レアル  
3 0 0 0, ザ・ボード・オブ・トラステイズ・オブ・ザ・レランド・スタンフォード・ジュニア・ユニバーシティー内
- (72)発明者 クラーク, ジョー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 6 - 1 1 0 6, パロ・アルト, エル・カミーノ・レアル  
3 0 0 0, ザ・ボード・オブ・トラステイズ・オブ・ザ・レランド・スタンフォード・ジュニア・ユニバーシティー内
- (72)発明者 バク, ラスマス・オー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 6 - 1 1 0 6, パロ・アルト, エル・カミーノ・レアル  
3 0 0 0, ザ・ボード・オブ・トラステイズ・オブ・ザ・レランド・スタンフォード・ジュニア・ユニバーシティー内
- (72)発明者 ライアン, ダニエル・イー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 1, サンタクララ, スティーブンス・クリーク・ブルバード 5 3 0 1, アジレント・テクノロジーズ・インク内
- (72)発明者 デリンジャー, ダグラス・ジェイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 1, サンタクララ, スティーブンス・クリーク・ブルバード 5 3 0 1, アジレント・テクノロジーズ・インク内
- (72)発明者 カイザー, ロバート  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 1, サンタクララ, スティーブンス・クリーク・ブルバード 5 3 0 1, アジレント・テクノロジーズ・インク内
- (72)発明者 マイヤーソン, ジョエル  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 5 1, サンタクララ, スティーブンス・クリーク・ブルバード 5 3 0 1, アジレント・テクノロジーズ・インク内

審査官 松田 芳子

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 0 9 3 7 1 2 (WO, A 1)  
国際公開第 2 0 1 4 / 0 9 3 6 3 5 (WO, A 1)  
国際公開第 2 0 1 5 / 0 2 6 8 8 5 (WO, A 1)  
PNAS, 2 0 1 5 年 1 1 月 1 6 日, E7110-E7117  
Nature Biotechnol., 2 0 1 5 年 9 月, vol.33, p.985-989

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 1 2 N 1 5 / 0 9  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / W P I D S / B I O S I S ( S T N )