(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6625971号
(P6625971)

(45)発行日　令和1年12月25日(2019.12.25)　(24)登録日　令和1年12月6日(2019.12.6)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/09 | 110 |
| C12N 15/113 | (2010.01) | C12N | 15/113 | ZNAZ |
| C12N 15/56 | (2006.01) | C12N | 15/56 | |
| C12N 9/16 | (2006.01) | C12N | 9/16 | Z |
| C12N 15/63 | (2006.01) | C12N | 15/63 | Z |

請求項の数 71　(全 245 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-521449(P2016-521449)
(86)(22)出願日　平成26年6月10日(2014.6.10)
(65)公表番号　特表2016-521993(P2016-521993A)
(43)公表日　平成28年7月28日(2016.7.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/041800
(87)国際公開番号　WO2014/204724
(87)国際公開日　平成26年12月24日(2014.12.24)
審査請求日　平成29年6月8日(2017.6.8)
(31)優先権主張番号　61/836,123
(32)優先日　平成25年6月17日(2013.6.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　61/862,355
(32)優先日　平成25年8月5日(2013.8.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】配列操作のためのタンデムガイド系、方法および組成物の送達、エンジニアリングおよび最適化

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞中の目的ゲノム遺伝子座の改変に使用するための天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物であって、
Ｉ．タンデムガイドＲＮＡまたはタンデムガイドＲＮＡをコードするポリヌクレオチドであって、前記タンデムガイドＲＮＡは、
（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第１の標的配列に対する第１のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し得る第１のガイド配列、
（ｂ）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし得る第１のｔｒａｃｒメイト配列、
（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、
（ｄ）第２の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第２の標的配列に対する第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し得る第２のガイド配列、
（ｅ）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし得る第２のｔｒａｃｒメイト配列、および
（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列
を含み、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）および（ｆ）は５’から３’配向で配置されており、かつ（ｃ）および（ｄ）はヌクレオチドリンカーにより結合している、タンデムガイドＲＮＡまたはタンデムガイドＲＮＡをコードするポリヌクレオチド、および
ＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列（ＮＬＳ）を含むＣａｓ９、または前記Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチド

を含む、組成物。
【請求項２】
前記ゲノム遺伝子座の前記改変がインデルおよび／または微小欠失の誘導を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記微小欠失が前記第１および第２の標的配列間の配列の欠失を含む、請求項２に記載の組成物。
【請求項４】
前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも５ヌクレオチドを含む、請求項１から３の何れか一項に記載の組成物。
【請求項５】
前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも１０ヌクレオチドを含む、請求項１から３の何れか一項に記載の組成物。
【請求項６】
前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも２０ヌクレオチドを含む、請求項１から３の何れか一項に記載の組成物。
【請求項７】
前記ヌクレオチドリンカーが８または１２ヌクレオチドを有する、請求項１から３の何れか一項に記載の組成物。
【請求項８】
前記第１もしくは第２のガイド配列、前記第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列および／または前記第１もしくは第２のｔｒａｃｒメイト配列が改変される、請求項１から７の何れか一項に記載の組成物。
【請求項９】
前記改変が、最適化された第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列ならびに／または最適化された第１もしくは第２のガイド配列、ならびに／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列および／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒメイト配列それぞれの同時折り畳み構造、ならびに／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列の二次構造の安定化ならびに／または短縮された塩基対形成の領域を有する第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列を含む、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチドがＲＮＡである、請求項１から９の何れか一項に記載の組成物。
【請求項１１】
前記Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチドがＲＮＡであり、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃によって送達される、請求項１から９の何れか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
前記第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列が１００％の同一性を共有する、請求項１から１１の何れか一項に記載の組成物。
【請求項１３】
前記第１および第２のｔｒａｃｒ配列が１００％の同一性を共有する、請求項１から１２の何れか一項に記載の組成物。
【請求項１４】
前記Ｃａｓ９がヌクレアーゼまたはニッカーゼである、請求項１から１３の何れか一項に記載の組成物。
【請求項１５】
前記Ｃａｓ９がＳｐＣａｓ９またはＳａＣａｓ９である、請求項１４に記載の組成物。
【請求項１６】
１つ以上のベクターを含むベクター系を含む、細胞中の目的ゲノム遺伝子座の改変に使

用するための天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物であって、前記１つ以上のベクターを含むベクター系は、
Ｉ．タンデムガイドＲＮＡをコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合している第１の調節エレメントであって、前記タンデムガイドＲＮＡは、
（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第１の標的配列に対する第１のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し得る第１のガイド配列、
（ｂ）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし得る第１のｔｒａｃｒメイト配列、
（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、
（ｄ）第２の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第２の標的配列に対する第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し得る第２のガイド配列、
（ｅ）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし得る第２のｔｒａｃｒメイト配列、および
（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列
を含み、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）および（ｆ）は５’から３’配向で配置されており、かつ（ｃ）および（ｄ）はヌクレオチドリンカーにより結合している、第１の調節エレメント、および
ＩＩ．Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合している第２の調節エレメントであって、前記Ｃａｓ９は１つ以上のＮＬＳを含む、第２の調節エレメント
を含み、成分ＩおよびＩＩは前記系の同じまたは異なるベクター上に局在している、組成物。

【請求項１７】
前記ゲノム遺伝子座の前記改変がインデルおよび／または微小欠失の誘導を含む、請求項１６に記載の組成物。

【請求項１８】
前記微小欠失が前記第１および第２の標的配列間の配列の欠失を含む、請求項１７に記載の組成物。

【請求項１９】
前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも５ヌクレオチドを含む、請求項１６から１８の何れか一項に記載の組成物。

【請求項２０】
前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも１０ヌクレオチドを含む、請求項１６から１８の何れか一項に記載の組成物。

【請求項２１】
前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも２０ヌクレオチドを含む、請求項１６から１８の何れか一項に記載の組成物。

【請求項２２】
前記ヌクレオチドリンカーが８または１２ヌクレオチドを有する、請求項１６から１８の何れか一項に記載の組成物。

【請求項２３】
前記第１もしくは第２のガイド配列、前記第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列および／または前記第１もしくは第２のｔｒａｃｒメイト配列が改変される、請求項１６から２２の何れか一項に記載の組成物。

【請求項２４】
前記改変が、最適化された第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列ならびに／または最適化された第１もしくは第２のガイド配列、ならびに／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列および／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒメイト配列それぞれの同時折り畳み構造、ならびに／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列の二次構造の安定化ならびに／または短縮された塩基対形成の領域を有する第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列を含む、請求項２３に記載の組成物。

【請求項２５】

前記１つ以上のベクターがウイルスベクターである、請求項１６から２４の何れか一項に記載の組成物。
【請求項２６】
前記１つ以上のベクターがＡＡＶベクターである、請求項１６から２４の何れか一項に記載の組成物。
【請求項２７】
前記第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列が１００％の同一性を共有する、請求項１６から２６の何れか一項に記載の組成物。
【請求項２８】
前記第１および第２のｔｒａｃｒ配列が１００％の同一性を共有する、請求項１６から２７の何れか一項に記載の組成物。
【請求項２９】
前記Ｃａｓ９がヌクレアーゼまたはニッカーゼである、請求項１６から２８の何れか一項に記載の組成物。
【請求項３０】
前記１つ以上のベクターがＳｐＣａｓ９またはＳａＣａｓ９である、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３１】
細胞中の目的ゲノム遺伝子座中のＤＮＡ二重鎖の逆鎖上の第１および第２の標的配列の改変に使用するための天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物であって、
Ｉ．タンデムガイドＲＮＡまたはタンデムガイドＲＮＡをコードするポリヌクレオチドであって、前記タンデムガイドＲＮＡは、
（ａ）前記第１の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第１の標的配列に対する第１のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し得る第１のガイド配列、
（ｂ）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし得る第１のｔｒａｃｒメイト配列、
（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、
（ｄ）前記第２の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第２の標的配列に対する第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し得る第２のガイド配列、
（ｅ）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし得る第２のｔｒａｃｒメイト配列、および
（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列
を含み、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）および（ｆ）は５’から３’配向で配置されており、かつ（ｃ）および（ｄ）はヌクレオチドリンカーにより結合している、タンデムガイドＲＮＡまたはタンデムガイドＲＮＡをコードするポリヌクレオチド、および
ＩＩ．ニッカーゼであり且つ１つ以上のＮＬＳを含むＣａｓ９、又は前記Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチドを含み、
前記第１のガイド配列が前記第１の標的配列近傍で前記Ｃａｓ９により前記ＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し得るものであり、かつ前記第２のガイド配列が前記第２の標的配列近傍で前記Ｃａｓ９により前記ＤＮＡ二重鎖の他方の鎖の開裂を指向し得るものであり、それにより二本鎖切断が誘導される、組成物。
【請求項３２】
前記第１の標的配列近傍で前記ＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向する前記第１のガイド配列および前記第２の標的配列近傍で前記ＤＮＡ二重鎖の他方の鎖の開裂を指向する前記第２のガイド配列が５’オーバーハングをもたらす、請求項３１に記載の組成物。
【請求項３３】
前記５’オーバーハングが高々２００ヌクレオチドである、請求項３２に記載の組成物。
【請求項３４】
前記５’オーバーハングが高々１００ヌクレオチドである、請求項３２に記載の組成物。

【請求項３５】
前記５’オーバーハングが高々５０ヌクレオチドである、請求項３２に記載の組成物。
【請求項３６】
前記５’オーバーハングが少なくとも２６ヌクレオチドである、請求項３２に記載の組成物。
【請求項３７】
前記５’オーバーハングが少なくとも３０ヌクレオチドである、請求項３２に記載の組成物。
【請求項３８】
前記５’オーバーハングが３４～５０ヌクレオチドである、請求項３２に記載の組成物。
【請求項３９】
前記Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチドがＲＮＡである、請求項３１から３８の何れか一項に記載の組成物。
【請求項４０】
前記第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列が１００％の同一性を共有する、請求項３１から３９の何れか一項に記載の組成物。
【請求項４１】
前記第１および第２のｔｒａｃｒ配列が１００％の同一性を共有する、請求項３１から４０の何れか一項に記載の組成物。
【請求項４２】
前記Ｃａｓ９がＳａＣａｓ９である、請求項３１から４１の何れか一項に記載の組成物。
【請求項４３】
前記Ｃａｓ９がＳｐＣａｓ９である、請求項３１から４１の何れか一項に記載の組成物。
【請求項４４】
前記Ｃａｓ９が触媒ドメイン中の１つ以上の突然変異を含む、請求項３１から４１の何れか一項に記載の組成物。
【請求項４５】
前記Ｃａｓ９がＳｐＣａｓ９であり、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される１つ以上の突然変異を含む、請求項４４に記載の組成物。
【請求項４６】
前記ＳｐＣａｓ９が前記Ｄ１０Ａ突然変異を含む、請求項４５に記載の組成物。
【請求項４７】
前記第１もしくは第２のガイド配列、前記第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列、および／または前記第１もしくは第２のｔｒａｃｒメイト配列が、最適化された第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列ならびに／または最適化された第１もしくは第２のガイド配列、ならびに／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列および／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒメイト配列それぞれの同時折り畳み構造、ならびに／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列の二次構造の安定化、ならびに／または短縮された塩基対形成の領域を有する第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列により改変される、請求項３１から４６の何れか一項に記載の組成物。
【請求項４８】
１つ以上のベクターを含むベクター系を含む、細胞中の目的ゲノム遺伝子座中のＤＮＡ二重鎖の逆鎖上の第１および第２の標的配列の改変に使用するための天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物であって、前記１つ以上のベクターを含むベクター系は、
Ｉ．タンデムガイドＲＮＡをコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合している第

１の調節エレメントであって、前記タンデムガイドＲＮＡは、
（ａ）前記第１の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第１の標的配列に対する第１のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し得る第１のガイド配列、
（ｂ）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし得る第１のｔｒａｃｒメイト配列、
（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、
（ｄ）前記第２の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第２の標的配列に対する第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し得る第２のガイド配列、
（ｅ）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし得る第２のｔｒａｃｒメイト配列、および
（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列
を含み、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）および（ｆ）は５’から３’配向で配置されており、かつ（ｃ）および（ｄ）はヌクレオチドリンカーにより結合している、第１の調節エレメント、および
ＩＩ．Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチドに作動可能に結合している第２の調節エレメントであって、Ｃａｓ９はニッカーゼであり且つ１つ以上のＮＬＳを含む、第２の調節エレメント
を含み、
成分ＩおよびＩＩは前記系の同じまたは異なるベクター上に局在しており、
前記第１のガイド配列が前記第１の標的配列近傍で前記Ｃａｓ９により前記ＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し得るものであり、かつ前記第２のガイド配列が前記第２の標的配列近傍で前記Ｃａｓ９により前記ＤＮＡ二重鎖の他方の鎖の開裂を指向し得るものであり、それにより二本鎖切断が誘導される、組成物。
【請求項４９】
前記第１の標的配列近傍で前記ＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向する前記第１のガイド配列および前記第２の標的配列近傍で前記ＤＮＡ二重鎖の他方の鎖の開裂を指向する前記第２のガイド配列が５’オーバーハングをもたらす、請求項４８に記載の組成物。
【請求項５０】
前記５’オーバーハングが高々２００ヌクレオチドである、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５１】
前記５’オーバーハングが高々１００ヌクレオチドである、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５２】
前記５’オーバーハングが高々５０ヌクレオチドである、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５３】
前記５’オーバーハングが少なくとも２６ヌクレオチドである、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５４】
前記５’オーバーハングが少なくとも３０ヌクレオチドである、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５５】
前記５’オーバーハングが３４～５０ヌクレオチドである、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５６】
前記１つ以上のベクターがウイルスベクターである、請求項４８から５５の何れか一項に記載の組成物。
【請求項５７】
前記第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列が１００％の同一性を共有する、請求項４８から５６の何れか一項に記載の組成物。
【請求項５８】

前記第１および第２のｔｒａｃｒ配列が１００％の同一性を共有する、請求項４８から５７の何れか一項に記載の組成物。
【請求項５９】
前記Ｃａｓ９がＳａＣａｓ９である、請求項４８から５８の何れか一項に記載の組成物。
【請求項６０】
前記Ｃａｓ９がＳｐＣａｓ９である、請求項４８から５８の何れか一項に記載の組成物。
【請求項６１】
前記Ｃａｓ９が触媒ドメイン中の１つ以上の突然変異を含む、請求項４８から５８の何れか一項に記載の組成物。
【請求項６２】
前記Ｃａｓ９がＳｐＣａｓ９であり、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される１つ以上の突然変異を含む、請求項６１に記載の組成物。
【請求項６３】
前記ＳｐＣａｓ９が前記Ｄ１０Ａ突然変異を含む、請求項６２に記載の組成物。
【請求項６４】
前記ウイルスベクターがＡＡＶベクターである、請求項５６に記載の組成物。
【請求項６５】
前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも５ヌクレオチドを含む、請求項３１から６４の何れか一項に記載の組成物。
【請求項６６】
前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも１０ヌクレオチドを含む、請求項３１から６４の何れか一項に記載の組成物。
【請求項６７】
前記ヌクレオチドリンカーが少なくとも２０ヌクレオチドを含む、請求項３１から６４の何れか一項に記載の組成物。
【請求項６８】
前記ヌクレオチドリンカーが８ヌクレオチドを有する、請求項３１から６４の何れか一項に記載の組成物。
【請求項６９】
請求項３１から６８の何れか一項に記載の組成物において、
－　前記二本鎖切断によって生じる前記オーバーハングに相補的なオーバーハングを含む二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｄｓＯＤＮ）であって、前記ｄｓＯＤＮが前記目的の遺伝子座にインテグレートされ得る、ｄｓＯＤＮ；または
－　一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）であって、前記ｓｓＯＤＮが前記二本鎖切断の相同性組換え修復のテンプレートとして働き得る、ｓｓＯＤＮ
をさらに含む組成物。
【請求項７０】
（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第１の標的配列に対する第１のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し得る第１のガイド配列、
（ｂ）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし得る第１のｔｒａｃｒメイト配列、
（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、
（ｄ）第２の標的配列にハイブリダイズし得るおよび前記第２の標的配列に対する第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し得る第２のガイド配列、
（ｅ）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし得る第２のｔｒａｃｒメイト配列、および
（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列
を含み、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）および（ｆ）は５’から３’配向で配

置されており、かつ（ｃ）および（ｄ）はヌクレオチドリンカーにより結合している、タンデムガイドＲＮＡ。
【請求項７１】
請求項７０に記載のタンデムガイドＲＮＡをコードするポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願および参照による組み込み
２０１３年６月１７日に出願された米国仮特許出願第６１／８３６，１２３号明細書；２０１３年７月１７日に出願された同第６１／８４７，５３７号明細書；２０１３年８月５日に出願された同第６１／８６２，３５５号明細書；２０１３年８月５日に出願された同第６１／８６２，４６８号明細書；２０１３年８月２８日に出願された同第６１／８７１，３０１号明細書；２０１３年１２月１２日に出願された同第６１／９１５，４０７号明細書；および２０１４年４月１５日に出願された同第６１／９７９，９４２号明細書からの優先権が主張される。
【０００２】
上記の出願、ならびにそれらの出願においてまたはそれらの審査中に引用される全ての文献（「出願引用文献」）およびその出願引用文献において引用または参照される全ての文献、ならびに本明細書において引用または参照される全ての文献（「本明細書引用文献」）、および本明細書引用文献において引用または参照される全ての文献は、本明細書においてまたは本明細書に参照により組み込まれる任意の文献において挙げられる任意の製品に関する任意の製造業者の指示書、説明書、製品仕様書、および製品シートと一緒に、参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施において用いることができる。より具体的には、全ての参照文献は、それぞれの個々の文献が個別具体的に参照により組み込まれることが示されるような程度で参照により組み込まれる。
【０００３】
本発明は、一般に、クラスター化等間隔短鎖回分リピート（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔ）（ＣＲＩＳＰＲ）およびその成分に関する配列ターゲティング、例えば、ゲノム摂動または遺伝子編集を含む遺伝子発現の制御に使用される系、方法および組成物の送達、エンジニアリング、および最適化に関する。
【０００４】
連邦政府により資金提供された研究に関する記述
本発明は、米国国立衛生研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ）により助成されたＮＩＨパイオニアアワード（１ＤＰ１ＭＨ１００７０６）のもと政府支援によりなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。
【背景技術】
【０００５】
ゲノムシーケンシング技術および分析法の近年の進歩により、多様な範囲の生物学的機能および疾患に関連する遺伝因子を分類およびマッピングする技能が顕著に加速されている。正確なゲノムターゲティング技術は、個々の遺伝子エレメントの選択的摂動を可能とすることにより因果的遺伝子変異の体系的なリバースエンジニアリングを可能とするため、ならびに合成生物学、バイオテクノロジーおよび医薬用途を進歩させるために必要とされる。ゲノム編集技術、例えば、デザイナー亜鉛フィンガー、転写アクチベーター様エフェクター（ＴＡＬＥ）、またはホーミングメガヌクレアーゼがターゲティングされるゲノム摂動の産生に利用可能であるが、安価で、設定が容易で、スケーラブルで、真核ゲノム内の複数位置をターゲティングしやすい新たなゲノムエンジニアリング技術が依然として必要とされている。
【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は特異的配列をターゲティングするためにカスタム化タンパク質の生成を要求しないが、単一Ｃａｓ酵素を短鎖ＲＮＡ分子によりプログラミングして特異的ＤＮＡ標的を認識させることができる。ゲノムシーケンシング技術および分析法のレパートリーへのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の付加により方法論が顕著に簡易化され、多様な範囲の生物学的機能および疾患に関連する遺伝因子を分類およびマッピングする技能が加速される。有害効果を有さずにゲノム編集にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を有効に利用するため、特許請求される本発明の態様であるそれらのゲノムエンジニアリングツールのエンジニアリング、および最適化の態様を理解することが重要である。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
幅広い適用性を有する配列ターゲティングのための代替的かつロバストな系および技術が差し迫って必要とされている。本発明の態様はこの必要性に応え、かつ関連する利点をもたらす。例示的なＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体形成するＣＲＩＳＰＲ酵素を含む。ガイド配列はｔｒａｃｒメイト配列に結合し、次にはｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする。
【０００８】
一態様において、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上のエレメントを使用する方法を提供する。本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的ポリヌクレオチドを改変する有効な手段を提供する。本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、多様な細胞型における標的ポリヌクレオチドの改変（例えば、欠失、挿入、移行、不活性化、活性化）を含めた幅広い有用性を有する。一態様において、細胞は原核細胞である。従って本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、例えば、遺伝子またはゲノム編集、遺伝子療法、創薬、薬物スクリーニング、疾患診断、および予後診断において広範囲の適用性を有する。例示的ＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む。ガイド配列はｔｒａｃｒメイト配列に結合しており、次にはｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする。
【０００９】
本発明の態様は、最適活性を有し、野生型Ｃａｓ９酵素より長さが短いガイドＲＮＡを有するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系における標的特異性が向上したＣａｓ９酵素およびそれをコードする核酸分子、およびキメラＣａｓ９酵素、ならびにＣａｓ９酵素の標的特異性を向上させる方法またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系を設計する方法であって、最適活性を有するガイドＲＮＡを設計または調製しおよび／または野生型Ｃａｓ９よりサイズが小さいまたは長さが短いＣａｓ９酵素を選択または調製すること（これにより、かかる構築物をコードする核酸の送達ベクターへのパッケージングが、野生型Ｃａｓ９と比べて送達ベクターにおけるそのコーディングが少ないため有利である）、および／またはキメラＣａｓ９酵素を生成することを含む方法に関する。
【００１０】
また、医薬における本配列、ベクター、酵素または系の使用も提供される。また、遺伝子またはゲノム編集におけるその使用も提供される。
【００１１】
本発明のさらなる態様において、Ｃａｓ９酵素は１つ以上の突然変異を含んでもよく、機能ドメインとの融合を含む、または含まない汎用的なＤＮＡ結合タンパク質として用いられ得る。突然変異は人為的に導入された突然変異であっても、または機能獲得型もしくは機能喪失型突然変異であってもよい。突然変異には、限定はされないが、触媒ドメイン（Ｄ１０およびＨ８４０）の一つにおける突然変異が含まれ得る。さらなる突然変異が特徴付けられる。本発明の一態様では、一態様において、転写活性化ドメインはＶＰ６４であってもよい。本発明の他の態様は、限定はされないが、転写リプレッサー、リコンビナ

ーゼ、トランスポザーゼ、ヒストンリモデラー、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ、クリプトクロム、光誘導性／制御性ドメインまたは化学誘導性／制御性ドメインを含むドメインと融合している突然変異Ｃａｓ　９酵素に関する。

【００１２】

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

【００１３】

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

【００１４】

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

【００１５】

一態様において、本発明は、Ｃａｓ酵素の毒性を低下させる方法を提供する。特定の態様において、Ｃａｓ酵素は、本明細書に記載されるとおりの任意のＣａｓ９、例えば任意の天然に存在する細菌性Ｃａｓ９ならびに任意のキメラ、突然変異体、ホモログまたはオルソログである。好ましい一実施形態において、Ｃａｓ９はｍＲＮＡの形態で細胞に送達される。これにより酵素の一過性発現が可能となり、それにより毒性が低下する。別の実施形態において、本発明はまた、誘導性プロモーターの制御下でＣａｓ９を発現させる方法、およびそこで使用される構築物も提供する。

【００１６】

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

【００１７】

５’ＲｕｖＣドメインの触媒残基は、目的のＣａｓ９を他のＣａｓ９オルソログ（化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座、Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座１、Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座３、およびフランシセラ・ノビシダ（Ｆｒａｎｃｉｓｃｉｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ）ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座由来）と相同性比較することによって同定され、保存されたＡｓｐ残基をアラニンに突然変異させることにより、Ｃａｓ９が相補鎖ニッキング酵素に変換される。同様に、ＨＮＨドメインの保存されたＨｉｓおよびＡｓｎ残基をアラニンに突然変異させることにより、Ｃａｓ９が非相補鎖ニッキング酵素に変換される。

【００１８】

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素はＩ型またはＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ酵素、好ま

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

【００１９】

用語ＣａｓおよびＣＲＩＳＰＲ酵素は、特に明らかでない限り、概して本明細書では同義的に使用されることが理解されるであろう。上述のとおり、本明細書で使用される残基の付番の多くは、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座由来のＣａｓ９酵素を参照する。しかしながら、本発明が、ＳｐＣａｓ９、ＳａＣａｓ９、Ｓｔ１Ｃａｓ９など、他の微生物種由来のさらに多くのＣａｓ９を含むことは理解されるであろう。さらなる例は本明細書に提供される。

【００２０】

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

【００２１】

さらなる実施形態において、本発明は、キメラＣａｓ９タンパク質を作成することによりＣａｓ９の機能を増強する方法を提供する。これらの方法は、あるＣａｓ９ホモログのＮ末端断片を別のＣａｓ９ホモログのＣ末端断片と融合することを含み得る。これらの方法はまた、キメラタンパク質が示す新規特性の選択も可能にする。

【００２２】

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

【００２３】

一態様において、本発明は、細胞中の目的ゲノム遺伝子座中のＤＮＡ二重鎖の逆鎖上の第１および第２の標的配列の操作により生物または非ヒト生物を改変する方法において、Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列であって、（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得る第１のガイド配列、（ｂ）第１のｔｒａｃｒメイト配列、（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、（ｄ）第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、（ｅ）第２のｔｒａｃｒメイト配列、および（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列を含み得るポリヌクレオチド配列、およびＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達するステップを含み、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）および（ｆ）は５’から３’への方向に並んでいてよく、ポリヌクレオチド配列は第１のｔｒａｃｒ配列および第２のガイド配列間のリンカー配列を含み得、それにより第１のガイド配列および第２のガイド配列がタンデムであり、転写されると第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列がそれぞれ第１および第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし得、かつ第１および第２のガイド配列がそれぞれ第１および第２の標的配列に対する第１および第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、第１のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第１の標的配列にハイブリダイズされる第１のガイド配列、および（２）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第１のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み得、第２のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第２の標的配列にハイブリダイズされる第２のガイド配列、および（２）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第２のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩ

ＳＰＲ酵素を含み得、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡであり、および第１のガイド配列が第１の標的配列近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、第２のガイド配列が第２の標的配列近傍で他方の鎖の開裂を指向して二本鎖切断を誘導し、それにより生物または非ヒト生物を改変する方法を提供する。

【００２４】

本発明はまた、細胞中の目的ゲノム遺伝子座中のＤＮＡ二重鎖の逆鎖上の第１および第２の標的配列の操作により生物または非ヒト生物を改変する方法において、Ｉ．第１の調節エレメントであって、（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得る第１のガイド配列、（ｂ）第１のｔｒａｃｒメイト配列、（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、（ｄ）第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、（ｅ）第２のｔｒａｃｒメイト配列、および（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント（第１のｔｒａｃｒ配列および第２のガイド配列間にリンカー配列が存在し、それにより第１のガイド配列および第２のガイド配列がタンデムである）、およびＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ酵素コードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメントを含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達するステップを含み、成分ＩおよびＩＩは系の同じまたは異なるベクター上に局在しており、転写されると第１のｔｒａｃｒメイト配列が第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつ第１および第２のガイド配列がそれぞれ第１および第２の標的配列に対する第１および第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、第１のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第１の標的配列にハイブリダイズされる第１のガイド配列、および（２）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第１のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、第２のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第２の標的配列にハイブリダイズされる第２のガイド配列、および（２）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第２のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡであり、および第１のガイド配列が第１の標的配列近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、第２のガイド配列が第２の標的配列近傍で他方の鎖の開裂を指向して二本鎖切断を誘導し、それによりオフターゲット改変の可能性を低減させて生物または非ヒト生物を改変する方法を包含する。一部の場合において、第２のｔｒａｃｒは、第１のｔｒａｃｒメイトとハイブリダイズし得る。

【００２５】

本発明はまた、細胞中の目的ゲノム遺伝子座中のＤＮＡ二重鎖の逆鎖上の第１および第２の標的配列の操作により生物または非ヒト生物を改変するための天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物において、Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列であって、（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得る第１のガイド配列、（ｂ）第１のｔｒａｃｒメイト配列、（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、（ｄ）第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、（ｅ）第２のｔｒａｃｒメイト配列、および（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列を含むポリヌクレオチド配列、およびＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列を含み、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）および（ｆ）は５’から３’への方向に並んでいてよく、ポリヌクレオチド配列は第１のｔｒａｃｒ配列および第２のガイド配列間のリンカー配列を含み、それにより第１のガイド配列および第２のガイド配列がタンデムであり、転写されると第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列がそれぞれ第１および第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつ第１および第２のガイド配列がそれぞれ第１および第２の標的配列に対する第１および第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、第１のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第１の標的配列にハイブリダイズされる第１のガイド配列、および（２）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第１のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、第２のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第２の標的配列にハイブリダイズされる第２のガイド配列、および（２）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第２のｔｒａｃｒ

メイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡであり、および第１のガイド配列が第１の標的配列近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、第２のガイド配列が第２の標的配列近傍で他方の鎖の開裂を指向して二本鎖切断を誘導してオフターゲット改変の可能性を低減させて生物または非ヒト生物を改変する組成物を包含する。

【００２６】

本発明の方法および組成物の実施形態において、オフターゲット改変の可能性を低減させる生物または非ヒト生物の改変は、微小欠失を誘導することを含み得、微小欠失は、第１および第２の標的配列間の配列の欠失を含み得る。本発明の実施形態において、リンカー配列は、少なくとも５ヌクレオチド、または少なくとも１０ヌクレオチド、または少なくとも２０ヌクレオチドを含み得る。有利な実施形態において、リンカー配列は、８または１２ヌクレオチドを有する。他の実施形態において、第１もしくは第２のガイド配列、第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列および／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒメイト配列を改変し、改変は、最適化された第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列ならびに／または最適化された第１もしくは第２のガイド配列ならびに／または、第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列および／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒメイト配列それぞれの同時折り畳み（ｃｏ－ｆｏｌｄ）構造ならびに／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列の二次構造（ヘアピン）の安定化ならびに／または短縮された塩基対形成の領域を有する第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列ならびに／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列融合ＲＮＡエレメントを含む。

【００２７】

本発明の方法および組成物のさらなる実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列、第１および第２のガイド配列、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列または第１および第２のｔｒａｃｒ配列の一部または全部は、ＲＮＡである。本発明はまた、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする配列、第１および第２のガイド配列、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列または第１および第２のｔｒａｃｒ配列をコードするポリヌクレオチドを包含し、これらはＲＮＡであり、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃を介して送達される。さらなる実施形態において、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列は、１００％の同一性を共有し、ならびに／または第１および第２のｔｒａｃｒ配列は、１００％の同一性を共有する。好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ９酵素、例えば、ＳｐＣａｓ９である。第１のｔｒａｃｒおよび第２のｔｒａｃｒ配列間に必ずしも１００％の同一性があるとは限らない。変更された足場のほとんどは、ＤＲ／ＴｒａｃＲ配列および遠位ヘアピンの変化を有する。区別されるＤＲ／ＴＲＡＣＲ配列を有する代替足場を含むタンデムを有することも可能である。

【００２８】

別の態様において、本発明は、細胞中の目的ゲノム遺伝子座中のＤＮＡ二重鎖の逆鎖上の第１および第２の標的配列の操作により生物または非ヒト生物を改変する方法において、Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列であって、（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得る第１のガイド配列、（ｂ）第１のｔｒａｃｒメイト配列、（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、（ｄ）第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、（ｅ）第２のｔｒａｃｒメイト配列、および（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列を含むポリヌクレオチド配列、およびＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含み、１つ以上の突然変異を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達するステップを含み、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）および（ｆ）は５’から３’への方向に並んでいてよく、ポリヌクレオチド配列は第１のｔｒａｃｒ配列および第２のガイド配列間のリンカー配列を含み、それにより第１のガイド配列および第２のガイド配列がタンデムであり、転写されると第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列がそれぞれ第１および第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつ第１および第２のガイド配列がそれぞれ第１および第２の標的配列に対する第１および第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結

合を指向し、第１のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第１の標的配列にハイブリダイズされる第１のガイド配列、および（２）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第１のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、第２のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第２の標的配列にハイブリダイズされる第２のガイド配列、および（２）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第２のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡであり、および第１のガイド配列が第１の標的配列近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、第２のガイド配列が第２の標的配列近傍で他方の鎖の開裂を指向して二本鎖切断を誘導し、それにより生物または非ヒト生物を改変する方法を包含する。

【００２９】

本発明は、細胞中の目的ゲノム遺伝子座中のＤＮＡ二重鎖の逆鎖上の第１および第２の標的配列の操作により生物または非ヒト生物を改変する方法において、Ｉ．第１の調節エレメントであって、（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得る第１のガイド配列、（ｂ）第１のｔｒａｃｒメイト配列、（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、（ｄ）第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、（ｅ）第２のｔｒａｃｒメイト配列、および（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント（第１のｔｒａｃｒ配列および第２のガイド配列間にリンカー配列が存在し、それにより第１のガイド配列および第２のガイド配列がタンデムである）、およびＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ酵素コードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメントを含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達するステップを含み、成分ＩおよびＩＩは系の同じまたは異なるベクター上に局在しており、転写されると第１のｔｒａｃｒメイト配列が第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつ第１および第２のガイド配列がそれぞれ第１および第２の標的配列に対する第１および第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、第１のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第１の標的配列にハイブリダイズされる第１のガイド配列、および（２）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第１のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、第２のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第２の標的配列にハイブリダイズされる第２のガイド配列、および（２）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第２のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡであり、および第１のガイド配列が第１の標的配列近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、第２のガイド配列が第２の標的配列近傍で他方の鎖の開裂を指向して二本鎖切断を誘導し、それにより生物または非ヒト生物を改変する方法を包含する。本発明の一実施形態において、ウイルスベクターの１つ以上は、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃を介して送達される。一部の例において、第２のｔｒａｃｒは、第１のｔｒａｃｒメイトとハイブリダイズし得る。

【００３０】

本発明はまた、細胞中の目的ゲノム遺伝子座中のＤＮＡ二重鎖の逆鎖上の第１および第２の標的配列の操作により生物または非ヒト生物を改変する天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物において、Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列であって、（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得る第１のガイド配列、（ｂ）第１のｔｒａｃｒメイト配列、（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列、（ｄ）第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、（ｅ）第２のｔｒａｃｒメイト配列、および（ｆ）第２のｔｒａｃｒ配列を含むポリヌクレオチド配列、およびＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含み、１つ以上の突然変異を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列を含み、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）および（ｆ）は５’から３’への方向に並んでいてよく、ポリヌクレオチド配列は第１のｔｒａｃｒ配列および第２のガイド配列間のリンカー配列を含み、それにより第１のガイド配列および第２のガイド配列がタンデムであり、転写されると第１および第２のｔ

ｒａｃｒメイト配列がそれぞれ第１および第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつ第１および第２のガイド配列がそれぞれ第１および第２の標的配列に対する第１および第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、第１のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第１の標的配列にハイブリダイズされる第１のガイド配列、および（２）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第１のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、第２のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第２の標的配列にハイブリダイズされる第２のガイド配列、および（２）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第２のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡであり、第１のガイド配列が第１の標的配列近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、第２のガイド配列が第２の標的配列近傍で他方の鎖の開裂を指向して二本鎖切断を誘導して生物または非ヒト生物を改変する組成物を包含する。

【００３１】

本発明の方法および組成物の実施形態において、第１の標的配列近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向する第１のガイド配列および第２の標的配列近傍で他方の鎖の開裂を指向する第２のガイド配列は、５’オーバーハングをもたらす。一部の実施形態において、５’オーバーハングは、高々２００塩基対、または高々１００塩基対、または高々５０塩基対、または少なくとも２６塩基対または少なくとも３０塩基対である。好ましい実施形態において、５’オーバーハングは、３４～５０塩基対である。本発明は、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列、第１および第２のガイド配列、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列または第１および第２のｔｒａｃｒ配列の一部または全部を包含し、これらはＲＮＡである。本発明の実施形態において、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列は、１００％の同一性を共有し、ならびに／または第１および／または第２のｔｒａｃｒ配列は、１００％の同一性を共有する。第１のｔｒａｃｒおよび第２のｔｒａｃｒ配列間に必ずしも１００％の同一性があるとは限らない。変更された足場のほとんどは、ＤＲ／ＴｒａｃＲ配列および遠位ヘアピンの変化を有する。区別されるＤＲ／ＴＲＡＣＲ配列を有する代替足場を含むタンデムを有することも可能である。好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ９酵素、例えば、ＳｐＣａｓ９である。さらなる実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、触媒ドメイン中の１つ以上の突然変異を含み、１つ以上の突然変異は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される。好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｄ１０Ａ突然変異を有する。さらに別の実施形態において、改変は、最適化された第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列ならびに／または最適化された第１もしくは第２のガイド配列ならびに／または、第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列および／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒメイト配列それぞれの同時折り畳み構造ならびに／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列の二次構造（ヘアピン）の安定化ならびに／または短縮された塩基対形成の領域を有する第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列ならびに／または第１もしくは第２のｔｒａｃｒ配列融合ＲＮＡエレメントを含む。本発明の実施形態において、リンカー配列は、少なくとも５ヌクレオチド、または少なくとも１０ヌクレオチドまたは少なくとも２０ヌクレオチドを含み得る。有利な実施形態において、リンカー配列は、８または１２ヌクレオチドを有する。

【００３２】

本発明の方法および組成物の他の態様において、３つ以上のガイド配列がタンデムで存在し得る。用語「タンデム単一ガイドＲＮＡ」または「ｔｓｇＲＮＡ」は、１つ以上のリンカー配列により連結された１つ以上の単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を指すために使用される。好ましい実施形態において、２つのガイド配列は、ポリヌクレオチド配列中でタンデムである。本発明の重要な態様は、２つ以上のガイドＲＮＡの発現をドライブするための単一プロモーターまたは作動可能なエレメントの利用である。

【００３３】

一態様において、本発明は、

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

【００３４】
ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列、ガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列またはｔｒａｃｒ配列の一部または全部は、ＲＮＡであり得る。ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする配列、ガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列またはｔｒａｃｒ配列をコードするポリヌクレオチドは、ＲＮＡであり得、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃を介して送達される。

【００３５】
ＲＮＡであるポリヌクレオチドが参照され、特徴部、例えば、ｔｒａｃｒメイト配列を「含む」と記載される場合、ＲＮＡ配列は、その特徴部を含むことが認識される。ポリヌクレオチドがＤＮＡであり、特徴部、例えば、ｔｒａｃｒメイト配列を含むと記載される場合、ＤＮＡ配列は、当該特徴部のＲＮＡに転写され、または転写され得る。特徴部が、タンパク質、例えば、ＣＲＩＳＰＲ酵素である場合、ＤＮＡまたはＲＮＡ配列は、翻訳され、または翻訳され得ると称される（および最初に転写されるＤＮＡの場合）。

【００３６】
従って、特定の実施形態において本発明は、例えばヒトもしくは非ヒト哺乳動物もしくは生物を含む哺乳動物を含めた生物を、目的のゲノム遺伝子座における標的配列の操作によって改変する方法を提供し、この方法は、組成物を発現させるためその組成物を作動可能にコードする１つ以上のウイルスまたはプラスミドベクターを含むウイルスまたはプラスミドベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達す

るステップを含み、組成物は、
（Ａ）Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメントであって、ポリヌクレオチド配列が（ａ）真核細胞における標的配列とのハイブリダイズ能を有するガイド配列、（ｂ）ｔｒａｃｒメイト配列、および（ｃ）ｔｒａｃｒ配列を含む、第１の調節エレメント、およびＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列（または場合により、一部の実施形態はＮＬＳが関与しないこともあるため、少なくとも１つ以上の核局在化配列）を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント［（ａ）、（ｂ）および（ｃ）は５’から３’配向で配置されており、成分ＩおよびＩＩは系の同じまたは異なるベクター上にあり、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、およびＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物、または
（Ｂ）Ｉ．（ａ）原核細胞における標的配列とのハイブリダイズ能を有するガイド配列、および（ｂ）少なくとも１つ以上のｔｒａｃｒメイト配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、ＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント、およびＩＩＩ．ｔｒａｃｒ配列に作動可能に結合している第３の調節エレメント［成分Ｉ、ＩＩおよびＩＩＩは系の同じまたは異なるベクター上にあり、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、およびＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を含む。一態様において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は触媒ドメインの一つに１つ以上の突然変異を含む。

【００３７】

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

【００３８】

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

【００３９】

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

【００４０】

ある実施形態において、本発明は、目的ゲノム遺伝子座中の標的配列の異常により引き

起こされる病態の治療または阻害が必要とされる対象（例えば、哺乳動物またはヒト）または非ヒト対象（例えば、哺乳動物）中の目的ゲノム遺伝子座中の標的配列の異常により引き起こされる病態を治療または阻害する方法において、標的配列の操作により対象または非ヒト対象を改変するステップを含み、病態は、組成物をその発現のために作動可能にコードすることを含む１つ以上のＡＡＶベクターを含むＡＡＶベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達することを含む治療を提供するステップを含む標的配列の操作による治療または阻害に感受性であり、組成物が発現された場合に組成物により標的配列を操作し、組成物は、（Ａ）天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物において、Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント（ポリヌクレオチド配列は、（ａ）真核細胞中の標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、（ｂ）ｔｒａｃｒメイト配列、および（ｃ）ｔｒａｃｒ配列を含む）、およびＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列（または場合により、少なくとも１つ以上の核局在化配列、それというのも、一部の実施形態はＮＬＳを含み得ないため）を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメントを含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含み、（ａ）、（ｂ）および（ｃ）は５’から３’への方向に並んでいてよく、成分ＩおよびＩＩは系の同じまたは異なるベクター上に局在しており、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列がそれぞれ標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、ＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされるｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む組成物、または（Ｂ）天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物において、Ｉ．第１の調節エレメントであって、（ａ）原核細胞中の標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、および（ｂ）少なくとも１つ以上のｔｒａｃｒメイト配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、ＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント、およびＩＩＩ．ｔｒａｃｒ配列に作動可能に結合している第３の調節エレメントを含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含み、成分Ｉ、ＩＩ、およびＩＩＩは系の同じまたは異なるベクター上に局在しており、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列がそれぞれ標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、ＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズされるガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされるｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む組成物を含む方法を提供する。

【００４１】

本発明の一部の方法は、発現を誘導することを含み得る。本発明の一部の方法において、生物または対象は、真核生物（例として、哺乳動物、例として、ヒト）または非ヒト真核生物または非ヒト動物または非ヒト哺乳動物である。本発明の一部の方法において、生物または対象は、植物である。本発明の一部の方法において、生物または対象は、哺乳動物または非ヒト哺乳動物である。本発明の一部の方法において、生物または対象は、藻類である。本発明の一部の方法において、ウイルスベクターは、ＡＡＶである。本発明の一部の方法において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ９である。本発明の一部の方法において、ガイド配列の発現は、Ｔ７プロモーターの制御下にあり、それは、Ｔ７ポリメラーゼの発現によりドライブされる。

【００４２】

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

【００４３】

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

【００４４】

特定の実施形態において、本発明は、必要としている対象または非ヒト対象における目的のゲノム遺伝子座の標的配列の欠陥によって引き起こされる病態を治療または阻害する方法を提供し、この方法は、標的配列の操作によって対象または非ヒト対象を改変するステップを含み、ここで病態は、組成物を発現させるためその組成物を作動可能にコードするステップを含む１つ以上のＡＡＶベクターを含むＡＡＶベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達するステップを含む治療を提供することを含む標的配列の操作による治療または阻害に感受性があり、標的配列は発現時の組成物によって操作され、組成物は以下を含む：

（Ａ）Ｉ．ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメントであって、ポリヌクレオチド配列が、（ａ）真核細胞における標的配列とのハイブリダイズ能を有するガイド配列、（ｂ）ｔｒａｃｒメイト配列、および（ｃ）ｔｒａｃｒ配列を含む、第１の調節エレメント、およびＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列（または場合により、一部の実施形態はＮＬＳが関与しないこともあるため、少なくとも１つ以上の核局在化配列）を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント［（ａ）、（ｂ）および（ｃ）は５’から３’配向で配置されており、成分ＩおよびＩＩは系の同じまたは異なるベクター上にあり、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、およびＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物、または

（Ｂ）Ｉ．（ａ）原核細胞における標的配列とのハイブリダイズ能を有するガイド配列、および（ｂ）少なくとも１つ以上のｔｒａｃｒメイト配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、ＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント、およびＩＩＩ．ｔｒａｃｒ配列に作動可能に結合している第３の調節エレメント［成分Ｉ、ＩＩおよびＩＩＩは系の同じまたは異なるベクター上にあり、転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、およびＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物。

【００４５】

本発明の一部の方法は、発現を誘導することを含み得る。本発明の一部の方法において、生物または対象は、真核生物または非ヒト真核生物または非ヒト動物である。本発明の一部の方法において、生物または対象は、植物である。本発明の一部の方法において、生物または対象は、哺乳動物または非ヒト動物である。本発明の一部の方法において、生物または対象は、藻類である。本発明の一部の方法において、ウイルスベクターは、ＡＡＶである。本発明の一部の方法において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ９である。本発明の一部の方法において、ガイド配列の発現は、Ｔ７プロモーターの制御下にあり、それは、Ｔ７ポリメラーゼの発現によりドライブされる。

【００４６】
一部の実施形態における本発明は、ＣＲＩＳＰＲ酵素を送達する方法を包含し、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡを細胞に送達することを含む。これらの方法の一部においてＣＲＩＳＰＲ酵素はＣａｓ９である。
【００４７】
一部の実施形態における本発明は、本発明のＡＡＶを調製する方法を包含し、この方法は、ＡＡＶをコードする１つまたは複数の核酸分子を含有するまたはそれから本質的になるプラスミドをＡＡＶ感染細胞に形質移入すること、およびＡＡＶの複製およびパッケージングに必須のＡＡＶ　ｒｅｐおよび／またはｃａｐを供給することを含む。一部の実施形態では、ＡＡＶの複製およびパッケージングに必須のＡＡＶ　ｒｅｐおよび／またはｃａｐは、細胞に１つまたは複数のヘルパープラスミドまたは１つまたは複数のヘルパーウイルスを形質移入することにより供給される。一部の実施形態ではヘルパーウイルスはポックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはバキュロウイルスである。
【００４８】
植物では、病原体は多くの場合に宿主特異的である。例えば、フザリウム・オキシスポラム・ｆ・エスピー・リコペルシシ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ　ｆ．ｓｐ．ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｉ）はトマト萎凋病を引き起こすが、攻撃するのはトマトのみであり、Ｆ．オキシスポラム・ｆ・ジアンチ（Ｆ．ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ　ｆ．ｄｉａｎｔｈｉｉ）、プクシニア・グラミニス・ｆ・エスピー・トリチシ（Ｐｕｃｃｉｎｉａ　ｇｒａｍｉｎｉｓ　ｆ．ｓｐ．ｔｒｉｔｉｃｉ）はコムギのみを攻撃する。植物は既存の誘導防御を有して多くの病原体に抵抗する。特に病原体が植物より高い頻度で複製することに伴い、植物世代間での突然変異および組換えイベントが、感受性を生じさせる遺伝的変異性をもたらす。植物には非宿主抵抗性が存在することもあり、例えばその宿主と病原体とが適合しない。また、水平抵抗性、例えば、典型的には多くの遺伝子によって制御される、あらゆる病原体系統に対する部分抵抗性、および垂直抵抗性、例えば、典型的には数個の遺伝子によって制御される、他の系統に対しては存在しない、一部の病原体系統に対する完全抵抗性も存在し得る。遺伝子対遺伝子レベルでは、植物と病原体とは共に進化し、一方の遺伝的変化が他方の変化と均衡する。従って、育種家は自然変異性を用いて、収穫量、品質、均一性、耐寒性、抵抗性に関して最も有用な遺伝子をかけ合わせる。抵抗性遺伝子の供給源には、天然または外来品種、在来品種、野生植物の近縁種、および誘発突然変異（例えば突然変異誘発物質による植物材料の処理）が含まれる。本発明を用いることで、突然変異を誘発する新規の手段が植物育種家に提供される。従って、当業者は抵抗性遺伝子の供給源のゲノムを分析し、かつ所望の特性または形質を有する品種において本発明を用いることにより、これまでの突然変異誘発物質より高い精度で抵抗性遺伝子の産生を誘発し、ひいては植物育種プログラムを加速させ、および改善することができる。
【００４９】
本発明は、医療において使用される本発明の組成物またはそのＣＲＩＳＰＲ酵素（例として、または代替的にＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡ）をさらに包含する。一部の実施形態において、本発明は、本発明による方法において使用される本発明による組成物またはそのＣＲＩＳＰＲ酵素（例として、または代替的にＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡ）を包含する。一部の実施形態において、本発明は、エクスビボ遺伝子またはゲノム編集における本発明の組成物またはそのＣＲＩＳＰＲ酵素（例として、または代替的にＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡ）の使用を提供する。ある実施形態において、本発明は、エクスビボ遺伝子またはゲノム編集のための、または本発明による方法における使用のための医薬品の製造における、本発明の組成物またはそのＣＲＩＳＰＲ酵素（例として、または代替的にＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡ）の使用を包含する。本発明は、一部の実施形態において、特に、Ｃａｓ９が、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）または黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９である（またはそれに由来する）場合、標的配列が５’モチーフ（Ｎは、任意のヌクレオチドである）によりその３’末端においてフランキングされている本発明の組成物またはそのＣＲＩＳＰＲ酵素（

例として、または代替的にＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするｍＲＮＡ）を包含する。例えば、好適なＰＡＭは、それぞれ、以下に挙げられるとおり、ＳｐＣａｓ９またはＳａＣａｓ９酵素（または由来酵素）について５’－ＮＲＧまたは５’－ＮＮＧＲＲである。

【００５０】

ＳｐＣａｓ９またはＳａＣａｓ９は、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）または黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９からのものまたはそれらに由来することが認識される。

【００５１】

本発明の態様は、ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えば、Ｃａｓ９媒介遺伝子標的化の特異性を改善し、ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えば、Ｃａｓ９によるオフターゲット改変の可能性を低減させることを包含する。本発明は、一部の実施形態において、細胞中の目的ゲノム遺伝子座中のＤＮＡ二重鎖の逆鎖上の第１および第２の標的配列の操作によりオフターゲット改変の可能性を低減させて生物または非ヒト生物を改変する方法において、

Ｉ．第１のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系キメラｃＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）ポリヌクレオチド配列であって、

（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得る第１のガイド配列、

（ｂ）第１のｔｒａｃｒメイト配列、および

（ｃ）第１のｔｒａｃｒ配列

を含む第１のポリヌクレオチド配列、

ＩＩ．第２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ｃｈｉＲＮＡポリヌクレオチド配列であって、

（ａ）第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、

（ｂ）第２のｔｒａｃｒメイト配列、および

（ｃ）第２のｔｒａｃｒ配列

を含む第２のポリヌクレオチド配列、および

ＩＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含み、かつ１つ以上の突然変異を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列

を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達するステップを含み、（ａ）、（ｂ）および（ｃ）は５’から３’配向で配置されており、転写されると第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列がそれぞれ第１および第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつ第１および第２のガイド配列がそれぞれ第１および第２の標的配列に対する第１および第２のＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、第１のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第１の標的配列にハイブリダイズされる第１のガイド配列、および（２）第１のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第１のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、第２のＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）第２の標的配列にハイブリダイズされる第２のガイド配列、および（２）第２のｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされる第２のｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列がＤＮＡまたはＲＮＡであり、第１のガイド配列が第１の標的配列近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、かつ第２のガイド配列が第２の標的配列近傍で他方の鎖の開裂を指向して二本鎖切断を誘導し、それによりオフターゲット改変の可能性を低減させて生物または非ヒト生物を改変する方法を包含する。

【００５２】

本発明の一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列、第１および第２のガイド配列、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列または第１および第２のｔｒａｃｒ配列の一部または全部は、ＲＮＡである。本発明のさらなる実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする配列、第１および第２のガイド配列、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列または第１および第２のｔｒａｃｒ配列をコードするポリヌクレオチドは、ＲＮＡであり、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃を介して送達される。本発明のある実施形態において、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列は、１００％の同一性を共有し、ならびに／または第１および第２のｔｒａｃｒ配列

は、１００％の同一性を共有する。第１のｔｒａｃｒおよび第２のｔｒａｃｒ配列間に必ずしも１００％の同一性があるとは限らない。変更された足場のほとんどは、ＤＲ／ＴｒａｃＲ配列および遠位ヘアピンの変化を有する。区別されるＤＲ／ＴＲＡＣＲ配列を有する代替足場を含むタンデムを有することも可能である。本発明の好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ９酵素、例えば、ＳｐＣａｓ９である。本発明の一態様において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、触媒ドメイン中の１つ以上の突然変異を含み、１つ以上の突然変異は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される。高度に好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｄ１０Ａ突然変異を有する。

【００５３】

本発明の好ましい方法において、第１の標的配列近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向する第１のガイド配列および、第２の標的配列近傍で他方の鎖の開裂を指向する第２のガイド配列は、５’オーバーハングをもたらす。本発明の実施形態において、５’オーバーハングは、高々２００塩基対、好ましくは、高々１００塩基対、またはより好ましくは、高々５０塩基対である。本発明の実施形態において、５’オーバーハングは、少なくとも２６塩基対、好ましくは、少なくとも３０塩基対または好ましくは、３４～５０塩基対である。

【００５４】

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

Ｉ．以下に作動可能に結合している第１の調節エレメント

（ａ）第１の標的配列にハイブリダイズし得る第１のガイド配列、および

（ｂ）少なくとも１つ以上のｔｒａｃｒメイト配列、

ＩＩ．以下に作動可能に結合している第２の調節エレメント

（ａ）第２の標的配列にハイブリダイズし得る第２のガイド配列、および

（ｂ）少なくとも１つ以上のｔｒａｃｒメイト配列、

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

ＩＶ．ｔｒａｃｒ配列に作動可能に結合している第４の調節エレメント、

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

【００５５】

本発明の一部の方法において、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードするポリヌクレオチド配列、第１および第２のガイド配列、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列または第１および第２のｔｒａｃｒ配列の一部または全部は、ＲＮＡである。本発明のさらなる実施形態において、第１および第２のｔｒａｃｒメイト配列は、１００％の同一性を共有し、ならび

に／または第１および第２のｔｒａｃｒ配列は、１００％の同一性を共有する。第１のｔｒａｃｒおよび第２のｔｒａｃｒ配列間に必ずしも１００％の同一性があるとは限らない。変更された足場のほとんどは、ＤＲ／ＴｒａｃＲ配列および遠位ヘアピンの変化を有する。区別されるＤＲ／ＴＲＡＣＲ配列を有する代替足場を含むタンデムを有することも可能である。本発明の好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ９酵素、例えば、ＳｐＣａｓ９である。本発明の一態様において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、触媒ドメイン中の１つ以上の突然変異を含み、１つ以上の突然変異は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される。高度に好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｄ１０Ａ突然変異を有する。本発明のさらなる実施形態において、ウイルスベクターの１つ以上は、ナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃によって送達される。

【００５６】

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

【００５７】

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

【００５８】

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

【００５９】

本発明の実施形態はまた、ｔｒａｃｒメイト配列およびｔｒａｃｒ配列に融合したガイド配列を含むガイドＲＮＡも包含する。本発明の態様において、Ｃａｓタンパク質は真核細胞での発現にコドン最適化され、ここで真核細胞は哺乳類細胞またはヒト細胞であってもよい。本発明のさらなる実施形態において、Ｃａｓタンパク質はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、例えばＣａｓ　９タンパク質である。極めて好ましい実施形態において、Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９タンパク質、例えばＳｐＣａｓ９である。本発明の態様では、Ｃａｓタンパク質は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される１つ以上の突然変異を有する。極めて好ましい実施形態において、Ｃａｓタンパク質はＤ１０Ａ突然変異を有する。

【００６０】

本発明の態様は、遺伝子産物の発現を低下させること、または遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子にテンプレートポリヌクレオチドがさらに導入されること、または２つの５’または３’オーバーハングをリアニーリングおよびライゲートさせることにより介在配列

が正確に切り出されること、または遺伝子産物の活性または機能を変化させること、または遺伝子産物の発現を増加させることに関する。本発明のある実施形態において、遺伝子産物はタンパク質である。

【００６１】

本発明はまた、１つ以上の突然変異を有するＣａｓタンパク質と、細胞中の遺伝子産物をコードする二本鎖ＤＮＡ分子のそれぞれ第１の鎖および第２の鎖を標的にする２つのガイドＲＮＡとを含むエンジニアリングされた天然に存在しないＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系であって、それによりガイドＲＮＡが、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を標的にし、かつＣａｓタンパク質が、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子の第１の鎖および第２の鎖の各々にニックを入れ、それにより遺伝子産物の発現が変化し；および、Ｃａｓタンパク質と２つのガイドＲＮＡとが天然で一緒に存在することはない、系も包含する。

【００６２】

本発明の態様では、ガイドＲＮＡは、ｔｒａｃｒメイト配列およびｔｒａｃｒ配列に融合したガイド配列を含み得る。本発明の実施形態において、Ｃａｓタンパク質はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質である。本発明の態様において、Ｃａｓタンパク質は真核細胞での発現にコドン最適化されており、ここで真核細胞は哺乳類細胞またはヒト細胞であってもよい。本発明のさらなる実施形態において、Ｃａｓタンパク質はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、例えばＣａｓ　９タンパク質である。極めて好ましい実施形態において、Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９タンパク質、例えばＳｐＣａｓ９である。本発明の態様では、Ｃａｓタンパク質は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからなる群から選択される１つ以上の突然変異を有する。極めて好ましい実施形態において、Ｃａｓタンパク質はＤ１０Ａ突然変異を有する。

【００６３】

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

【００６４】

本発明はまた、以下を含む１つ以上のベクターを含むエンジニアリングされた天然に存在しないベクター系も包含する：

ａ）遺伝子産物をコードする二本鎖ＤＮＡ分子のそれぞれ第１の鎖および第２の鎖を標的にする２つのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系ガイドＲＮＡの各々に作動可能に結合している第１の調節エレメント、

ｂ）Ｃａｓタンパク質に作動可能に結合している第２の調節エレメント

ここで成分（ａ）および（ｂ）は系の同じまたは異なるベクター上にあり、それによりガイドＲＮＡが、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を標的にし、かつＣａｓタンパク質が、遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子の第１の鎖および第２の鎖の各々にニックを入れ、それにより遺伝子産物の発現が変化し；および、Ｃａｓタンパク質と２つのガイドＲＮＡとが天然で一緒に存在することはない。

【００６５】

本発明の態様ではガイドＲＮＡは、ｔｒａｃｒメイト配列およびｔｒａｃｒ配列に融合したガイド配列を含み得る。本発明のある実施形態においてＣａｓタンパク質はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質である。本発明の態様においてＣａｓタンパク質は、哺乳類細胞またはヒト細胞であり得る真核細胞での発現にコドンが最適化される。本発明のさらなる実施形態においてＣａｓタンパク質はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、例えばＣａｓ９タンパク質である。極めて好ましい実施形態においてＣａｓタンパク質はＣａｓ９タンパク質、例えばＳｐＣａｓ９である。本発明の態様では、Ｃａｓタンパク質は、Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡおよびＤ９８６Ａからな

る群から選択される１つ以上の突然変異を有する。極めて好ましい実施形態において、Ｃａｓタンパク質はＤ１０Ａ突然変異を有する。

【００６６】

本発明の態様は、遺伝子産物の発現を低下させること、または遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子にテンプレートポリヌクレオチドがさらに導入されること、または２つの５’オーバーハングをリアニーリングおよびライゲートさせることにより介在配列が正確に切り出されること、または遺伝子産物の活性または機能を変化させること、または遺伝子産物の発現を増加させることに関する。本発明のある実施形態において、遺伝子産物はタンパク質である。本発明の好ましい実施形態において系のベクターはウイルスベクターである。さらなる実施形態において、系のベクターはナノ粒子、エキソソーム、微小胞、または遺伝子銃によって送達される。

【００６７】

一態様において、本発明は、真核細胞中の標的ポリヌクレオチドを改変する方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ、それにより標的ポリヌクレオチドを改変することを含み、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、前記ガイド配列は、次いでｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列に結合している。一部の実施形態において、前記開裂は、前記ＣＲＩＳＰＲ酵素により標的配列の局在における１つまたは２つの鎖を開裂することを含む。一部の実施形態において、前記開裂は、標的遺伝子の転写の減少をもたらす。一部の実施形態において、方法は、外因性テンプレートポリヌクレオチドとの相同組換えにより前記開裂標的ポリヌクレオチドを修復することをさらに含み、前記修復は、前記標的ポリヌクレオチドの１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含む突然変異をもたらす。一部の実施形態において、前記突然変異は、標的配列を含む遺伝子から発現されるタンパク質中の１つ以上のアミノ酸変化をもたらす。一部の実施形態において、方法は、１つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含み、１つ以上のベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ｔｒａｃｒメイト配列に結合しているガイド配列、およびｔｒａｃｒ配列の１つ以上の発現をドライブする。一部の実施形態において、前記ベクターを対象中の真核細胞中に送達する。一部の実施形態において、前記改変を、細胞培養物中の前記真核細胞中で行う。一部の実施形態において、方法は、前記改変前に前記真核細胞を対象から単離することをさらに含む。一部の実施形態において、方法は、前記真核細胞および／またはそれに由来する細胞を前記対象に戻すことをさらに含む。

【００６８】

一態様において、本発明は、真核細胞中のポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、ＣＲＩＳＰＲ複合体をポリヌクレオチドに結合させ、その結果、前記結合が前記ポリヌクレオチドの発現の増加または減少をもたらすことを含み；ＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされるガイド配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、前記ガイド配列は、次いでｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列に結合している。一部の実施形態において、方法は、１つ以上のベクターを前記真核細胞に送達することをさらに含み、１つ以上のベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ｔｒａｃｒメイト配列に結合しているガイド配列、およびｔｒａｃｒ配列の１つ以上の発現をドライブする。

【００６９】

一態様において、本発明は、突然変異疾患遺伝子を含むモデル真核細胞を生成する方法を提供する。一部の実施形態において、疾患遺伝子は、疾患を有し、または発症するリスクの増加に関連する任意の遺伝子である。一部の実施形態において、方法は、（ａ）１つ以上のベクターを真核細胞に導入すること（１つ以上のベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ｔｒａｃｒメイト配列に結合しているガイド配列、およびｔｒａｃｒ配列の１つ以上の発現をドライブする）および（ｂ）ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させ

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

【００７０】

一態様において、本発明は、１つ以上の原核細胞中の遺伝子中の１つ以上の突然変異を導入することにより１つ以上の原核細胞を選択する方法であって、１つ以上のベクターを原核細胞中に導入すること（１つ以上のベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ｔｒａｃｒメイト配列に結合しているガイド配列、ｔｒａｃｒ配列、および編集テンプレートの１つ以上の発現をドライブし；編集テンプレートは、ＣＲＩＳＰＲ酵素開裂を停止させる１つ以上の突然変異を含む）；編集テンプレートと、選択すべき細胞中の標的ポリヌクレオチドとを相同組換えさせること；ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記遺伝子内の標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ（ＣＲＩＳＰＲ複合体は、（１）標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、標的ポリヌクレオチドへのＣＲＩＳＰＲ複合体の結合は、細胞死を誘導する）、それにより、１つ以上の突然変異が導入された１つ以上の原核細胞の選択を可能とすることを含む方法を提供する。好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、Ｃａｓ９である。本発明の一態様において、選択される細胞は真核細胞であり得る。本発明の態様により、選択マーカーもカウンターセレクション系を含み得る２ステッププロセスも要求しない規定の細胞の選択が可能となる。

【００７１】

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

【００７２】

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

【００７３】

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

イド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む。

【００７４】

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

【００７５】

特定の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、１つ以上の突然変異Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡまたはＤ９８６Ａを含み、および／または１つ以上の突然変異はＣＲＩＳＰＲ酵素のＲｕｖＣ１またはＨＮＨドメインにあるか、または他に本明細書で考察するとおりの突然変異である。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は触媒ドメインに１つ以上の突然変異を有し、ここで転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列に対するＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、および酵素は機能ドメインをさらに含む。一部の実施形態では、転写活性化ドメインはＶＰ６４である。一部の実施形態では、転写抑制ドメインはＫＲＡＢである。一部の実施形態では、転写抑制ドメインはＳＩＤ、またはＳＩＤのコンカテマー（すなわちＳＩＤ４Ｘ）である。一部の実施形態では、後成的改変酵素が提供される。一部の実施形態では、活性化ドメインが提供され、それはＰ６５活性化ドメインであってもよい。

【００７６】

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

【００７７】

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

【００７８】

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

【００７９】

好ましくは、送達はベクターの形態であり、ベクターはレンチウイルスまたはバキュロウイルスまたは好ましくはアデノウイルス／アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターであってもよいが、他の送達手段が公知であり（酵母系、微小胞、遺伝子銃／ベクターを金ナノ粒子と結合させる手段など）、および提供される。ベクターは、ウイルス系または酵母系（例えば、ここでは目的の核酸がプロモーターに作動可能に連結されかつ

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

【００８０】

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

【００８１】

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

【００８２】

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

【００８３】

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

【００８４】

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

【００８５】

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

【００８６】

本発明の新規特徴を、特に添付の特許請求の範囲を用いて記載する。本発明の特徴および利点のより良好な理解は、本発明の原理が利用される説明的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、および付属の図面を参照することにより得られる。

【図面の簡単な説明】
【００８７】
【図１】ＣＲＩＳＰＲ系の模式的モデルを示す。化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）からのＣａｓ９ヌクレアーゼ（黄色）を、２０ｎｔガイド配列（青色）および足場（赤色）からなる合成ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）によりゲノムＤＮＡにターゲティングする。必要な５’－ＮＧＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ；マゼンタ）のすぐ上流のＤＮＡ標的（青色）とのガイド配列塩基対、およびＣａｓ９は、ＰＡＭの約３ｂｐ上流の二本鎖切断（ＤＳＢ）（赤色三角）を媒介する。
【図２Ａ】図２Ａ～図２Ｆは、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣａｓ９の開裂特異性を評価するため実施したアッセイの概略図を示す。ガイドＲＮＡ配列と標的ＤＮＡとの間の単一塩基対ミスマッチが％単位の開裂効率に対してマッピングされる。
【図２Ｂ】図２Ａ～図２Ｆは、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣａｓ９の開裂特異性を評価するため実施したアッセイの概略図を示す。ガイドＲＮＡ配列と標的ＤＮＡとの間の単一塩基対ミスマッチが％単位の開裂効率に対してマッピングされる。
【図２Ｃ】図２Ａ～図２Ｆは、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣａｓ９の開裂特異性を評価するため実施したアッセイの概略図を示す。ガイドＲＮＡ配列と標的ＤＮＡとの間の単一塩基対ミスマッチが％単位の開裂効率に対してマッピングされる。
【図２Ｄ】図２Ａ～図２Ｆは、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣａｓ９の開裂特異性を評価するため実施したアッセイの概略図を示す。ガイドＲＮＡ配列と標的ＤＮＡとの間の単一塩基対ミスマッチが％単位の開裂効率に対してマッピングされる。
【図２Ｅ－Ｆ】図２Ａ～図２Ｆは、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来のＣａｓ９の開裂特異性を評価するため実施したアッセイの概略図を示す。ガイドＲＮＡ配列と標的ＤＮＡとの間の単一塩基対ミスマッチが％単位の開裂効率に対してマッピングされる。
【図３Ａ】図３Ａ～図３Ｆは、Ｃａｓ遺伝子の円形系統樹である
【図３Ｂ】図３Ａ～図３Ｆは、Ｃａｓ遺伝子の円形系統樹である
【図３Ｃ】図３Ａ～図３Ｆは、Ｃａｓ遺伝子の円形系統樹である
【図３Ｄ】図３Ａ～図３Ｆは、Ｃａｓ遺伝子の円形系統樹である
【図４Ａ】図４Ａ～図４Ｆは、大きいＣａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つのグループと小さいＣａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つのグループとを含む５つのＣａｓ９ファミリーを明らかにする線状系統発生解析を示す。
【図４Ｂ】図４Ａ～図４Ｆは、大きいＣａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つのグループと小さいＣａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つのグループとを含む５つのＣａｓ９ファミリーを明らかにする線状系統発生解析を示す。
【図４Ｃ】図４Ａ～図４Ｆは、大きいＣａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つのグループと小さいＣａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つのグループとを含む５つのＣａｓ９ファミリーを明らかにする線状系統発生解析を示す。
【図４Ｄ】図４Ａ～図４Ｆは、大きいＣａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つのグループと小さいＣａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つのグループとを含む５つのＣａｓ９ファミリーを明らかにする線状系統発生解析を示す。
【図４Ｅ】図４Ａ～図４Ｆは、大きいＣａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つのグループと小さいＣａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つのグループとを含む５つのＣａｓ９ファミリーを明らかにする線状系統発生解析を示す。
【図４Ｆ】図４Ａ～図４Ｆは、大きいＣａｓ９（約１４００アミノ酸）の３つのグループと小さいＣａｓ９（約１１００アミノ酸）の２つのグループとを含む５つのＣａｓ９ファミリーを明らかにする線状系統発生解析を示す。

【図５】Ｃａｓ９オルソログの長さ分布を表すグラフを示す。
【図６Ａ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｂ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｃ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｄ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｅ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｆ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｇ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｈ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｉ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｊ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｋ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｌ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図６Ｍ】図６Ａ～図６Ｍは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内に位置する配列を示す。
【図７Ａ】条件的Ｃａｓ９、Ｒｏｓａ２６ターゲティングベクターマップを示す。
【図７Ｂ】構成的Ｃａｓ９、Ｒｏｓａ２６ターゲティングベクターマップを示す。
【図８】構成的および条件的Ｃａｓ９構築物における重要なエレメントの略図を示す。
【図９】送達およびインビボマウス脳Ｃａｓ９発現データを示す。
【図１０】細胞へのＣａｓ９およびキメラＲＮＡのＲＮＡ送達を示す（Ａ）ニューロ２Ａ細胞へのＤＮＡまたはｍＲＮＡのいずれかとしてのＧＦＰレポーターの送達。（Ｂ）Ｃａｓ９およびキメラＲＮＡをＲＮＡとしてＩｃａｍ２遺伝子に対して送達すると、試験した２つのスペーサーのうちの一方に開裂が生じる。（Ｃ）Ｃａｓ９およびキメラＲＮＡをＲＮＡとしてＦ７遺伝子に対して送達すると、試験した２つのスペーサーのうちの一方に開裂が生じる。
【図１１】ＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）修復が遺伝子編集をいかに促進するかを示す。エラープローン非相同末端結合（ＮＨＥＪ）経路において、ＤＳＢの末端は内因性ＤＮＡ修復機構によりプロセシングされ、一緒に再結合し、このことは接合部位におけるランダム挿入／欠失（インデル）突然変異をもたらし得る。遺伝子のコード領域内で生じるインデル突然変異は、フレームシフトおよび早期終止コドンをもたらし得、遺伝子ノックアウトをもたらす。あるいは、プラスミドまたは一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）の形態の修復テンプレートを供給して高いフィデリティおよび正確な編集を可能とする相同性組換え修復（ＨＤＲ）経路を活用することができる。
【図１２】図１２Ａ～図１２Ｃは、ＨＥＫおよびＨＵＥＳ９細胞でのＨＤＲについて予想される結果を示す。（ａ）相同性アームを有するターゲティングプラスミドまたはｓｓＯＤＮ（センスまたはアンチセンス）のいずれかを使用して、Ｃａｓ９により開裂される標的ゲノム遺伝子座（赤色の三角形）で配列を編集することができる。ＨＤＲの効率をアッセイするため、本発明者らは標的遺伝子座にＨｉｎｄＩＩＩ部位（赤色のバー）を導入し

、これを、相同性領域外にアニールするプライマーでＰＣＲ増幅した。ＨｉｎｄＩＩＩでＰＣＲ産物を消化すると、ＨＤＲイベントの発生が明らかになる。（ｂ）目的の遺伝子座に対してセンス方向またはアンチセンス方向（ｓまたはａ）のいずれかに向くｓｓＯＤＮをＣａｓ９と組み合わせて使用することにより、標的遺伝子座における効率的なＨＤＲ媒介性編集を実現することができる。改変の両側に４０ｂｐ、および好ましくは９０ｂｐの最小相同性領域が推奨される（赤色のバー）。（ｃ）野生型Ｃａｓ９およびＣａｓ９ニッカーゼ（Ｄ１０Ａ）の両方を使用して、ＥＭＸ１遺伝子座におけるＨＤＲに対してｓｓＯＤＮが及ぼす効果の例が示される。各ｓｓＯＤＮは、２つの制限部位の１２ｂｐの挿入が隣接する９０ｂｐの相同性アームを含む。

【図１３】図１３Ａ～図１３Ｃは、嚢胞性線維症ΔＦ５０８突然変異の修復戦略を示す。

【図１４】図１４Ａ～図１４Ｂは、（ａ）ＦＸＮイントロン１におけるＧＡＡリピート伸長の略図を示し、（ｂ）は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を使用したＧＡＡ伸長領域の切り出しに用いられる戦略の略図を示す。

【図１５】Ｔｅｔ１～３およびＤｎｍｔ１、３ａおよび３ｂ遺伝子座の効率的なＳｐＣａｓ９媒介性ターゲティングのスクリーニングを示す。形質移入したＮ２Ａ細胞のＤＮＡに関するＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイにより、種々のｇＲＮＡを使用することによる効率的なＤＮＡ開裂を実証する。

【図１６】ＡＡＶ１／２送達系における２ベクター系を使用した多重ゲノムターゲティング戦略を示す。Ｔｅｔ１－３およびＤｎｍｔ１、３ａおよび３ｂ　ｇＲＮＡはＵ６プロモーターの制御下にある。ＧＦＰ－ＫＡＳＨはヒトシナプシンプロモーターの制御下にある。制限酵素部位が、サブクローニングによる単純なｇＲＮＡ置換戦略を示す。２つの核局在化シグナル（ＮＬＳ）が隣接するＨＡタグ標識ＳｐＣａｓ９が示される。両方のベクターとも、１：１比でＡＡＶ１／２ウイルスによって脳に送達される。

【図１７】Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを用いた多重ＤＮＭＴターゲティングベクター＃１の機能検証を示す。ＤＮＭＴ遺伝子ファミリー遺伝子座のＳｐＣａｓ９媒介性開裂を試験するため、Ｎ２Ａ細胞にＤＮＭＴターゲティングベクター＃１（＋）およびＳｐＣａｓ９コードベクターを同時形質移入した。ｇＲＮＡのみ（－）が陰性対照である。形質移入後４８時間でＤＮＡ精製および下流処理のため細胞を回収した。

【図１８】Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを用いた多重ＤＮＭＴターゲティングベクター＃２の機能検証を示す。ＤＮＭＴ遺伝子ファミリー遺伝子座のＳｐＣａｓ９媒介性開裂を試験するため、Ｎ２Ａ細胞にＤＮＭＴターゲティングベクター＃１（＋）およびＳｐＣａｓ９コードベクターを同時形質移入した。ｇＲＮＡのみ（－）が陰性対照である。形質移入後４８時間でＤＮＡ精製および下流処理のため細胞を回収した。

【図１９】インビボでのＨＡ－ＳｐＣａｓ９発現に使用される短いプロモーターおよび短いポリＡバージョンの概略図を示す。Ｌ－ＩＴＲからＲ－ＩＴＲまでのコード領域のサイズを右側に示す。

【図２０】インビボでのＨＡ－ＳａＣａｓ９発現に使用される短いプロモーターおよび短いポリＡバージョンの概略図を示す。Ｌ－ＩＴＲからＲ－ＩＴＲまでのコード領域のサイズを右側に示す。

【図２１】Ｎ２Ａ細胞におけるＳｐＣａｓ９およびＳａＣａｓ９の発現を示す。種々の短いプロモーターの制御下にありかつ短いポリＡ（ｓｐＡ）配列を有するＨＡタグ標識ＳｐＣａｓ９およびＳａＣａｓ９バージョンの代表的なウエスタンブロット。チューブリンがローディング対照である。ｍＣｈｅｒｒｙ（ｍＣｈ）が形質移入対照である。形質移入後４８時間でウエスタンブロッティングのため細胞を回収してさらに処理した。

【図２２】Ｔｅｔ３遺伝子座の効率的なＳａＣａｓ９媒介性ターゲティングのスクリーニングを示す。形質移入したＮ２Ａ細胞のＤＮＡに関するＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイにより、ＮＮＧＧＧＴ　ＰＵＭ配列を有する種々のｇＲＮＡを使用することによる効率的なＤＮＡ開裂が実証される。ＧＦＰ形質移入細胞およびＳａＣａｓ９のみを発現する細胞が対照である。

【図２３】マウス脳におけるＨＡ－ＳａＣａｓ９の発現を示す。ヒトシナプシンプロモー

ターの制御下でＨＡ－ＳａＣａｓ９の発現をドライブするウイルスを動物の歯状回に注入した。手術後２週間で動物を犠牲にした。ウサギモノクローナル抗体Ｃ２９Ｆ４（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）を使用してＨＡタグを検出した。ＤＡＰＩ染色で細胞核は青色に染色された。

【図２４】形質導入７日後の培養下の皮質初代ニューロンにおけるＳｐＣａｓ９およびＳａＣａｓ９の発現を示す。種々のプロモーターの制御下にありかつｂｇｈまたは短いポリＡ（ｓｐＡ）配列を有するＨＡタグ標識ＳｐＣａｓ９およびＳａＣａｓ９バージョンの代表的なウエスタンブロット。チューブリンがローディング対照である。

【図２５】種々のプロモーターを含むＳｐＣａｓ９および多重ｇＲＮＡ構築物を有するＡＡＶ１粒子による形質導入後７日の初代皮質ニューロンのＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色を示す（ＤＮＭＴについては最後のパネルに例を示す）。ＡＡＶ形質導入後のニューロンを、対照の非形質導入ニューロンと比較した。赤色の核は、透過処理された死細胞を示す（パネルの２列目）。生細胞は緑色で示される（パネルの３列目）。

【図２６】種々のプロモーターを含むＳａＣａｓ９を有するＡＡＶ１粒子による形質導入後７日の初代皮質ニューロンのＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ染色を示す。赤色の核は、透過処理された死細胞を示す（パネルの２列目）。生細胞は緑色で示される（パネルの３列目）。

【図２７】ＴＥＴおよびＤＮＭＴ遺伝子座に関するＳｐＣａｓ９ならびにｇＲＮＡ多重体を有するＡＡＶ１ウイルスによる形質導入後のニューロンの形態比較を示す。形質導入されていないニューロンを対照として示す。

【図２８】初代皮質ニューロンにおけるＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイを用いた多重ＤＮＭＴターゲティングベクター＃１の機能検証を示す。ＤＮＭＴ遺伝子ファミリー遺伝子座のＳｐＣａｓ９媒介性開裂を試験するため、細胞にＤＮＭＴターゲティングベクター＃１および種々のプロモーターを有するＳｐＣａｓ９ウイルスを共形質導入した。

【図２９】脳におけるＳｐＣａｓ９開裂のインビボ効率を示す。ＤＮＭＴファミリー遺伝子座を標的とするｇＲＮＡ多重体を有するＡＡＶ１／２ウイルスを、２つの異なるプロモーター：マウスＭｅｃｐ２およびラットＭａｐ１ｂの制御下にあるＳｐＣａｓ９ウイルスと共にマウスに注入した。注入後２週間で脳組織を摘出し、ｇＲＮＡ多重体構築物からシナプシンプロモーターによりドライブされるＧＦＰ発現に基づき、ＦＡＣＳを使用して核を調製および選別した。ｇＤＮＡ抽出後、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを実行した。＋はＧＦＰ陽性核を示し、－は同じ動物からの対照のＧＦＰ陰性核を示す。ゲル上の数字は、評価したＳｐＣａｓ９効率を示す。

【図３０】海馬ニューロンからのＧＦＰ－ＫＡＳＨ標識細胞核の精製を示す。細胞核膜の核外膜（ＯＮＭ）をＧＦＰとＫＡＳＨタンパク質膜貫通ドメインとの融合物でタグ標識する。定位手術およびＡＡＶ１／２注入の１週間後の脳における強力なＧＦＰ発現。密度勾配遠心ステップによるインタクトな脳からの細胞核の精製。精製された核を示す。Ｖｙｂｒａｎｔ（登録商標）ＤｙｅＣｙｃｌｅ（商標）Ｒｕｂｙ染色によるクロマチン染色は赤色で示され、ＧＦＰ標識核は緑色で示される。ＧＦＰ＋およびＧＦＰ－細胞核の代表的なＦＡＣＳプロファイル（マゼンタ色：Ｖｙｂｒａｎｔ（登録商標）ＤｙｅＣｙｃｌｅ（商標）Ｒｕｂｙ染色、緑色：ＧＦＰ）。

【図３１】マウス脳におけるＳｐＣａｓ９開裂効率を示す。ＴＥＴファミリー遺伝子座を標的とするｇＲＮＡ多重体を有するＡＡＶ１／２ウイルスを、２つの異なるプロモーター：マウスＭｅｃｐ２およびラットＭａｐ１ｂの制御下にあるＳｐＣａｓ９ウイルスと共にマウスに注入した。注入後３週間で脳組織を摘出し、ｇＲＮＡ多重体構築物からシナプシンプロモーターによりドライブされるＧＦＰ発現に基づき、ＦＡＣＳを使用して核を調製および選別した。ｇＤＮＡ抽出後、Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイを実行した。＋はＧＦＰ陽性核を示し、－は同じ動物からの対照のＧＦＰ陰性核を示す。ゲル上の数字は、評価したＳｐＣａｓ９効率を示す。

【図３２】培養下の皮質ニューロンにおけるＧＦＰ－ＫＡＳＨ発現を示す。ＴＥＴ遺伝子座を標的とするｇＲＮＡ多重体構築物を有するＡＡＶ１ウイルスをニューロンに形質導入した。ＫＡＳＨドメインの局在化により、最も強力なシグナルは細胞核の周りに局在する

。
【図３３】（上）ガイドＲＮＡのペア間の間隔（２つのＰＡＭ配列の配置パターンにより示されるとおり）のリストを示す。ＳｐＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）ニッカーゼと共に使用したとき、パターン１、２、３、４を満たすガイドＲＮＡペアのみがインデルを呈した。（下）ＳｐＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）と、パターン１、２、３、４を満たすガイドＲＮＡのペアとの組み合わせが、標的部位におけるインデルの形成をもたらしたことを示すゲル画像。
【図３４】Ｕ６ガイドＲＮＡ発現カセット（ｃａｓｓｓｅｔｔｅ）の作成に使用されるＵ６リバースプライマー配列のリストを示す。Ｕ６および所望のガイドＲＮＡを含有するアンプリコンを作成するためには、各プライマーがＵ６フォワードプライマー「ｇｃａｃｔｇａｇｇｇｃｃｔａｔｔｔｃｃｃａｔｇａｔｔｃ」とペアを形成する必要がある。
【図３５】図３３に掲載する２４パターンの位置を示すヒトＥＭＸ１遺伝子座からのゲノム配列マップを示す。
【図３６】（右側）種々のガイドＲＮＡペアにより標的化されたＣａｓ９ニッカーゼによる開裂の後に可変の５’オーバーハングが存在するときの標的部位におけるインデルの形成を示すゲル画像を示す。（左側）右側にゲルのレーン番号を示し、使用したガイドＲＮＡペアおよびＣａｓ９ニッカーゼによる開裂後に存在する５’オーバーハングの長さを特定することを含めた種々のパラメータを示す表を示す。
【図３７】図３６のゲルパターン（右）をもたらしおよび実施例３０にさらに記載する種々のガイドＲＮＡペアの位置を示すヒトＥＭＸ１遺伝子座からのゲノム配列マップを示す。
【図３８Ａ－Ｂ】図３８Ａ～図３８Ｄは、以下を示す。（Ａ）追加の安定性のためのｓｇＲＮＡ足場の最適化；アーキテクチャＡおよびＢを示す。（Ｂ）単一Ｕ６プロモーターによりドライブされるタンデムｓｇＲＮＡ（リンカーにより連結している２つのｓｇＲＮＡ）を示す概略図。（Ｃ）ＨＥＫ細胞中にｗｔ　Ｃａｓ９とともに同時形質移入した場合、ゲノム微小欠失を媒介するようにＥＭＸ１の領域を標的化するようにｔｓｇＲＮＡが設計されることを示すゲル図。ここで、標的は、ＥＭＸ１の最後のエキソンをフランキングする。ｔｓｇＲＮＡは、ｗｔ　ｓｇＲＮＡ足場と異なるカスタム足場ＡまたはＢのいずれかを用いて合成される（上記のとおり）。アーキテクチャＡまたはＢのいずれかを有する２つのスペーサーをコードする単一ｔｓｇＲＮＡは、ｗｔ　Ｃａｓ９と同時送達された場合、ｗｔ　Ｃａｓ９と同時送達された２つのｗｔ　ｓｇＲＮＡと類似レベルのゲノム微小欠失を媒介する。（Ｄ）代替的に、Ｄ１０Ａ　Ｃａｓ９とＨＥＫ細胞中に同時形質移入した場合、二重ニッカーゼ実験において上記のとおりインデルを媒介するようにＥＭＸ１の領域を標的化するようにｔｓｇＲＮＡが設計されるゲル図。スペーサーは、左側および右側標的が２０ｂｐ標的間における少なくとも０、または４ｂｐの非重複で有するオフセットしており、Ｄ１０Ａから得られる切断が５’－オーバーハングを生成するように選択される。ゲル画像は、２つのスペーサーをコードする単一ｔｓｇＲＮＡまたは２つの別個のｓｇＲＮＡと同時形質移入されたＤ１０Ａ　Ｃａｓ９からのインデルを計測するＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイを示し、前者は後者と類似レベルのインデルを媒介し得る。
【図３８Ｃ－Ｄ】図３８Ａ～図３８Ｄは、以下を示す。（Ａ）追加の安定性のためのｓｇＲＮＡ足場の最適化；アーキテクチャＡおよびＢを示す。（Ｂ）単一Ｕ６プロモーターによりドライブされるタンデムｓｇＲＮＡ（リンカーにより連結している２つのｓｇＲＮＡ）を示す概略図。（Ｃ）ＨＥＫ細胞中にｗｔ　Ｃａｓ９とともに同時形質移入した場合、ゲノム微小欠失を媒介するようにＥＭＸ１の領域を標的化するようにｔｓｇＲＮＡが設計されることを示すゲル図。ここで、標的は、ＥＭＸ１の最後のエキソンをフランキングする。ｔｓｇＲＮＡは、ｗｔ　ｓｇＲＮＡ足場と異なるカスタム足場ＡまたはＢのいずれかを用いて合成される（上記のとおり）。アーキテクチャＡまたはＢのいずれかを有する２つのスペーサーをコードする単一ｔｓｇＲＮＡは、ｗｔ　Ｃａｓ９と同時送達された場合、ｗｔ　Ｃａｓ９と同時送達された２つのｗｔ　ｓｇＲＮＡと類似レベルのゲノム微小欠失を媒介する。（Ｄ）代替的に、Ｄ１０Ａ　Ｃａｓ９とＨＥＫ細胞中に同時形質移入した場合、二重ニッカーゼ実験において上記のとおりインデルを媒介するようにＥＭＸ１の領

域を標的化するようにｔｓｇＲＮＡが設計されるゲル図。スペーサーは、左側および右側標的が２０ｂｐ標的間における少なくとも０、または４ｂｐの非重複で有するオフセットしており、Ｄ１０Ａから得られる切断が５’－オーバーハングを生成するように選択される。ゲル画像は、２つのスペーサーをコードする単一ｔｓｇＲＮＡまたは２つの別個のｓｇＲＮＡと同時形質移入されたＤ１０Ａ　Ｃａｓ９からのインデルを計測するＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイを示し、前者は後者と類似レベルのインデルを媒介し得る。

【図３９Ａ－Ｂ】図３９Ａ～図３９Ｃは、（Ａ）タンデムレンチウイルスベクター設計、（Ｂ）ＬｅｎｔｉＣＲＩＳＰＲについての足場配列、（Ｃ）改変足場から構築されたタンデムガイドＲＮＡが、より効率的に個々の単位にプロセシングされることを示す概略図およびゲル画像を示す。

【図３９Ｃ】図３９Ａ～図３９Ｃは、（Ａ）タンデムレンチウイルスベクター設計、（Ｂ）ＬｅｎｔｉＣＲＩＳＰＲについての足場配列、（Ｃ）改変足場から構築されたタンデムガイドＲＮＡが、より効率的に個々の単位にプロセシングされることを示す概略図およびゲル画像を示す。

【図４０】図４０Ａ～図４０Ｂは、ペア形成ｓｇＲＮＡが、ニッカーゼＣａｓ９ｎを用いる二重ニッキングを介してインデルを誘導することを示す。（Ａ）Ｃａｓ９Ｄ１０Ａニッカーゼ（Ｃａｓ９ｎ）のペアを使用するＤＮＡ二本鎖切断を示す概略図。２つのｓｇＲＮＡは、Ｃａｓ９ｎを標的化してＤＮＡの両方の鎖をニッキングする。Ｄ１０Ａ突然変異により、Ｃａｓ９がｓｇＲＮＡに相補的なＤＮＡ鎖のみを開裂し得るようになる。オフセット距離は、ペア形成ｓｇＲＮＡの最も近い末端間のＤＮＡの長さを指し、この場合、４ｂｐである。（Ｂ）ＳＵＲＶＥＹＯＲをヌクレアーゼアッセイを使用して検出されたとおり、ヒトゲノムのＥＭＸ１遺伝子座中のＣａｓ９ｎ媒介インデルを示す代表的なゲル画像、６５０ｂｐバンドは、未改変ゲノム標的を表し、約３００ｂｐのバンドは、インデルの存在を示す。

【図４１】図４１Ａ～図４１Ｂは、二重ニッキングがインデルを誘導し得ることを示す。（Ａ）３つの異なるヒト遺伝子：ＥＭＸ１、ＤＹＲＫ１Ａ、ＧＲＩＮ２Ｂにわたる、示されるｓｇＲＮＡオフセット距離に対応するインデル頻度を示すグラフ。（Ｂ）一例として、Ｃａｓ９ｎにより標的化されるヒトＥＭＸ１遺伝子座の配列。ｓｇＲＮＡ標的部位およびＰＡＭを、青色およびマゼンタバーによりそれぞれ示す。下段、代表的なインデルを示す選択配列。

【図４２】図４２Ａ～図４２Ｃは、二重ニッキング戦略が相同組換えを促進し得ることを示す。（Ａ）Ｃａｓ９ｎのペアにより作出されるＤＳＢにおける一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）テンプレートを介して標的化されるＨＤＲを示す概略図。ＤＳＢ部位における組換えの成功は、ＨｉｎｄＩＩＩ制限部位を導入する。（Ｂ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞中の二重ニッキング促進ＨＤＲによるＨｉｎｄＩＩＩ開裂部位の挿入の成功を示す制限消化アッセイゲル。上段バンドは未改変テンプレートであり；下段バンドはＨｉｎｄＩＩＩ開裂産物である。（Ｃ）二重ニッキングは、ＨＵＥＳ６２細胞中のＨＤＲを向上させる。ＨＤＲ頻度は、ディープシーケンシングを使用して決定した（ｎ＝３；エラーバーは、平均±ｓ．ｅ．を示す）。

【図４３】相同組換えのための二重ニッキング間隔の特徴付けを示す。ｓｓＯＤＮテンプレート（青色で示し、導入されるＨｉｎｄＩＩＩ部位を赤色で示す）を用いるＨＤＲを示す概略図。赤色矢印は、各々のｓｇＲＮＡの結合部位を示し、黒色バーは、ペア形成ニッキング活性から生じる推定オーバーハングに対応する。右側のパネルは、組換えの効率を示し、ｓｇＲＮＡペア、オーバーハング長およびタイプ、ならびにペア形成ｓｇＲＮＡ間のオフセット距離を示す。

【図４４】図４４Ａ～図４４Ｄは、二重ニッキングが公知のオフターゲット部位における非特異的活性を低減させることを示す。（Ａ）標的ヒトＥＭＸ１遺伝子座およびｓｇＲＮＡ標的部位を示す概略図。右側ｓｇＲＮＡについてのゲノムオフターゲット部位を下段に列記する。オフターゲット部位は、Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ４８に記載のとおり既に同定された。（Ｂ）２つのｓｇＲＮＡとＣａｓ９ｎによる、および個々のｓｇＲＮＡと野生型Ｃａ

ｓ９によるオンターゲット部位における改変を示すＳＵＲＶＥＹＯＲゲル。オフターゲット５におけるインデルは、ｓｇＲＮＡ１を用いる野生型Ｃａｓ９についてのみ観察された。（Ｃ）オフターゲット改変のレベルは、５つ全てのオフターゲット遺伝子座におけるディープシーケンシングを使用して定量される。（Ｄ）Ｃａｓ９ｎおよび野生型Ｃａｓ９の特異性比較。特異性比は、オンターゲットおよびオフターゲット改変率の比を考慮することにより算出される（ｎ＝３；エラーバーは、平均±ｓ．ｅ．を示す）。

【図４５】図４５Ａ～図４５Ｂは、ｓｇＲＮＡアーキテクチャの合理的突然変異誘発を示す。（Ａ）標的特異性をコードする２０ｂｐガイド配列を有するキメラｓｇＲＮＡアーキテクチャの概略図。突然変異誘発により調査されるｓｇＲＮＡの異なる領域が命名され、上部にハイライト表示される。（Ｂ）ヒトＥＭＸ１遺伝子座において作製された突然変異および対応するインデル活性の説明。

【図４６】遠位ヘアピンおよびＤＤＲ安定化が、同等のインデル活性を保持することを示す。ヘアピンの安定化を目的とする３つの代替足場アーキテクチャの配列を示す概略図であり、塩基対変化が黒色で示される。野生型ｓｐ８５アーキテクチャと比較した対応する足場のインデル誘導活性が右側に示される。

【図４７】図４７Ａ～図４７Ｃは、Ｕ６ドライブタンデムガイドＲＮＡが２つのゲノム遺伝子座を効率的に標的化し得ることを示す。（Ａ）単一Ｕ６プロモーターによりドライブされるタンデムｓｇＲＮＡ（リンカーにより連結された２つのｓｇＲＮＡ）を説明する概略図。ＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイのＰＡＧＥゲルの画像は、ニッカーゼＣａｓ９ｎまたは野生型Ｃａｓ９と送達された改変ＲＮＡ足場を使用するｔｓｇＲＮＡが、ゲノムインデルまたは微小欠失を誘導し得ることを実証し（それぞれＢおよびＣ）、頻度は、２つの独立ｓｇＲＮＡの同時送達と同等である。

【図４８】タンデムｓｇＲＮＡリンカー長および構造の最適化を示す。野生型および０、４、８、１２、１６塩基対の変動タンデムリンカー、半ダイレクトリピートまたは完全ダイレクトリピート（下段パネルに列記）を有する改変ＤＮＡの相対的存在量を比較するヒトＥＭＸ１標的遺伝子座のＰＣＲ増幅からのバンド強度のゲル定量。

【図４９】図４９Ａ～図４９Ｃは、タンデムガイドＲＮＡが第１の位置においてのみ効率的にプロセシングされることを示す。（Ａ）第１または第２の位置におけるＥＭＸ１．３またはＥＭＸ６３のいずれかをコードするタンデムガイドＲＮＡ足場を示す概略図であり、Ｅｍｘ１．３ノザンプローブの位置が赤色で示される。（Ｂ）細胞中のタンデムｓｇＲＮＡのプロセシングを試験するノザンブロット分析。（Ｃ）２つのゲノム遺伝子座ＤＹＲＫ１ＡおよびＧＲＩＮ２Ｂを標的化する独立ｓｇＲＮＡ活性を試験するＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイ。両方のパネルにおける３つの左側のレーンは、第１の位置におけるＤＹＲＫ１Ａおよび第２の位置におけるＧＲＩＮ２Ｂを標的化するｔｓｇＲＮＡである。逆に、３つの右側のレーンは、第１の位置におけるＧＲＩＮ２Ｂおよび第２の位置におけるＤＹＲＫ１Ａを標的化する。

【図５０】図５０Ａ－図５０Ｃは、ｔｓｇＲＮＡ足場ペア形成の最適化を示す。（Ａ）Ｃａｓ９－Ｔ２Ａ－ＧＦＰ発現プラスミド中の足場Ａを使用してＧｒｉｎ２Ｂを標的化する第１のスペーサーおよび足場Ｂを使用してＣａｓ９自体を標的化する第２のスペーサーを用いるタンデム足場設計の概略図。（Ｂ）単一Ｕ６－ガイド制御は、ＧＦＰ陰性細胞の割合の増加および陽性分画の平均蛍光強度の減少の両方を示す。（Ｃ）タンデム足場ペア形成の１２×１２マトリックスおよび後続のフローサイトメトリーによる分析の結果。

【図５１】多様な足場間のタンデムペアは、第２のスペーサー活性を改善することを示す。ｓｐ８５足場に対する予備試験において使用されるｓｇＲＮＡ足場の配列アラインメント。

【図５２】二方向Ｕ６プロモーターの異なるトランケーションおよび関連する微小欠失活性ならびに二方向プロモーターのいずれかの側から生じるインデル誘導活性の定量を示す。

【図５３】最小Ｕ６－８／Ｕ６－１二方向レポーターの配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【００８８】
２０１３年８月８日に出願された米国仮特許出願第６１／８６２，４６８号明細書が参照される。２０１３年１月３０日；２０１３年３月１５日；２０１３年３月２８日；２０１３年４月２０日；２０１３年５月６日および２０１３年５月２８日にそれぞれ出願された米国仮特許出願第６１／７５８，４６８号明細書；同第６１／８０２，１７４号明細書；同第６１／８０６，３７５号明細書；同第６１／８１４，２６３号明細書；同第６１／８１９，８０３号明細書および同第６１／８２８，１３０号明細書が参照される。２０１３年６月１７日および２０１３年７月１７日にそれぞれ出願された米国仮特許出願第６１／８３６，１２３号明細書および同第６１／８４７，５３７号明細書も参照される。２０１２年１２月１２日および２０１３年１月２日にそれぞれ出願された米国仮特許出願第６１／７３６，５２７号明細書および同第６１／７４８，４２７号明細書も参照される。２０１３年３月１５日に出願された米国仮特許出願第６１／７９１，４０９号明細書も参照される。２０１３年３月１５日に出願された米国仮特許出願第６１／７９９，８００号明細書も参照される。２０１３年６月１７日にそれぞれ出願された米国仮特許出願第６１／８３５，９３６号明細書、同第６１／８３６，１２７号明細書、同第６１／８３６，１０１号明細書、同第６１／８３６，１２３号明細書、同第６１／８３６，０８０号明細書および同第６１／８３５，９７３号明細書も参照される。２０１３年７月２日および２０１３年１０月１５日にそれぞれ出願された米国仮特許出願第６１／８４２，３２２号明細書および米国特許出願第１４／０５４，４１４号明細書も参照される。２０１３年１２月１２日に出願された米国仮特許出願第６１／９１５，４０７号明細書も参照される。これらの出願の各々、ならびにその中に引用されるかまたはその審査手続中に引用される全ての文献（「出願引用文献」）および出願引用文献中で引用または参照される全ての文献は、そこで言及されるかまたはまたはその中の任意の文献中にある、かつ参照によって本明細書に援用される任意の製品に関する任意の指示書、説明書、製品仕様書、およびプロダクトシートと共に、本明細書によって参照により本明細書に援用され、かつ本発明の実施に用いられ得る。全ての文献（例えば、これらの出願および出願引用文献）は、個々の文献それぞれについて参照によって援用されることが具体的かつ個々に指示されたものとするのと同程度に参照により本明細書に援用される。

【００８９】
また、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に関する一般的な情報については以下が挙げられ：
・ Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｃｏｎｇ，Ｌ．，Ｒａｎ，Ｆ．Ａ．，Ｃｏｘ，Ｄ．，Ｌｉｎ，Ｓ．，Ｂａｒｒｅｔｔｏ，Ｒ．，Ｈａｂｉｂ，Ｎ．，Ｈｓｕ，Ｐ．Ｄ．，Ｗｕ，Ｘ．，Ｊｉａｎｇ，Ｗ．，Ｍａｒｒａｆｆｉｎｉ，Ｌ．Ａ．，＆ Ｚｈａｎｇ，Ｆ．Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｆｅｂ １５；３３９（６１２１）：８１９－２３（２０１３）；
・ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｅｄｉｔｉｎｇ ｏｆ ｂａｃｔｅｒｉａｌ ｇｅｎｏｍｅｓ ｕｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｊｉａｎｇ Ｗ．，Ｂｉｋａｒｄ Ｄ．，Ｃｏｘ Ｄ．，Ｚｈａｎｇ Ｆ，Ｍａｒｒａｆｆｉｎｉ ＬＡ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｍａｒ；３１（３）：２３３－９（２０１３）；
・ Ｏｎｅ－Ｓｔｅｐ Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｉｃｅ Ｃａｒｒｙｉｎｇ Ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｇｅｎｅｓ ｂｙ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．Ｗａｎｇ Ｈ．，Ｙａｎｇ Ｈ．，Ｓｈｉｖａｌｉｌａ ＣＳ．，Ｄａｗｌａｔｙ ＭＭ．，Ｃｈｅｎｇ ＡＷ．，Ｚｈａｎｇ Ｆ．，Ｊａｅｎｉｓｃｈ Ｒ．Ｃｅｌｌ Ｍａｙ ９；１５３（４）：９１０－８（２０１３）；
・ Ｏｐｔｉｃａｌ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ ｓｔａｔｅｓ．Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ Ｓ，Ｂｒｉｇｈａｍ ＭＤ，Ｔｒｅｖｉｎｏ ＡＥ，Ｈｓｕ ＰＤ，Ｈｅｉｄｅｎｒｅｉｃｈ Ｍ，Ｃｏｎｇ Ｌ，Ｐｌａｔｔ ＲＪ，Ｓｃｏｔｔ ＤＡ，Ｃｈｕｒｃｈ ＧＭ，Ｚｈａｎｇ Ｆ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１３ Ａｕｇ ２２；５００（７

463）：472－6.doi：10.1038／Nature12466.Epub 2013 Aug 23；
・Double Nicking by RNA－Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity.Ran,FA.,Hsu,PD.,Lin,CY.,Gootenberg,JS.,Konermann,S.,Trevino,AE.,Scott,DA.,Inoue,A.,Matoba,S.,Zhang,Y.,& Zhang,F.Cell Aug 28.pii：S0092－8674（13）01015－5.（2013）；
・DNA targeting specificity of RNA－guided Cas9 nucleases.Hsu,P.,Scott,D.,Weinstein,J.,Ran,FA.,Konermann,S.,Agarwala,V.,Li,Y.,Fine,E.,Wu,X.,Shalem,O.,Cradick,TJ.,Marraffini,LA.,Bao,G.,& Zhang,F.Nat Biotechnol doi：10.1038／nbt.2647（2013）；
・Genome engineering using the CRISPR－Cas9 system.Ran,FA.,Hsu,PD.,Wright,J.,Agarwala,V.,Scott,DA.,Zhang,F.Nature Protocols Nov；8（11）：2281－308.（2013）；
・Genome－Scale CRISPR－Cas9 Knockout Screening in Human Cells.Shalem,O.,Sanjana,NE.,Hartenian,E.,Shi,X.,Scott,DA.,Mikkelson,T.,Heckl,D.,Ebert,BL.,Root,DE.,Doench,JG.,Zhang,F.Science Dec 12.（2013）.［Epub ahead of print］；
・Crystal structure of cas9 in complex with guide RNA and target DNA.Nishimasu,H.,Ran,FA.,Hsu,PD.,Konermann,S.,Shehata,SI.,Dohmae,N.,Ishitani,R.,Zhang,F.,Nureki,O.Cell Feb 27.（2014）.156（5）：935－49；
・Genome－wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells.Wu X.,Scott DA.,Kriz AJ.,Chiu AC.,Hsu PD.,Dadon DB.,Cheng AW.,Trevino AE.,Konermann S.,Chen S.,Jaenisch R.,Zhang F.,Sharp PA.Nat Biotechnol.（2014）Apr 20.doi：10.1038／nbt.2889、および
・Development and Applications of CRISPR－Cas9 for Genome Engineering,Hsu et al,Cell 157,1262－1278（June 5,2014）（Hsu 2014）、
この各々が参照により本明細書に援用され、簡潔には以下のとおり考察している：
・Cong et al.は、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Streptococcus thermophilus）Cas9およびまた化膿性連鎖球菌（Streptoccocus pyogenes）Cas9の両方に基づき、真核細胞で使用されるII型CRISPR／Cas系をエンジニアリングし、Cas9ヌクレアーゼが低分子RNAの指図を受けてヒトおよびマウス細胞で正確なDNA開裂を誘導し得ることを実証した。この著者らの研究はさらに、ニッキング酵素に変換されるCas9を使用して、最小限の変異原活性を有する真核細胞での相同性組換え修復を促進し得ることを示した。加えて、この著者らの研究は、複数のガイド配列を単一のCRISPR配列にコードすることによって哺乳類ゲノム内の内在性ゲノム遺伝子座部位でいくつかを同時に編集するこ

とが可能となり得ることを実証し、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ技術の容易なプログラム可能性および広範な適用性を実証した。このようにＲＮＡを使用して細胞における配列特異的ＤＮＡ開裂をプログラムすることが可能となり、ゲノムエンジニアリングツールの新しいクラスが定義された。これらの研究はさらに、他のＣＲＩＳＰＲ遺伝子座が哺乳類細胞に移植可能であると見込まれ、また哺乳類ゲノム開裂も媒介し得ることを示した。重要なことに、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系のいくつかの側面をさらに改良してその効率および多用途性を高め得ることが想定され得る。

【００９０】

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

【００９１】

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

・　本明細書で考察するとおり、微生物ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系由来のＣａｓ９ヌクレアーゼが２０ｎｔガイド配列によって特異的なゲノム遺伝子座にターゲティングされ、ガイド配列はＤＮＡ標的との特定のミスマッチに耐えることができるため、従って望ましくないオフターゲット突然変異誘発を促進し得る。これに対処するため、Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．は、Ｃａｓ９ニッカーゼ突然変異体を対のガイドＲＮＡと組み合わせて標的二本鎖切断を導入するという手法を記載した。ゲノム中の個々のニックは高いフィデリティで修復されるため、二本鎖切断には適切にオフセットしたガイドＲＮＡによる同時のニッキングが必要であり、これが標的開裂のために特異的に認識される塩基の数を伸長する。この著者らは、対のニッキングを使用して細胞系におけるオフターゲット活性を５０～１，５００分の１に減らし、オンターゲット開裂効率を犠牲にすることなしにマウス接合体における遺伝子ノックアウトを促進し得ることを実証した。この多用途戦略により、高い特異性が要求される多種多様なゲノム編集適用が可能となる。

【００９２】

・　Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．は、標的部位の選択を知らせ、かつオフターゲット効果を回避するためのヒト細胞におけるＳｐＣａｓ９ターゲティングの特異性を特徴付けた。この研究は、７００個を超えるガイドＲＮＡ変異体ならびに２９３Ｔおよび２９３ＦＴ細胞の１００個を超える予測ゲノムオフターゲット遺伝子座におけるＳｐＣａｓ９誘導インデル突然変異レベルを評価した。この著者ら、ＳｐＣａｓ９がミスマッチの数、位置および分布に感受性を有して、配列依存的に種々の位置におけるガイドＲＮＡと標的ＤＮＡとの間のミスマッチに耐えること。この著者らはさらに、ＳｐＣａｓ９媒介性開裂がＤＮＡメチル化の影響を受けないこと、およびＳｐＣａｓ９およびｓｇＲＮＡの投与量を滴定してオフターゲット改変を最小限に抑え得ることを示した。加えて、哺乳類ゲノムエンジニアリング適用を促進するため、この著者らは、標的配列の選択および検証ならびにオフターゲット解析をガイドするウェブベースのソフトウェアツールの提供を報告した。

【００９３】
・　Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．は、哺乳類細胞における非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同性組換え修復（ＨＤＲ）を用いたＣａｓ９媒介性ゲノム編集ならびに下流機能研究用の改変細胞系生成のための一組のツールを記載した。オフターゲット開裂を最小限に抑えるため、この著者らはさらに、対のガイドＲＮＡを含むＣａｓ９ニッカーゼ突然変異体を使用した二重ニッキング戦略を記載した。この著者らによって提供されるプロトコルは、標的部位の選択、開裂効率の評価およびオフターゲット活性の分析に関する指針を実験的に導いた。この研究は、標的設計から始めて、僅か１～２週間以内に遺伝子改変を達成し得るとともに、２～３週間以内に改変クローン細胞系を誘導し得ることを示した。
【００９４】
・　Ｓｈａｌｅｍ　ｅｔ　ａｌ．は、ゲノムワイドな規模で遺伝子機能を調べる新しい方法を記載した。この著者らの研究は、６４，７５１個のユニークなガイド配列で１８，０８０個の遺伝子をターゲティングするゲノム規模のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ノックアウト（ＧｅＣＫＯ）ライブラリの送達が、ヒト細胞におけるネガティブ選択およびポジティブ選択の両方のスクリーニングを可能にしたことを示した。第一に、この著者らは、ＧｅＣＫＯライブラリを使用した、癌および多能性幹細胞における細胞生存にとって不可欠な遺伝子の同定を示した。次に、この著者らは黒色腫モデルにおいて、その欠損が突然変異体プロテインキナーゼＢＲＡＦを阻害する治療薬ベムラフェニブに対する耐性に関わる遺伝子をスクリーニングした。この著者らの研究は、最も上位にランク付けされた候補に、以前検証された遺伝子ＮＦ１およびＭＥＤ１２ならびに新規ヒットＮＦ２、ＣＵＬ３、ＴＡＤＡ２Ｂ、およびＴＡＤＡ１が含まれたことを示した。この著者らは、同じ遺伝子をターゲティングする独立したガイドＲＮＡ間における高度な一致および高率のヒット確認を観察し、従ってＣａｓ９によるゲノム規模スクリーニングの有望さを実証した。
【００９５】
・　Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．は、２．５Åの分解能でｓｇＲＮＡおよびその標的ＤＮＡと複合体形成する化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９の結晶構造を報告した。この構造から、標的認識ローブとヌクレアーゼローブとで構成された、それらの界面にある正電荷の溝にｓｇＲＮＡ：ＤＮＡヘテロ二本鎖を受け入れる２ローブ構成が明らかになった。認識ローブはｓｇＲＮＡおよびＤＮＡの結合に決定的に重要であるのに対し、ヌクレアーゼローブはＨＮＨおよびＲｕｖＣヌクレアーゼドメインを含み、これらのドメインは標的ＤＮＡのそれぞれ相補鎖および非相補鎖の開裂に適切な位置にある。ヌクレアーゼローブはまた、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）との相互作用に関与するカルボキシル末端ドメインも含む。この高分解能構造解析および付随する機能解析により、Ｃａｓ９によるＲＮＡガイドＤＮＡターゲティングの分子機構が明らかになることで、ひいては新規の多用途ゲノム編集技術の合理的な設計への道が開かれつつある。
【００９６】
・　Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．は、マウス胚性幹細胞（ｍＥＳＣ）においてシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を負荷した化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）由来の触媒不活性Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）のゲノムワイドな結合部位をマッピングした。この著者らは、試験した４つのｓｇＲＮＡの各々が、多くの場合にｓｇＲＮＡにおける５ヌクレオチドシード領域およびＮＧＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）によって特徴付けられる数十個ないし数千個のゲノム部位にｄＣａｓ９をターゲティングすることを示した。クロマチンが接触不可能であることにより、一致するシード配列を含む他の部位に対するｄＣａｓ９結合が減少し；従ってオフターゲット部位の７０％が遺伝子と会合する。この著者らは、触媒活性Ｃａｓ９を形質移入したｍＥＳＣにおける２９５個のｄＣａｓ９結合部位の標的シーケンシングから、バックグラウンドレベルを上回って突然変異した部位は１つのみ同定されたことを示した。この著者らは、Ｃａｓ９結合および開裂の２状態モデルを提案しており、このモデルではシードの一致が結合を引き起こすが、開裂には標的ＤＮＡとの広範な対合が必要である。

【００９７】
・　Ｈｓｕ　２０１４は、２０１４年６月５日より前に出願された本明細書の系統上にある出願の情報、データおよび知見にあるような、細胞の遺伝子スクリーニングを含めたヨーグルトからゲノム編集に至るまでのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９の歴史を広く考察するレビュー論文である。Ｈｓｕ　２０１４の一般的な教示は、本明細書の特定のモデル、動物を含まない。
【００９８】
本発明は、ゲノム摂動または遺伝子編集など、配列ターゲティングが関わる遺伝子発現の制御に使用される、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系およびその成分に関する系、方法および組成物のエンジニアリングおよび最適化に関する。有利な実施形態においてＣａｓ酵素はＣａｓ９である。
【００９９】
本方法の利点は、ＣＲＩＳＰＲ系がオフターゲット結合およびその結果として生じる副作用を回避することである。これは、標的ＤＮＡに対して高度な配列特異性を有するように構成された系を使用して達成される。
【０１００】
Ｃａｓ９の最適化を用いて機能を増強しまたは新規機能を開発してもよく、キメラＣａｓ９タンパク質を作成することができる。本出願人らが作成した例を実施例６に提供する。キメラＣａｓ９タンパク質は、異なるＣａｓ９ホモログの断片を組み合わせることにより作製し得る。例えば、本明細書に記載されるＣａｓ９からの２つの例示的なキメラＣａｓ９タンパク質。例えば、本出願人らは、Ｓｔ１Ｃａｓ９のＮ末端（このタンパク質からの断片は太字である）をＳｐＣａｓ９のＣ末端と融合した。キメラＣａｓ９を作製する利益には、以下の一部または全部が含まれる：
毒性の低下；
真核細胞における発現の向上；
特異性の亢進；
タンパク質の分子量の低下、異なるＣａｓ９ホモログの最も小さいドメインを組み合わせてより小さいタンパク質を作製；および／または
ＰＡＭ配列要件の変更。
【０１０１】
Ｃａｓ９は、汎用ＤＮＡ結合タンパク質として用いられ得る。例えば、および実施例７に示すとおり、本出願人らは、ＤＮＡ標的の両鎖の開裂に関与する２つの触媒ドメイン（Ｄ１０およびＨ８４０）を突然変異させることにより、Ｃａｓ９を汎用ＤＮＡ結合タンパク質として使用した。標的遺伝子座における遺伝子転写を上方制御するため、本出願人らは転写活性化ドメイン（ＶＰ６４）をＣａｓ９と融合した。他の転写活性化ドメインが公知である。実施例１１に示すとおり、転写活性化が可能である。同様に実施例１１に示すとおり、標的遺伝子配列に結合し、ひいてはその活性を抑制するＣａｓ９リプレッサー（ＤＮＡ結合ドメイン）を使用して遺伝子抑制（この場合β－カテニン遺伝子の）が可能である。
【０１０２】
トランスジェニック動物もまた提供される。好ましい例としては、Ｃａｓ９をコードするポリヌクレオチドまたはタンパク質それ自体という意味においてＣａｓ９を含む動物が挙げられる。マウス、ラットおよびウサギが好ましい。本明細書に例示されるとおり構築物でトランスジェニックマウスを作成するには、純粋な線状ＤＮＡを偽妊娠雌、例えばＣＢ５６雌由来の接合体の前核に注入し得る。次にファウンダーを同定し、遺伝子型を決定し、ＣＢ５７マウスと戻し交配し得る。次に構築物をクローニングし、場合により、例えばサンガーシーケンシングによって検証し得る。ノックアウトが想定され、例えばモデルにおいて１つ以上の遺伝子がノックアウトされる。しかしながらノックインもまた（単独でまたは組み合わせで）想定される。例示的なノックインＣａｓ９マウスを作成しており、これを例示するが、Ｃａｓ９ノックインが好ましい。Ｃａｓ９ノックインマウスを作成

するには、本明細書に記載されるとおり同じ構成的および条件的構築物をＲｏｓａ２６遺伝子座にターゲティングし得る（図７Ａ～図７Ｂおよび図８）。

【０１０３】

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

【０１０４】

上述のとおり、トランスジェニック動物もまた、トランスジェニック植物、特に作物および藻類と同様に提供される。トランスジェニックは、疾患モデルを提供すること以外の適用で有用であり得る。そうした適用には、例えば通常野生型で見られるより高いタンパク質、炭水化物、栄養素またはビタミンレベルの発現による飼料生産の食糧が含まれ得る。この点で、トランスジェニック植物、特に豆類および塊茎、および動物、特に家畜（乳牛、ヒツジ、ヤギおよびブタ）などの哺乳動物、また家禽および食用昆虫も好ましい。

【０１０５】

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

【０１０６】

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

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

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

【０１０７】

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

【０１０８】

【表１】

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

【０１０９】
従ってこれらの種は、概して好ましいＣａｓ９種である。本出願人らは、送達およびインビボマウス脳Ｃａｓ９発現データを示している。

【０１１０】
インビボでゲノム改変を媒介するためＣａｓ９コード核酸分子、例えばＤＮＡをウイルスベクターにパッケージングする２つの方法が好ましい：
ＮＨＥＪ媒介性遺伝子ノックアウトを達成するため：
単一ウイルスベクター：
２つ以上の発現カセットを含むベクター：
プロモーター－Ｃａｓ９コード核酸分子－ターミネーター
プロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター
プロモーター－ｇＲＮＡ２－ターミネーター
プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーター（ベクターのサイズ限界に至るまで）
二重ウイルスベクター：
Ｃａｓ９の発現をドライブするための１つの発現カセットを含むベクター１
プロモーター－Ｃａｓ９コード核酸分子－ターミネーター
１つ以上のガイドＲＮＡの発現をドライブするためのもう１つの発現カセットを含むベクター２
プロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター
プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーター（ベクターのサイズ限界に至るまで）
相同性組換え修復を媒介するため。上記に記載する単一および二重ウイルスベクター手法に加え、さらなるベクターを使用して相同性組換え修復テンプレートが送達される。

【０１１１】
Ｃａｓ９コード核酸分子の発現をドライブするために使用されるプロモーターとしては、以下を挙げることができる：
ＡＡＶ　ＩＴＲはプロモーターとして働き得る：これは、追加的なプロモーターエレメント（これはベクター中でスペースを取り得る）の必要性をなくすのに有利である。空いた追加のスペースは、追加的なエレメント（ｇＲＮＡ等）の発現のドライブに使用することができる。また、ＩＴＲ活性は比較的弱いため、Ｃａｓ９の過剰発現に起因する毒性を低下させるためにも使用することができる。

【０１１２】
遍在的な発現には、以下のプロモーターを使用することができる：ＣＭＶ、ＣＡＧ、ＣＢｈ、ＰＧＫ、ＳＶ４０、フェリチン重鎖または軽鎖等

【０１１３】
脳での発現には、以下のプロモーターを使用することができる：全てのニューロンに対するシナプシンＩ、興奮性ニューロンに対するＣａＭＫＩＩα、ＧＡＢＡ作動性ニューロンに対するＧＡＤ６７またはＧＡＤ６５またはＶＧＡＴ等
【０１１４】
肝臓での発現には、アルブミンプロモーターを使用することができる。
肺での発現には、ＳＰ－Ｂを使用することができる。
内皮細胞にはＩＣＡＭを使用することができる。
造血細胞にはＩＦＮβまたはＣＤ４５を使用することができる。
骨芽細胞にはＯＧ－２を使用することができる。
ガイドＲＮＡのドライブに使用されるプロモーターとしては、以下を挙げることができる：
Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター、例えばＵ６またはＨ１
Ｐｏｌ　ＩＩプロモーターおよびイントロンカセットを使用することによるｇＲＮＡの発現
ＡＡＶに関して、ＡＡＶはＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはそれらの任意の組み合わせであってよい。標的とする細胞に関連するＡＡＶのＡＡＶを選択することができる；例えば、脳または神経細胞を標的にするためＡＡＶ血清型１、２、５またはハイブリッドカプシドＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはそれらの任意の組み合わせを選択することができ；および心臓組織を標的にするためＡＡＶ４を選択することができる。ＡＡＶ８は肝臓への送達に有用である。上記のプロモーターおよびベクターは個々に好ましい。
【０１１５】
ＲＮＡ送達もまた有用なインビボ送達方法である。図９は送達およびインビボマウス脳Ｃａｓ９発現データを示す。リポソームまたはナノ粒子を使用してＣａｓ９およびｇＲＮＡ（および、例えばＨＲ修復テンプレート）を細胞に送達することが可能である。従ってＣＲＩＳＰＲ酵素、例えばＣａｓ９の送達および／または本発明のＲＮＡの送達は、ＲＮＡ形態で、微小胞、リポソームまたはナノ粒子を介してもよい。例えば、インビボ送達のためＣａｓ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡをリポソーム粒子にパッケージングすることができる。リポソーム形質移入試薬、例えばＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのインビボフェクタミンおよび他の市販の試薬は、ＲＮＡ分子を肝臓に有効に送達することができる。
【０１１６】
ＮＨＥＪまたはＨＲ効率を増強させることもまた、送達の助けとなる。ＮＨＥＪ効率は、Ｔｒｅｘ２などの末端プロセシング酵素を同時発現させて増強することが好ましい（Ｄｕｍｉｔｒａｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．２０１１　Ａｕｇｕｓｔ；１８８（４）：７８７－７９７）。ＨＲ効率は、Ｋｕ７０およびＫｕ８６などのＮＨＥＪ機構を一過性に阻害して増加させることが好ましい。ＨＲ効率はまた、ＲｅｃＢＣＤ、ＲｅｃＡなどの原核生物または真核生物相同組換え酵素を同時発現させて増加させることもできる。
【０１１７】
種々の送達手段が本明細書に記載され、本節でさらに考察される。
【０１１８】
ウイルス性送達：ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えばＣａｓ９および／または本ＲＮＡのいずれか、例えばガイドＲＮＡは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、アデノウイルスまたは他のウイルスベクター型、またはそれらの組み合わせを使用して送達することができる。Ｃａｓ９および１つ以上のガイドＲＮＡは１つ以上のウイルスベクターにパッケージングすることができる。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、例えば筋肉内注射によって目的の組織に送達されるが、他の場合にはウイルス性送達は静脈内、経皮的、鼻腔内、経口、粘膜、または他の送達方法による。かかる送達は単回用量によっても、あるいは複数回用量によってもよい。当業者は、本明細書における送達される実際の投

薬量が、ベクターの選択、標的細胞、生物、または組織、治療対象の全身状態、求められる形質転換／改変の程度、投与経路、投与方法、求められる形質転換／改変のタイプ等の種々の要因に応じて大幅に異なり得ることを理解する。

【０１１９】

かかる投薬量は、例えば、担体（水、生理食塩水、エタノール、グリセロール、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナッツ油、ゴマ油等）、希釈剤、薬学的に許容可能な担体（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、薬学的に許容可能な賦形剤、および／または当技術分野において公知の他の化合物をさらに含有し得る。かかる投薬量配合は当業者により容易に確かめられる。投薬量は、１つ以上の薬学的に許容可能な塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等の鉱酸塩；および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等の有機酸塩をさらに含有し得る。加えて、補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝物質、ゲルまたはゲル化材料、香味料、着色料、マイクロスフェア、ポリマー、懸濁剤等もまた本明細書において存在し得る。加えて、１つ以上の他の従来の医薬品成分、例えば保存剤、保湿剤、懸濁剤、界面活性剤、抗酸化剤、固化防止剤、充填剤、キレート剤、コーティング剤、化学的安定剤等もまた、特に剤形が再構成可能な形態である場合に存在し得る。好適な例示的成分としては、微結晶性セルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリソルベート８０、フェニルエチルアルコール、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルバニリン、グリセリン、フェノール、パラクロロフェノール、ゼラチン、アルブミンおよびそれらの組み合わせが挙げられる。薬学的に許容可能な賦形剤の詳細な考察は、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ（Ｍａｃｋ　Ｐｕｂ．Ｃｏ．，Ｎ．Ｊ．１９９１）（参照により本明細書に組み込まれる）を参照することができる。

【０１２０】

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

【０１２１】

本明細書のある実施形態では、送達はＡＡＶを介する。ヒトに対するＡＡＶのインビボ送達についての治療上有効な投薬量は、約１×１０$^{10}$～約１×１０$^{10}$の機能性ＡＡＶ

／ｍｌ溶液を含有する生理食塩水約２０～約５０ｍｌの範囲であると考えられる。投薬量は、治療利益と、それに対する任意の副作用との均衡をとるように調整され得る。本明細書のある実施形態では、ＡＡＶ用量は、概して、約$1\times10^{5}$～$1\times10^{50}$ゲノムのＡＡＶ、約$1\times10^{8}$～$1\times10^{20}$ゲノムのＡＡＶ、約$1\times10^{10}$～約$1\times10^{16}$ゲノム、または約$1\times10^{11}$～約$1\times10^{16}$ゲノムのＡＡＶの濃度範囲である。ヒト投薬量は約$1\times10^{13}$ゲノムのＡＡＶであってもよい。かかる濃度は、約０．００１ｍｌ～約１００ｍｌ、約０．０５～約５０ｍｌ、または約１０～約２５ｍｌの担体溶液で送達され得る。他の効果的な投薬量が、当業者により、用量反応曲線を作成する常法の試験を介して容易に確立され得る。例えば、２０１３年3月２６日に付与されたＨａｊｊａｒ，ｅｔ　ａｌ．に対する米国特許第８，４０４，６５８　Ｂ２号明細書、第２７欄第４５～６０行を参照のこと。

【０１２２】

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

【０１２３】

本明細書の用量は平均７０ｋｇの個体に基づく。投与頻度は医学または獣医学の実務者（例えば、医師、獣医師）、または当技術分野の科学者の範囲内にある。

実験に使用されるマウスは、典型的には、２０ｇとみなされ、当業者は、２０ｇのマウスから７０ｋｇの個体まで投与量を推定することができる。

【０１２４】

Ｃａｓ９および１つ以上のガイドＲＮＡは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、アデノウイルスまたは他のプラスミドもしくはウイルスベクタータイプを使用して、例えば、米国特許第８，４５４，９７２号明細書（アデノウイルス用の配合、用量）、同第８，４０４，６５８号明細書（ＡＡＶ用の配合、用量）および同第５，８４６，９４６号明細書（ＤＮＡプラスミド用の配合、用量）、ならびにレンチウイルス、ＡＡＶおよびアデノウイルスが関わる臨床試験およびそうした臨床試験に関する文献の配合および用量を使用して送達することができる。例えば、ＡＡＶについては、投与経路、配合および用量を米国特許第８，４５４，９７２号明細書にあるとおりとし、およびＡＡＶが関わる臨床試験にあるとおりとすることができる。アデノウイルスについては、投与経路、配合および用量を米国特許第８，４０４，６５８号明細書にあるとおりし、およびアデノウイルスが関わる臨床試験にあるとおりとすることができる。プラスミド送達については、投与経路、配合および用量を米国特許第５，８４６，９４６号明細書にあるとおりし、およびプラスミドが関わる臨床試験にあるとおりとすることができる。用量は、平均７０ｋｇの個体に基づくかまたはそれに対して推定してもよく、異なる体重および種の患者、対象、哺乳動物用に調整することができる。投与頻度は、患者または対象の年齢、性別、全般的な健康、他の状態ならびに対処すべき特定の状態または症状を含めた通常の要因に依存して、医学または獣医学の実務者（例えば、医師、獣医師）の範囲内にある。

【０１２５】

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

【０１２６】

ＲＮＡ送達：ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えばＣａｓ９、および／または本ＲＮＡのいずれか、例えばガイドＲＮＡはまた、ＲＮＡの形態でも送達することができる。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡはインビトロ転写を用いて作成することができる。例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、βグロビン－ポリＡテール（１２０個以上の一連のアデニン）から以下のエレメント：Ｔ７＿プロモーター－コザック配列（ＧＣＣＡＣＣ）－Ｃａｓ９－３’ＵＴＲを含むＰＣＲ

カセットを使用して合成することができる。このカセットは、Ｔ７ポリメラーゼによる転写に使用することができる。ガイドＲＮＡもまた、Ｔ７＿プロモーターＧＧガイドＲＮＡ配列を含むカセットからのインビトロ転写を用いて転写させることができる。

【０１２７】

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

【０１２８】

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

【０１２９】

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

【０１３０】

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

【０１３１】

ｍＲＮＡ送達方法は、現在、肝臓送達に特に有望である。

【０１３２】

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

【０１３３】

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

【０１３４】

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

【０１３５】

毒性およびオフターゲット効果を最小限に抑えるためには、送達されるＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡの濃度を制御することが重要となる。ＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡの最適濃度は、細胞または動物モデルで種々の濃度を試験し、ディープシーケンシングを使用して潜在的なオフターゲットゲノム遺伝子座における改変

の程度を分析することにより決定し得る。例えば、ヒトゲノムのＥＭＸ１遺伝子の５’－ＧＡＧＴＣＣＧＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＡＡ－３’を標的化するガイド配列について、ディープシーケンシングを使用して以下の２つのオフターゲット遺伝子座、すなわち１：５’－ＧＡＧＴＣＣＴＡＧＣＡＧＧＡＧＡＡＧＡＡ－３’および２：５’－ＧＡＧＴＣＴＡＡＧＣＡＧＡＡＧＡＡＧＡＡ－３’における改変レベルを評価することができる。オフターゲット改変レベルを最小限に抑えながらまたは改変の可能性を低減させて最も高いオンターゲット改変レベルが得られる濃度をインビボ送達に選択するべきである。

【０１３６】

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

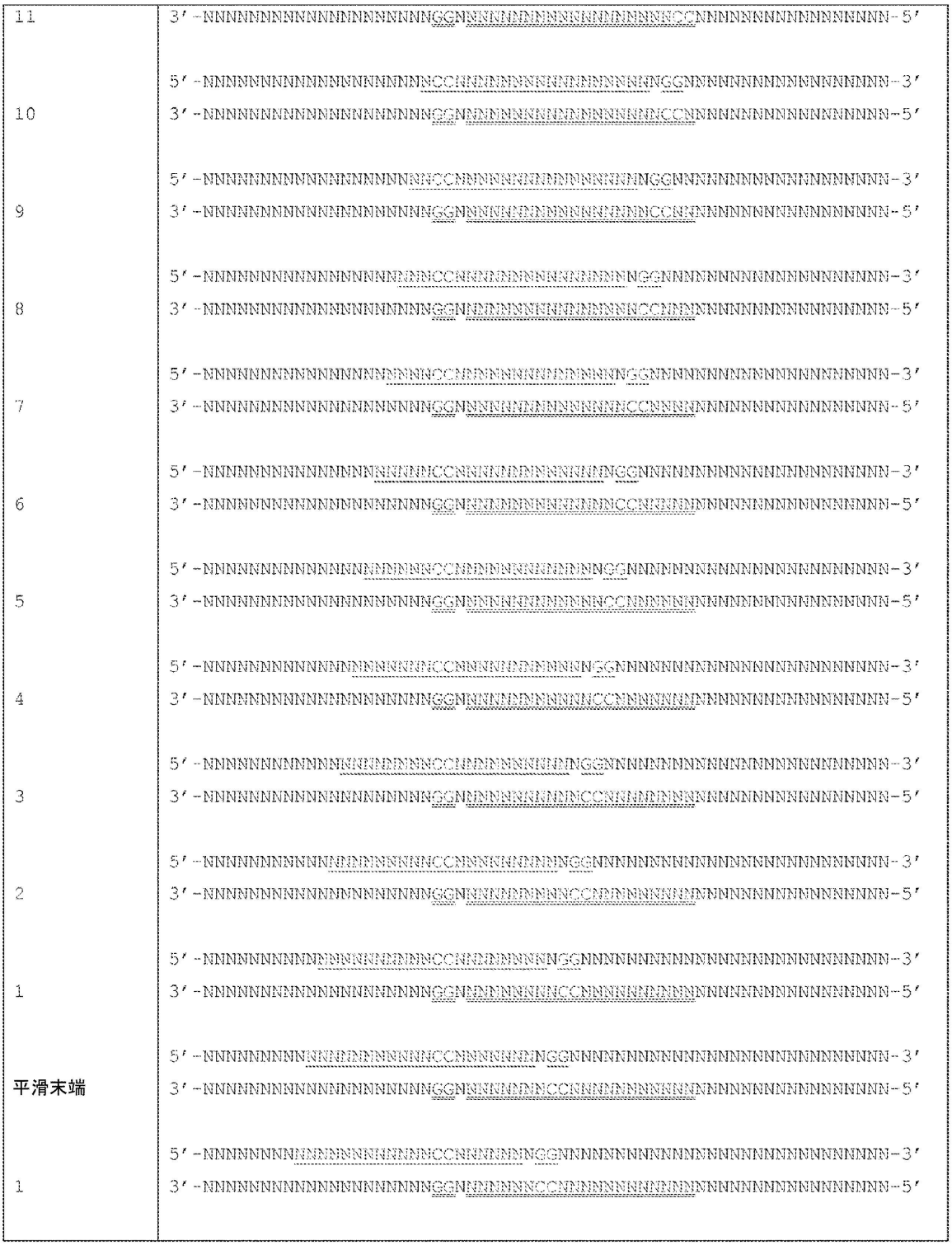
【０１３７】

【表２】

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

【０１３８】

【表３】


11
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
10
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
9
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
8
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
7
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
6
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
5
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
4
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
3
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
2
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
1
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
平滑末端
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′
5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′
1
3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′

【０１３９】

【表４】

| | |
|---|---|
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 2 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 3 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 4 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 5 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 6 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 7 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 8 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 12 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 13 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 14 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 15 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 16 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |
| | 5′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3′ |
| 17 | 3′-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCNNNNNGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5′ |

【０１４０】

この系をさらに調べることにより、出願人らは５’オーバーハングのエビデンスを得ている（例えば、Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ．２０１３　Ｓｅｐ　１２；１５４（６）：１３８０－９および２０１３年８月２８日に出願された米国仮特許出願第６１／８７１，３０１号明細書を参照のこと）。出願人らは、２つのガイドＲＮＡと組み合わせたときのＣａｓ９ニッカーゼ突然変異体による効率的な開裂に関連するパラメータをさらに同定しており、それらのパラメータには、限定はされないが５’オーバーハングの長さが含まれる。本発明の実施形態において５’オーバーハングは高々２００塩基対、好ましくは高々１００塩基対、またはより好ましくは高々５０塩基対である。本発明の実施形態にお

いて５’オーバーハングは少なくとも２６塩基対、好ましくは少なくとも３０塩基対またはより好ましくは３４～５０塩基対または１～３４塩基対である。本発明の他の好ましい方法では、第１のガイド配列が第１の標的配列の近傍でＤＮＡ二重鎖の一方の鎖の開裂を指向し、かつ第２のガイド配列が第２の標的配列の近傍で他方の鎖の開裂を指向することにより、平滑末端または３’オーバーハングが生じる。本発明の実施形態において３’オーバーハングは高々１５０、１００または２５塩基対または少なくとも１５、１０または１塩基対である。好ましい実施形態において３’オーバーハングは１～１００塩基対である。

【０１４１】

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

【０１４２】

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

【０１４３】

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

【０１４４】

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

おり、標的化ｓｉＲＮＡの静脈内投与後にインビボで脳などの遠隔部位でのＲＮＡｉ効果が観察されることも報告する。

【０１４５】

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

【０１４６】

ナノ粒子（Ｃｈｏ，Ｓ．，Ｇｏｌｄｂｅｒｇ，Ｍ．，Ｓｏｎ，Ｓ．，Ｘｕ，Ｑ．，Ｙａｎｇ，Ｆ．，Ｍｅｉ，Ｙ．，Ｂｏｇａｔｙｒｅｖ，Ｓ．，Ｌａｎｇｅｒ，Ｒ．ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｄ．，「低分子干渉ＲＮＡを内皮細胞に送達するための脂質様ナノ粒子（Ｌｉｐｉｄ－ｌｉｋｅ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｓｍａｌｌ ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ ＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｔｏ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ）」，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ，１９：３１１２－３１１８，２０１０）またはエキソソーム（Ｓｃｈｒｏｅｄｅｒ，Ａ．，Ｌｅｖｉｎｓ，Ｃ．，Ｃｏｒｔｅｚ，Ｃ．，Ｌａｎｇｅｒ，Ｒ．，ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｄ．，「ｓｉＲＮＡ送達用の脂質ベースのナノ治療薬（Ｌｉｐｉｄ－ｂａｓｅｄ ｎａｎｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ｆｏｒ ｓｉＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ）」，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２６７：９－２１，２０１０，ＰＭＩＤ：２００５９６４１）を介するなど、他の送達手段またはＲＮＡもまた好ましい。実際、エキソゾームは、いくらかＣＲＩＳＰＲ系と似たところがある系であるｓｉＲＮＡの送達において特に有用であることが示されている。例えば、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ Ｓ，ｅｔ ａｌ．（「インビトロおよびインビボでのｓｉＲＮＡのエキソソーム媒介性送達（Ｅｘｏｓｏｍｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｓｉＲＮＡ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｎｄ ｉｎ ｖｉｖｏ）」Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１２ Ｄｅｃ；７（１２）：２１１２－２６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２０１２．１３１．電子出版２０１２年１１月１５日）は、如何にエキソソームが種々の生物学的関門を越える薬物送達に有望なツールであるか、およびそれをインビトロおよびインビボでのｓｉＲＮＡの送達に利用することができるかについて記載している。この著者らの手法は、発現ベクターの形質移入によって標的化エキソソームを生成することであり、ペプチドリガンドと融合したエキソソームタンパク質が含まれる。次にエキソソームが形質移入細胞上清から精製されて特徴付けられ、次にそのエキソソームにｓｉＲＮＡが負荷される。

【０１４７】

遺伝子の標的欠失が好ましい。例を実施例１２に示す。従って、数ある障害の中でも特に、コレステロール生合成、脂肪酸生合成、および他の代謝疾患に関与する遺伝子、アミロイド病および他の疾患に関与する誤って折り畳まれたタンパク質をコードする遺伝子、細胞形質転換を生じさせる癌遺伝子、潜伏ウイルス遺伝子、およびドミナントネガティブな障害を生じさせる遺伝子が好ましい。ここで例示するとおり、本出願人らによれば、ウ

イルスまたはナノ粒子のいずれかの送達系を使用した、代謝疾患、アミロイドーシスおよびタンパク質凝集関連疾患、遺伝子突然変異および転座によって生じる細胞形質転換、遺伝子突然変異のドミナントネガティブ効果、潜伏ウイルス感染症、および他の関連症状に罹患している必要性がある対象または患者の肝臓、脳、眼、上皮、造血、または別の組織に対するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の遺伝子送達が好ましい。

【０１４８】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の治療適用としては、緑内障、アミロイドーシス、およびハンチントン病が挙げられる。これらは実施例１４に例示し、そこに記載される特徴は単独で、または組み合わせで、好ましい。

【０１４９】

例として、ＨＩＶ－１による慢性感染症が治療または予防され得る。これを達成するため、有効範囲および有効性を最大化するようにＨＩＶ－１株変異体を考慮しながら、大多数のＨＩＶ－１ゲノムを標的化するＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓガイドＲＮＡを作成し得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の送達は、従来どおり宿主免疫系のアデノウイルスまたはレンチウイルス媒介性感染により達成し得る。手法に応じて、宿主免疫細胞は、ａ）単離され、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓが形質導入され、選択され、および宿主に再導入されてもよく、またはｂ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の全身送達によりインビボで形質導入されてもよい。第１の手法は、抵抗性免疫集団の作成を可能にする一方、第２の手法は宿主内の潜伏ウイルスリザーバを標的化する傾向が強い。これは実施例の節でさらに詳細に考察する。

【０１５０】

また、本発明が遺伝子ノックアウト細胞ライブラリを作成することも想定される。各細胞が単一遺伝子のノックアウトを有し得る。これは実施例１７に例示する。

【０１５１】

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

【０１５２】

タンパク質治療薬の慢性投与は、特異的タンパク質に対する許容し難い免疫応答を誘発し得る。タンパク質薬物の免疫原性は、いくつかの免疫優性ヘルパーＴリンパ球（ＨＴＬ）エピトープに起因し得る。これらのタンパク質内に含まれるこれらのＨＴＬエピトープのＭＨＣ結合親和性を低下させると、免疫原性がより低い薬物を作成することができる（Ｔａｎｇｒｉ　Ｓ，ｅｔ　ａｌ．（「免疫原性が低い合理的にエンジニアリングされた治療用タンパク質（Ｒａｔｉｏｎａｌｌｙ　ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｗｉｔｈ　ｒｅｄｕｃｅｄ　ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｉｃｉｔｙ）」Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００５　Ｍａｒ　１５；１７４（６）：３１８７－９６）。本発明では、ＣＲＩＳＰＲ酵素の免疫原性は、詳細には、初めにＴａｎｇｒｉ　ｅｔ　ａｌに

おいてエリスロポエチンに関連して示され、続いて展開された手法に従い低下させることができる。従って、定向進化または合理的設計を使用して、宿主種（ヒトまたは他の種）におけるＣＲＩＳＰＲ酵素（例えばＣａ９）の免疫原性を低下させることができる。

【０１５３】

実施例２８において、本出願人らは３つの目的とするガイドＲＮＡを使用し、ごく一部の細胞においてのみ起こるインビボでの効率的なＤＮＡ開裂を可視化することができた。本質的に、本出願人らがここで示しているものは、標的化したインビボ開裂である。詳細にはこれは、哺乳動物などの高等生物における特異的標的化もまた達成し得るという概念実証を提供する。またこれは、複数のガイド配列（すなわち別個の標的）を（共送達という意味で）同時に使用することができる点で多重的側面も強調する。換言すれば、本出願人らは、いくつかの異なる配列が同時に、しかし独立して標的化される、多重的手法を使用した。

【０１５４】

本発明の好ましいベクターであるＡＡＶの作製プロトコルの好適な例を、実施例２９に提供する。

【０１５５】

トリヌクレオチドリピート障害は、治療するのに好ましい病態である。これらもまた本明細書において例示する。

【０１５６】

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

【０１５７】

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

【０１５８】

ＣＦＴＲΔ５０８キメラガイドＲＮＡの例に関しては実施例２２を参照されたく、この実施例は、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子を使用した、嚢胞性線維症または嚢胞性線維症（ＣＦ）関連症状に罹患している、必要性のある対象または患者の気道におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の遺伝子導入または遺伝子送達を実証する。詳細には、嚢胞性線維症ΔＦ５０８突然変異の修復戦略が例示される。この種の戦略は全生物にわたり適用されるはずである。特にＣＦに関連して、好適な患者には以下が含まれ得る：ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の家畜。この例では、本出願人らはＣａｓ９酵素を含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を利用してΔＦ５０８または他のＣＦＴＲ誘導突然変異を標的化した。

【０１５９】

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

【０１６０】

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

【０１６１】

従って、ＣＦの場合、本方法は、

組成物を発現させるため組成物を作動可能にコードする１つ以上のウイルスベクターを含むウイルスベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を送達すること

を含む目的ゲノム遺伝子座における標的配列の操作を含み、

ここでこの組成物は、

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

（ａ）好適な哺乳類細胞におけるＣＦ標的配列にハイブリダイズし得るガイド配列、

（ｂ）ｔｒａｃｒメイト配列、および

（ｃ）ｔｒａｃｒ配列

を含むポリヌクレオチド配列に作動可能に結合している第１の調節エレメント、および

ＩＩ．少なくとも１つ以上の核局在化配列を含むＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している第２の調節エレメント、

［（ａ）、（ｂ）および（ｃ）は、５’から３’配向で配置されており、

成分ＩおよびＩＩは、系の同じまたは異なるベクター上にあり、

転写されるとｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズし、かつガイド配列が標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指向し、および

ＣＲＩＳＰＲ複合体が、（１）標的配列にハイブリダイズするガイド配列、および（２）ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒメイト配列と複合体形成しているＣＲＩＳＰＲ酵素を含む］を含む１つ以上のベクターを含むベクター系を含む天然に存在しないまたはエンジニアリングされた組成物を含む。ＣＦに関して、好ましい標的ＤＮＡ配列はＣＦＴＲΔ５０８突然変異を含む。好ましいＰＡＭは上記に記載される。好ましいＣＲＩＳＰＲ酵素は任意のＣａｓ（本明細書に記載されるものであるが、特に実施例１６に記載されるもの）である。

【０１６２】

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

【０１６３】

一部の実施形態では、「ガイド配列」は「ガイドＲＮＡ」と異なり得る。ガイド配列は、ガイドＲＮＡの範囲内にある、標的部位を指定する約２０ｂｐの配列を指し得る。

【０１６４】

一部の実施形態では、Ｃａｓ９はＳｐＣａｓ９である（またはそれから誘導される）。

かかる実施形態において、好ましい突然変異は、ＳｐＣａｓ９の１０位、７６２位、８４０位、８５４位、８６３位および／または９８６位または他のＣａｓ９における対応する位置（これは例えば標準的な配列比較ツールによって確かめることができる）の一部または全部にある。詳細には、ＳｐＣａｓ９において以下の突然変異の一部または全部が好ましい：Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａおよび／またはＤ９８６Ａ；ならびに代替アミノ酸のいずれかの保存的置換も想定される。他のＣａｓ９の対応する位置における同じ（またはこれらの突然変異の保存的置換）もまた好ましい。特にＳｐＣａｓ９ではＤ１０およびＨ８４０が好ましい。しかしながら、他のＣａｓ９では、ＳｐＣａｓ９　Ｄ１０およびＨ８４０に対応する残基もまた好ましい。これらはニッカーゼ活性を提供するため有利である。

【０１６５】

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

【０１６６】

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

【０１６７】

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

【０１６８】

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

【０１６９】

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

【０１７０】

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

【０１７１】
「相補性」は、古典的ワトソン－クリック塩基対形成または他の非古典的タイプのいずれかによる別の核酸配列との水素結合を形成する核酸の能力を指す。相補性パーセントは、第２の核酸配列との水素結合（例えば、ワトソン－クリック塩基対形成）を形成し得る核酸分子中の残基の割合を示す（例えば、１０のうち５、６、７、８、９、１０は、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、および１００％の相補性である）。「完全に相補的」は、核酸配列の全ての連続残基が第２の核酸配列中の同一数の連続残基と水素結合することを意味する。本明細書において使用される「実質的に相補的」は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５、５０、またはそれよりも多いヌクレオチドの領域に対して少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、もしくは１００％である相補性の程度を指し、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする２つの核酸を指す。

【０１７２】
本明細書において使用されるハイブリダイゼーションのための「ストリンジェントな条件」は、標的配列に対する相補性を有する核酸が、標的配列と優位にハイブリダイズし、非標的配列と実質的にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、一般に、配列依存的であり、多数の因子に応じて変動する。一般に、配列が長ければ、配列がその標的配列と特異的にハイブリダイズする温度が高い。ストリンジェントな条件の非限定的な例は、Ｔｉｊｓｓｅｎ（１９９３），Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ Ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ－Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ｗｉｔｈ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｐｒｏｂｅｓ Ｐａｒｔ Ｉ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｃｈａｐｔｅｒ“Ｏｖｅｒｖｉｅｗ ｏｆ ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔｈｅ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｏｆ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｐｒｏｂｅ ａｓｓａｙ”，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．に詳述されている。ポリヌクレオチド配列に言及がなされる場合、相補的なまたは部分的に相補的な配列もまた想定される。それらは好ましくは、高度にストリンジェントな条件下で参照配列にハイブリダイズし得る。概して、ハイブリダイゼーション速度を最大化するためには、比較的低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件が選択される：熱的融点（$T_m$）より約２０～２５℃低い。$T_m$は、特定の標的配列の５０％が規定のイオン強度およびｐＨの溶液中で完全に相補的なプローブとハイブリダイズする温度である。概して、ハイブリダイズされる配列の少なくとも約８５％のヌクレオチド相補性を求めるためには、$T_m$より約５～１５℃低い高度にストリンジェントな洗浄条件が選択される。ハイブリダイズされる配列の少なくとも約７０％のヌクレオチド相補性を求めるためには、$T_m$より約１５～３０℃低い中程度にストリンジェントな洗浄条件が選択される。高度に許容的な（極めて低いストリンジェンシーの）洗浄条件は、$T_m$より５０℃も低いものであってよく、ハイブリダイズされる配列間における高度のミスマッチを許容する。当業者は、標的配列とプローブ配列との間の具体的な相同性レベルによる検出可能なハイブリダイゼーションシグナルの結果に影響が及ぶように、ハイブリダイゼーション工程および洗浄工程における他の物理的および化学的パラメータもまた変更し得ることを認識するであろう。好ましい高度にストリンジェントな条件は、５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ、および１％ＳＤＳ、４２℃でのインキュベーション、または５×ＳＳＣおよび１％ＳＤＳ、６５℃でのインキュベーションと、０．２×ＳＳＣおよび０．１％ＳＤＳ、６５℃での洗浄を含む。

【０１７３】
「ハイブリダイゼーション」は、１つ以上のポリヌクレオチドが反応してヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化される複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対形成、フーグスティーン結合により、または任意の他の配列特異的様式で生じ得る。複合体は、二本鎖構造を形成する２つの鎖、多重鎖複合体を形成する３つ以上の鎖、単一の自己ハイブリダイズする鎖、またはそれらの任意の組合せを含

み得る。ハイブリダイゼーション反応は、より広範なプロセス、例えば、ＰＣＲの開始、または酵素によるポリヌクレオチドの開裂におけるステップを構成し得る。所与の配列とハイブリダイズし得る配列は、所与の配列の「相補鎖」と称される。

【０１７４】

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

【０１７５】

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

【０１７６】

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

【０１７７】

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

【０１７８】

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

【０１７９】
配列相同性は、当該技術分野において公知の多くのコンピュータプログラムのいずれか、例えばＢＬＡＳＴまたはＦＡＳＴＡ等により生成し得る。かかるアラインメントの実行に好適なコンピュータプログラムは、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージである（ウィスコンシン大学（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）、米国；Ｄｅｖｅｒｅｕｘ ｅｔ ａｌ．，１９８４，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １２：３８７）。配列比較を実施し得る他のソフトウェアの例としては、限定はされないが、ＢＬＡＳＴパッケージ（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９９ 前掲書－Ｃｈａｐｔｅｒ １８を参照）、ＦＡＳＴＡ（Ａｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，４０３－４１０）およびＧＥＮＥＷＯＲＫＳスイートの比較ツールが挙げられる。ＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡは両方とも、オフラインおよびオンライン検索に利用可能である（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９９ 前掲書，７－５８～７－６０頁を参照）。しかしながら、ＧＣＧ Ｂｅｓｔｆｉｔプログラムを使用することが好ましい。

【０１８０】
パーセンテージ（％）配列相同性は連続する配列にわたり計算することができ、すなわち１つの配列が他の配列と整列され、一方の配列の各アミノ酸またはヌクレオチドが他方の配列の対応するアミノ酸またはヌクレオチドと一度に１個の残基ずつ直接比較される。これは「ギャップなし」アラインメントと呼ばれる。典型的には、かかるギャップなしアラインメントは比較的少ない数の残基にわたってのみ実施される。

【０１８１】
これは極めて単純かつ一貫した方法であるが、例えば、本来同一である配列ペアにおいて、１つの挿入または欠失によって続くアミノ酸残基のアラインメントにずれが生じ、ひいては大域的アラインメントの実行時に％相同性が大幅に低下する可能性がある点を考慮に入れることができない。結果的に、多くの配列比較方法が、全体的な相同性または同一性スコアを過度に不利にすることなく可能性のある挿入および欠失を考慮に入れる最適アラインメントを作製するように設計される。これは配列アラインメントに「ギャップ」を挿入して局所的な相同性または同一性を最大化しようとすることにより達成される。

【０１８２】
しかしながら、これらのより複雑な方法では、アラインメントに現れる各ギャップに「ギャップペナルティー」が割り当てられ、従って、同じ数の同一アミノ酸について、可能な限り少ないギャップ－２つの比較される配列間のより高い関連性を反映する－を有する配列アラインメント程、多くのギャップを有するものより高いスコアを達成し得る。ギャップの存在に比較的高いコストを課し、ギャップにおける後続の各残基により小さいペナルティーを課す「アフィニティーギャップコスト」が典型的に使用される。これは最も一般的に用いられるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティーは、当然ながらギャップがより少ない最適化されたアラインメントを生じ得る。多くのアラインメントプログラムでギャップペナルティーを変更することが可能である。しかしながら、配列比較にかかるソフトウェアを使用する際にはデフォルト値を使用することが好ましい。例えば、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージを使用する場合、アミノ酸配列に関するデフォルトのギャップペナルティーは、ギャップが－１２、および各伸長が－４である。

【０１８３】
従って最大％相同性の計算は、初めにギャップペナルティーを考慮して最適アラインメントを作成することが必要である。かかるアラインメントの実行に好適なコンピュータプログラムは、ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｅｓｔｆｉｔパッケージ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘ ｅｔ ａｌ．，１９８４ Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １２ ｐ３８７）である。配列比較を実施し得る他のソフトウェアの例としては、限定はされないが、ＢＬＡＳＴパッケージ（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９９ Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，４ｔｈ Ｅｄ．－Ｃｈａｐｔ

ｅｒ １８を参照）、ＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，１９９０ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４０３－４１０）およびＧＥＮＥＷＯＲＫＳスイートの比較ツールが挙げられる。ＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡは両方とも、オフラインおよびオンライン検索に利用可能である（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，７－５８～７－６０頁を参照）。しかしながら、用途によってはＧＣＧ Ｂｅｓｔｆｉｔプログラムを使用することが好ましい。ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓと呼ばれる新規ツールもまたタンパク質およびヌクレオチド配列の比較に利用可能である（ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ．１９９９ １７４（２）：２４７－５０；ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ．１９９９ １７７（１）：１８７－８および米国国立衛生研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｆｏｒ Ｈｅａｌｔｈ）のウェブサイトにある国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）のウェブサイトを参照）。

【０１８４】

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

【０１８５】

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

【０１８６】

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

【０１８７】

【表５】

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

【０１８８】

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

【０１８９】

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

【０１９０】

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

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

【0191】

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

【0192】

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

【0193】

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

【0194】

本発明の態様は、キメラRNAおよびCas９用のベクターに関する。キメラRNAおよびCas９用のバイシストロニック発現ベクターが好ましい。概して、および特に、この実施形態においてCas９は好ましくはCBhプロモーターによりドライブされる。キメラRNAは、好ましくはU６プロモーターによりドライブされ得る。理想的にはこの２つが組み合わされる。キメラガイドRNAは、典型的には２０bpのガイド配列（N）か

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

【０１９５】

一実施形態において、Ｕ６プロモーターは、二方向プロモーターであり得る。図５２は、データのパネルを示す：第１のデータは、二方向Ｕ６プロモーターの異なるトランケーションおよび関連する微小欠失活性を示し、第２のデータは、二方向プロモーターのいずれかの側から生じるインデル誘導活性を定量する。図５２は、タンデムｓｇＲＮＡアプローチから独立し、それを補完する単一Ｕ６プロモーターから２つの独立ｓｇＲＮＡを送達することが可能であるさらに別の手段を表す。Ｕ６プロモーターのサイズの増加は最小であり、このことにより、ベクターサイズが顕著な拘束を表すインビボ／ＡＡＶ送達適用にこれが適し、魅力的となる。順方向のＵ６－１プロモーターの末端間の結合および逆方向のＵ６－８プロモーターのトランケーションバージョンからなる、両方向で良好な機能を保持する最小Ｕ６－８／Ｕ６－１二方向レポーターの配列（図５３参照）。さらにこれは、タンデムｓｇＲＮＡアーキテクチャの現行の繰り返しにおいて第１のスペーサーが第２のものより顕著に良好に機能する傾向にある問題に対処し得る。それというのも、独立ｓｇＲＮＡのプロセシングは二方向Ｕ６アプローチについては行う必要がないためである。例えば、二方向プロモーターに関する追加の開示については国際公開第２００５０３５７１８号パンフレット参照。

【０１９６】

用語「調節エレメント」は、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナルおよびポリＵ配列などの転写終結シグナル）を含むことが意図される。かかる調節エレメントは、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ，ＧＥＮＥ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ　ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ　１８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）に記載される。調節エレメントには、多くのタイプの宿主細胞でヌクレオチド配列の構成的発現を指図するもの、および特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指図するもの（例えば組織特異的調節配列）が含まれる。組織特異的プロモーターは、主として所望される目的の組織、例えば、筋肉、ニューロン、骨、皮膚、血液、特定の臓器（例えば肝臓、膵臓）など、または特定の細胞型（例えばリンパ球）における発現を指図し得る。調節エレメントはまた、細胞周期依存的または発生段階依存的様式など、時間依存的様式での発現も指図することができ、これは同時に組織または細胞型特異的であっても、またはそうでなくてもよい。一部の実施形態では、ベクターは、１つ以上のｐｏｌ　Ｉプロモーター（例えば１、２、３、４、５つ、またはそれ以上のｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター）、１つ以上のｐｏｌ　ＩＩプロモーター（例えば１、２、３、４、５つ、またはそれ以上のｐｏｌ　ＩＩプロモーター）、１つ以上のｐｏｌ　Ｉプロモーター（例えば１、２、３、４、５つ、またはそれ以上のｐ

ｏｌ　Ｉプロモーター）、またはそれらの組み合わせを含む。ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターの例としては、限定はされないが、Ｕ６およびＨ１プロモーターが挙げられる。ｐｏｌ　ＩＩプロモーターの例としては、限定はされないが、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモーター（場合によりＲＳＶエンハンサーを伴う）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター（場合によりＣＭＶエンハンサーを伴う）［例えば、Ｂｏｓｈａｒｔ　ｅｔ　ａｌ，Ｃｅｌｌ，４１：５２１－５３０（１９８５）を参照］、ＳＶ４０プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、β－アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、およびＥＦ１αプロモーターが挙げられる。また、エンハンサーエレメント、例えばＷＰＲＥ；ＣＭＶエンハンサー；ＨＴＬＶ－ＩのＬＴＲにおけるＲ－Ｕ５’セグメント（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，Ｖｏｌ．８（１），ｐ．４６６－４７２，１９８８）；ＳＶ４０エンハンサー；およびウサギβ－グロビンのエクソン２と３との間のイントロン配列（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，Ｖｏｌ．７８（３），ｐ．１５２７－３１，１９８１）も用語「調節エレメント」に包含される。発現ベクターの設計が、形質転換する宿主細胞の選択、所望の発現レベルなどの要因に依存し得ることは、当業者によって理解されるであろう。ベクターを宿主細胞に導入し、それにより本明細書に記載されるとおり核酸によってコードされる転写物、タンパク質、またはペプチド、例えば融合タンパク質またはペプチド（例えば、クラスター化等間隔短鎖回分リピート（ＣＲＩＳＰＲ）転写物、タンパク質、酵素、それらの突然変異形態、それらの融合タンパク質等）を産生させることができる。調節配列に関しては、米国特許出願第１０／４９１，０２６号明細書が参照される（その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）。プロモーターに関しては、国際公開第２０１１／０２８９２９号パンフレットおよび米国特許出願第１２／５１１，９４０号明細書が参照される（その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）。

【０１９７】

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

【０１９８】

ベクターは、原核生物または原核細胞中に導入し、その中で増殖させることができる。一部の実施形態において、原核生物を使用して真核細胞中に導入すべきベクターのコピーを増幅し、または真核細胞中に導入すべきベクターの産生における中間ベクターとして使用される（例えば、ウイルスベクターパッケージング系の一部としてプラスミドを増幅）。一部の実施形態において、原核生物を使用してベクターのコピーを増幅し、１つ以上の核酸を発現させ、例えば、宿主細胞または宿主生物への送達のための１つ以上のタンパク質の資源を提供する。原核生物中のタンパク質の発現は、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）中で、融合または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的または誘導的プロモーターを含有するベクターを用いて実施されることが最も多い。融合ベクターは、多数のアミノ酸をそれにコードされるタンパク質に、例えば、組換えタンパク質のアミノ末端に付加する。このような融合ベクターは、１つ以上の目的、例えば、（ｉ）組換えタンパク質の発現の増加；（ｉｉ）組換えタンパク質の溶解度の増加；および（ｉｉｉ）親和性精製におけるリガンドとして作用することによる組換えタンパク質の精製の支援を果たし得る。融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解開裂部位を融合部分および組換えタンパク質の接合部に導入して融合タンパク質の精製後に融合部分からの組換

えタンパク質の分離を可能とすることが多い。このような酵素、およびそのコグネート認識配列としては、Ｘａ因子、トロンビンおよびエンテロキナーゼが挙げられる。例示的融合発現ベクターとしては、ｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ；Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｊｏｈｎｓｏｎ，１９８８．Ｇｅｎｅ ６７：３１－４０）、ｐＭＡＬ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，Ｍａｓｓ．）およびｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）が挙げられ、それぞれ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質、またはプロテインＡを標的組換えタンパク質に融合する。

【０１９９】

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

【０２００】

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

【０２０１】

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

【０２０２】

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

【０２０３】

一部の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞タイプ中の核酸の発現を優先的に指向し得る（例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現させる）。組織特異的調節エレメントは、当技術分野において公知である。好適な組織特

異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Ｐｉｎｋｅｒｔ，ｅｔ ａｌ．，１９８７．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１：２６８－２７７）、リンパ系特異的プロモーター（Ｃａｌａｍｅ ａｎｄ Ｅａｔｏｎ，１９８８．Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５）、特にＴ細胞受容体のプロモーター（Ｗｉｎｏｔｏ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８９．ＥＭＢＯ Ｊ．８：７２９－７３３）および免疫グロブリン（Ｂａｎｅｉｊｉ，ｅｔ ａｌ．，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７２９－７４０；Ｑｕｅｅｎ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７４１－７４８）、神経細胞特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；Ｂｙｒｎｅ ａｎｄ Ｒｕｄｄｌｅ，１９８９．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５４７３－５４７７）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄ，ｅｔ ａｌ．，１９８５．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２－９１６）、および乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター；米国特許第４，８７３，３１６号明細書および欧州特許出願公開第２６４，１６６号明細書）が挙げられる。発生制御プロモーター、例えば、ネズミｈｏｘプロモーター（Ｋｅｓｓｅｌ ａｎｄ Ｇｒｕｓｓ，１９９０．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３７４－３７９）およびα－フェトタンパク質プロモーター（Ｃａｍｐｅｓ ａｎｄ Ｔｉｌｇｈｍａｎ，１９８９．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：５３７－５４６）も包含される。これらの原核生物および真核生物ベクターに関しては、米国特許第６，７５０，０５９号明細書（その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）が参照される。本発明の他の実施形態はウイルスベクターの使用に関するものであってよく、これに関しては米国特許出願第１３／０９２，０８５号明細書（その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）が参照される。組織特異的調節エレメントは当該技術分野において公知であり、これに関しては米国特許第７，７７６，３２１号明細書（その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる）が参照される。

【０２０４】

一部の実施形態において、調節エレメントは、ＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上のエレメントの発現をドライブするようにＣＲＩＳＰＲ系の１つ以上のエレメントに作動可能に結合している。一般に、ＣＲＩＳＰＲ（クラスター化等間隔短鎖回分リピート）は、ＳＰＩＤＲ（スペーサー散在型ダイレクトリピート（ＳＰａｃｅｒ Ｉｎｔｅｒｓｐｅｒｓｅｄ Ｄｉｒｅｃｔ Ｒｅｐｅａｔ））としても公知であり、通常、特定の細菌種に特異的であるＤＮＡ遺伝子座のファミリーを構成する。ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中で認識された区別されるクラスの散在型短鎖配列リピート（ＳＳＲ）（Ｉｓｈｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１６９：５４２９－５４３３［１９８７］；およびＮａｋａｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１７１：３５５３－３５５６［１９８９］）および関連遺伝子を含む。類似の散在型ＳＳＲが、ハロフェラックス・メディテラネイ（Ｈａｌｏｆｅｒａｘ ｍｅｄｉｔｅｒｒａｎｅｉ）、化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）、および結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）中で同定されている（Ｇｒｏｅｎｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１０：１０５７－１０６５［１９９３］；Ｈｏｅ ｅｔ ａｌ．，Ｅｍｅｒｇ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．，５：２５４－２６３［１９９９］；Ｍａｓｅｐｏｈｌ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ １３０７：２６－３０［１９９６］；およびＭｏｊｉｃａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１７：８５－９３［１９９５］参照）。ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、典型的には他のＳＳＲとリピートの構造が異なり、それは短鎖等間隔リピート（ＳＲＳＲ）と称されている（Ｊａｎｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，ＯＭＩＣＳ Ｊ．Ｉｎｔｅｇ．Ｂｉｏｌ．，６：２３－３３［２００２］；およびＭｏｊｉｃａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，３６：２４４－２４６［２０００］）。一般に、リピートは、実質的に一定の長さを有するユニーク介入配列により等間隔とされているクラスターで生じる短いエレメントである（Ｍｏｊｉｃａ ｅｔ ａｌ．，［２０００］、前掲）。リピート配列は株間で高度に保存されているが、散在型リピートの数およびスペーサー領域の配列は、典型的には、株ごとに異なる（ｖａｎ Ｅｍ

ｂｄｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１８２：２３９３－２４０１［２０００］）。ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、４０を超える原核生物中で同定されており（例えば、Ｊａｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，４３：１５６５－１５７５［２００２］；およびＭｏｊｉｃａ ｅｔ ａｌ．，［２００５］参照）、例として、限定されるものではないが、アエロパイラム属（Ａｅｒｏｐｙｒｕｍ）、パイロバキュラム属（Ｐｙｒｏｂａｃｕｌｕｍ）、スルフォロバス属（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ）、アーケオグロバス属（Ａｒｃｈａｅｏｇｌｏｂｕｓ）、ハロカーキュラ属（Ｈａｌｏｃａｒｃｕｌａ）、メタノバクテリウム属（Ｍｅｔｈａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、メタノコッカス属（Ｍｅｔｈａｎｏｃｏｃｃｕｓ）、メタノサルシナ属（Ｍｅｔｈａｎｏｓａｒｃｉｎａ）、メタノパイラス属（Ｍｅｔｈａｎｏｐｙｒｕｓ）、パイロコッカス属（Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ）、ピクロフィラス属（Ｐｉｃｒｏｐｈｉｌｕｓ）、サーモプラズマ属（Ｔｈｅｒｍｏｐｌａｓｍａ）、コリネバクテリウム属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、マイコバクテリウム属（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ストレプトマイセス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）、アキフェックス属（Ａｑｕｉｆｅｘ）、ポーフィロモナス属（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ）、クロロビウム属（Ｃｈｌｏｒｏｂｉｕｍ）、サーマス属（Ｔｈｅｒｍｕｓ）、バシラス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、リステリア属（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、スタフィロコッカス属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、クロストリジウム属（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）、サーモアナエロバクター属（Ｔｈｅｒｍｏａｎａｅｒｏｂａｃｔｅｒ）、マイコプラズマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）、フソバクテリウム属（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、アザーカス属（Ａｚａｒｃｕｓ）、クロモバクテリウム属（Ｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ネイセリア属（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）、ニトロソモナス属（Ｎｉｔｒｏｓｏｍｏｎａｓ）、デスルフォビブリオ属（Ｄｅｓｕｌｆｏｖｉｂｒｉｏ）、ジオバクター属（Ｇｅｏｂａｃｔｅｒ）、ミクソコッカス属（Ｍｙｘｏｃｏｃｃｕｓ）、カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）、ウォリネラ属（Ｗｏｌｉｎｅｌｌａ）、アシネトバクター属（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、エルウィニア属（Ｅｒｗｉｎｉａ）、エシェリキア属（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、レジオネラ属（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）、メチロコッカス属（Ｍｅｔｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）、パスツレラ属（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ）、フォトバクテリウム属（Ｐｈｏｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、キサントモナス属（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ）、エルシニア属（Ｙｅｒｓｉｎｉａ）、トレポネーマ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）、およびサーモトガ属（Ｔｈｅｒｍｏｔｏｇａ）である。

【０２０５】

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

胞質中に局在している。
【０２０６】
一部の実施形態では、以下の基準の一部または全部を満たす反復モチーフを検索することにより、インシリコでダイレクトリピートが同定され得る：
１．ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座に隣接するゲノム配列の２Ｋｂウィンドウに存在する；
２．２０～５０ｂｐにわたる；および
３．２０～５０ｂｐの間隔が置かれている。
【０２０７】
一部の実施形態では、これらの基準のうち２つ、例えば１および２、２および３、または１および３が使用されてもよい。一部の実施形態では、３つ全ての基準が使用されてもよい。
【０２０８】
一部の実施形態では、続いて以下の基準の一部または全部を満たす配列により候補ｔｒａｃｒＲＮＡが予測され得る：
１．ダイレクトリピートとの配列相同性（最大１８ｂｐのミスマッチを含むＧｅｎｅｉｏｕｓにおけるモチーフ検索）；
２．転写方向における予測されたＲｈｏ非依存性転写ターミネーターの存在；および
３．ｔｒａｃｒＲＮＡとダイレクトリピートとの間の安定したヘアピン二次構造。
【０２０９】
一部の実施形態では、これらの基準のうち２つ、例えば１および２、２および３、または１および３が使用されてもよい。一部の実施形態では、３つ全ての基準が使用されてもよい。
【０２１０】
一部の実施形態では、キメラ合成ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）設計が、ダイレクトリピートとｔｒａｃｒＲＮＡとの間に少なくとも１２ｂｐの二重鎖構造を組み込み得る。
【０２１１】
本発明の好ましい実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ系はＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系であり、Ｃａｓ酵素は、ＤＮＡ開裂を触媒するＣａｓ９である。化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）に由来するＣａｓ９または任意の近縁のＣａｓ９による酵素作用は、ガイド配列の２０ヌクレオチドにハイブリダイズしかつ標的配列の２０ヌクレオチドに続いてプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列（例としては、ＮＧＧ／ＮＲＧまたは本明細書に記載されるとおり決定され得るＰＡＭが挙げられる）を有する標的部位配列に二本鎖切断を生じさせる。部位特異的ＤＮＡ認識および開裂のためのＣａｓ９を介したＣＲＩＳＰＲ活性は、ガイド配列、一部がガイド配列にハイブリダイズするｔｒａｃｒ配列およびＰＡＭ配列によって規定される。ＣＲＩＳＰＲ系のさらなる態様が、Ｋａｒｇｉｎｏｖ　ａｎｄ　Ｈａｎｎｏｎ，「ＣＲＩＳＰＲ系：細菌および古細菌における低分子ＲＮＡガイド防御（Ｔｈｅ　ＣＲＩＳＰＲ　ｓｙｓｔｅｍ：ｓｍａｌｌ　ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ　ｄｅｆｅｎｃｅ　ｉｎ　ｂａｃｔｅｒｉａ　ａｎｄ　ａｒｃｈａｅａ）」，Ｍｏｌｅ　Ｃｅｌｌ　２０１０，Ｊａｎｕａｒｙ　１５；３７（１）：７に記載される。
【０２１２】
化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ＳＦ３７０由来のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座、これは、４つの遺伝子Ｃａｓ９、Ｃａｓ１、Ｃａｓ２、およびＣｓｎ１のクラスター、ならびに２つの非コードＲＮＡエレメント、ｔｒａｃｒＲＮＡおよび短い一続きの非反復配列（スペーサー、各約３０ｂｐ）が間に置かれた反復配列（ダイレクトリピート）の特徴的アレイを含む。この系では、標的化されたＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）が４段階の逐次的なステップで作成される（図２Ａ）。第一に、２つの非コードＲＮＡ、プレｃｒＲＮＡアレイおよびｔｒａｃｒＲＮＡが、ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座から転写される。第二に、ｔｒａｃｒＲＮＡがプレｃｒＲＮＡのダイレクトリピートにハイブリダイズし、次にはこれがプロセシングされて、個々のスペーサー配列を含む成熟ｃ

ｒＲＮＡとなる。第三に、成熟ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体が、ｃｒＲＮＡのスペーサー領域とプロトスペーサーＤＮＡとの間のヘテロ二重鎖形成によって、プロトスペーサーおよび対応するＰＡＭからなるＤＮＡ標的にＣａｓ９を仕向ける。最後に、Ｃａｓ９がＰＡＭの上流で標的ＤＮＡの開裂を媒介することにより、プロトスペーサー内にＤＳＢが作り出される（図２Ａ）。図２Ｂは、コドン最適化Ｃａｓ９の核局在を実証する。正確な転写開始を促進するため、ｔｒａｃｒＲＮＡの発現の駆動にＲＮＡポリメラーゼＩＩＩベースのＵ６プロモーターが選択された（図２Ｃ）。同様に、単一のスペーサーと、それに隣接する２つのダイレクトリピート（ＤＲ、用語「ｔｒａｃｒメイト配列」にも包含される；図２Ｃ）からなるプレｃｒＲＮＡアレイを発現させるため、Ｕ６プロモーターベースの構築物が開発された。初期のスペーサーは、大脳皮質の発生に重要な遺伝子であるヒトＥＭＸ１遺伝子座における３３塩基対（ｂｐ）の標的部位（３０ｂｐプロトスペーサー＋Ｃａｓ９のＮＧＧ認識モチーフを満たす３ｂｐ　ＣＲＩＳＰＲモチーフ（ＰＡＭ）配列）をターゲティングするように設計された、（図２Ｃ）。

【０２１３】

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

【０２１４】

一部の実施形態において、ベクターは、１つ以上の挿入部位、例えば、制限エンドヌクレアーゼ認識配列（「クローニング部位」とも称される）を含む。一部の実施形態において、１つ以上の挿入部位（例えば、約または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれよりも多い数を超える挿入部位）は、１つ以上のベクターの１つ以上の配列エレメントの上流および／または下流に局在している。一部の実施形態において、ベクターは、ｔｒａｃｒメイト配列の上流、および場合によりｔｒａｃｒメイト配列に作動可

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

【０２１５】

一部の実施形態において、ベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えば、Ｃａｓタンパク質をコードする酵素コード配列に作動可能に結合している調節エレメントを含む。Ｃａｓタンパク質の非限定的な例としては、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１およびＣｓｘ１２としても公知）、Ｃａｓ１０、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、それらのホモログ、またはそれらの改変バージョンが挙げられる。一部の実施形態において、非改変ＣＲＩＳＰＲ酵素は、ＤＮＡ開裂活性を有し、例えば、Ｃａｓ９である。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の局在における、例えば、標的配列内および／または標的配列の相補鎖内の一方または両方の鎖の開裂を指向する。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の最初または最後のヌクレオチドからの約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、５０、１００、２００、５００、またはそれよりも多い塩基対内の一方または両方の鎖の開裂を指向する。一部の実施形態において、ベクターは、対応する野生型酵素に対して突然変異しているＣＲＩＳＰＲ酵素をコードし、その結果、突然変異ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を開裂する能力を欠く。例えば、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）からのＣａｓ９のＲｕｖＣ　Ｉ触媒ドメイン中のアスパラギン酸からアラニンへの置換（Ｄ１０Ａ）は、Ｃａｓ９を両方の鎖を開裂するヌクレアーゼからニッカーゼ（一本鎖を開裂する）に変換する。Ｃａｓ９をニッカーゼに変える突然変異の他の例としては、限定されるものではないが、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、およびＮ８６３Ａが挙げられる。さらなる例として、Ｃａｓ９の２つ以上の触媒ドメイン（ＲｕｖＣ　Ｉ、ＲｕｖＣ　ＩＩ、およびＲｕｖＣ　ＩＩＩまたはＨＮＨドメイン）を突然変異させて全てのＤＮＡ開裂活性を実質的に欠く突然変異Ｃａｓ９を産生することができる。一部の実施形態において、Ｄ１０Ａ突然変異を、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、またはＮ８６３Ａ突然変異の１つ以上と組み合わせて全てのＤＮＡ開裂活性を実質的に欠くＣａｓ９酵素を産生する。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、突然変異酵素のＤＮＡ開裂活性がその非突然変異形態に対して約２５％、１０％、５％、１％、０．１％、０．０１％、またはそれよりも小さい数未満である場合、全てのＤＮＡ開裂活性を実質的に欠くとみなす。

【０２１６】

ＳｐＣａｓ９のＲｕｖＣ　Ｉ触媒ドメインにおけるアスパラギン酸からアラニンへの置換（Ｄ１０Ａ）をエンジニアリングしてヌクレアーゼをニッカーゼに変換し（ＳｐＣａｓ９ｎ）（例えば、Ｓａｐｒａｎａｕｓｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，３９：９２７５；Ｇａｓｉｕｎａｓ　ｅｔ　ａｌ．，２

０１２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１０９：Ｅ２５７９を参照）、ニックの入ったゲノムＤＮＡが高フィデリティ相同性組換え修復（ＨＤＲ）を起こすようにした。Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイにより、ＳｐＣａｓ９ｎがＥＭＸ１プロトスペーサー標的にインデルを生成しないことが確認された。ＥＭＸ１ターゲティングキメラｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ成分も同様に有する）をＳｐＣａｓ９と同時発現させると標的部位にインデルが生じたが、ＳｐＣａｓ９ｎとの同時発現では生じなかった（ｎ＝３）。さらに、３２７個のアンプリコンのシーケンシングでは、ＳｐＣａｓ９ｎによって誘導されたインデルは検出されなかった。同じ遺伝子座を選択して、ＥＭＸ１を標的とするキメラＲＮＡ、ｈＳｐＣａｓ９またはｈＳｐＣａｓ９ｎ、ならびに一対の制限部位（ＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｈｅＩ）をプロトスペーサー近傍に導入するためのＨＲテンプレートをＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に同時形質移入することにより、ＣＲＩＳＰＲ媒介性ＨＲを試験した。

【０２１７】

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

【０２１８】

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

【０２１９】

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

【０２２０】

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

【０２２１】

一般に、コドン最適化は、天然配列の少なくとも１つのコドン（例えば、約または約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０、またはそれよりも多い数を超えるコドン）を、その宿主細胞の遺伝子中で使用されるより高頻度または最も高頻度のコドンにより置き換える一方、天然アミノ酸配列を維持することにより目的宿主細胞中の発現の向上のために核酸配列を改変するプロセスを指す。種々の種は、特定のアミノ酸のあるコドンについて特定のバイアスを示す。コドンバイアス（生物間のコドン使用頻度の差）は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳の効率と相関することが多く、このことは、次いで、とりわけ、翻訳されるコドンの特性および特定のトランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）分子の利用可能性に依存的であると考えられる。細胞中で選択されるｔＲＮＡの優位性

は、一般に、ペプチド合成において最も高頻度で使用されるコドンの反映である。したがって、遺伝子は、コドン最適化に基づき所与の生物中の最適な遺伝子発現のために調整することができる。コドン使用頻度表は、例えば、ｗｗｗ．ｋａｚｕｓａ．ｏｒｊｐ／ｃｏｄｏｎ／（２００２年７月９日にアクセス）で入手可能な「コドン使用頻度データベース」において容易に入手可能であり、これらの表は、多数の手法で適応させることができる。Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｙ．，ｅｔ ａｌ．“Ｃｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ ｔａｂｕｌａｔｅｄ ｆｒｏｍ ｔｈｅ ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｄａｔａｂａｓｅｓ：ｓｔａｔｕｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｙｅａｒ ２０００”Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８：２９２（２０００）参照。特定の宿主細胞中の発現のために特定の配列をコドン最適化するためのコンピュータアルゴリズムも入手可能であり、例えば、Ｇｅｎｅ Ｆｏｒｇｅ（Ａｐｔａｇｅｎ；Ｊａｃｏｂｕｓ，ＰＡ）も入手可能である。一部の実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする配列中の１つ以上のコドン（例えば、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０、またはそれよりも多い、または全てのコドン）は、特定のアミノ酸について最も高頻度で使用されるコドンに対応する。

【０２２２】

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

【０２２３】

一般に、１つ以上のＮＬＳは、真核細胞の核中の検出可能な量のＣＲＩＳＰＲ酵素の蓄積をドライブするために十分な強度である。一般に、核局在化活性の強度は、ＣＲＩＳＰＲ酵素中のＮＬＳの数、使用される特定のＮＬＳ、またはそれらの因子の組合せに由来し得る。核中の蓄積の検出は、任意の好適な技術により実施することができる。例えば、検

出可能なマーカーをＣＲＩＳＰＲ酵素に融合させることができ、その結果、細胞内の局在を、例えば、核の局在を検出する手段（例えば、核に特異的な染色、例えば、ＤＡＰＩ）との組合せで可視化することができる。細胞核を細胞から単離することもでき、次いでその含有物を、タンパク質を検出する任意の好適なプロセス、例えば、免疫組織学的分析、ウエスタンブロット、または酵素活性アッセイにより分析することができる。核中の蓄積は、例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体形成の効果についてのアッセイ（例えば、標的配列におけるＤＮＡ開裂もしくは突然変異についてのアッセイ、またはＣＲＩＳＰＲ複合体形成および／もしくはＣＲＩＳＰＲ酵素活性により影響される遺伝子発現活性の変化についてのアッセイ）により、ＣＲＩＳＰＲ酵素にも複合体にも曝露されず、または１つ以上のＮＬＳを欠くＣＲＩＳＰＲ酵素に曝露される対照と比較して間接的に測定することもできる。

【０２２４】

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

【０２２５】

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

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

【０２２６】

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

【０２２７】

一般に、ｔｒａｃｒメイト配列は、（１）対応するｔｒａｃｒ配列を含有する細胞中でｔｒａｃｒメイト配列によりフランキングされているガイド配列の切り出し；および（２）標的配列におけるＣＲＩＳＰＲ複合体の形成（ＣＲＩＳＰＲ複合体は、ｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズされるｔｒａｃｒメイト配列を含む）の１つ以上を促進するためにｔｒａｃｒ配列との十分な相補性を有する任意の配列を含む。一般に、相補性の程度は、２つの配列の短い方の長さに沿うｔｒａｃｒメイト配列およびｔｒａｃｒ配列の最適なアラインメントに準拠する。最適なアラインメントは、任意の好適なアラインメントアルゴリズムにより決定することができ、二次構造、例えばｔｒａｃｒ配列またはｔｒａｃｒメイト配列内の自己相補性をさらに説明し得る。一部の実施形態において、２つの短い方の長さに沿ったｔｒａｃｒ配列とｔｒａｃｒメイト配列との間の相補性の程度は、最適にアラインされた場合、約または約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、またはそれよりも大きい数を超える。一部の実施

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

【化１】

(1)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgtttttgtactctcaagatttaGAAAtaaatcttgcagaagctacaaagataa

ggcttcatgccgaaatcaacaccctgtcattttatggcagggtgttttcgttatttaaTTTTTT; (2)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgtttttgtactctcaGAAAtgcagaagctacaaagataaggcttcatgccg

aaatcaacaccctgtcattttatggcagggtgttttcgttatttaaTTTTTT; (3)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgtttttgtactctcaGAAAtgcagaagctacaaagataaggcttcatgccg

aaatcaacaccctgtcattttatggcagggtgtTTTTTT; (4)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaactt

gaaaaagtggcaccgagtcggtgcTTTTTT; (5)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctaGAAATAGcaagttaaaataaggctagtccgttatcaac

ttgaaaaagtgTTTTTTT; および (6)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctagAAATAGcaagttaaaataaggctagtccgttatcaTT

TTTTTT

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

【０２２８】

一部の実施形態において、組換えテンプレートも提供される。組換えテンプレートは、本明細書に記載の別のベクターの成分であり、別個のベクター中で含有させ、または別個のポリヌクレオチドとして提供することができる。一部の実施形態において、組換えテンプレートは、例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体の一部としてのＣＲＩＳＰＲ酵素によりニック形成または開裂される標的配列内またはその付近での相同組換えにおけるテンプレートとして機能するように設計される。テンプレートポリヌクレオチドは、任意の好適な長さ、例えば、約または約１０、１５、２０、２５、５０、７５、１００、１５０、２００、５００、１０００、またはそれよりも大きい数を超えるヌクレオチド長であり得る。一部の実施形態において、テンプレートポリヌクレオチドは、標的配列を含むポリヌクレオチドの一部に相補的である。最適にアラインされた場合、テンプレートポリヌクレオチドは、

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

【０２２９】

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

【０２３０】

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は誘導性システムの成分をなし得る。このシステムの誘導可能である性質により、エネルギーの形態を用いた遺伝子編集または遺伝子発現の時空間的制御が可能となり得る。エネルギーの形態としては、限定はされないが、電磁放射線、音響エネルギー、化学エネルギーおよび熱エネルギーを挙げることができる。誘導性システムの例には、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Ｔｅｔ－ＯｎまたはＴｅｔ－Ｏｆｆ）、小分子２ハイブリッド転写活性化システム（ＦＫＢＰ、ＡＢＡ等）、または光誘導性システム（フィトクロム、ＬＯＶドメイン、またはクリプトクロム）が含まれる。一実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、配列特異的に転写活性の変化を誘導する光誘導性転写エフェクター（ＬＩＴＥ）の一部であり得る。光の成分には、ＣＲＩＳＰＲ酵素、光応答性クリプトクロムヘテロ二量体（例えばシロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ）由来）、および転写活性化／抑制ドメインが含まれ得る。誘導性ＤＮＡ結合タンパク質およびその使用方法のさらなる例は、米国仮特許出願第６１／７３６４６５号明細書および米国特許出願第６１／７２１，２８３号明細書（本明細書によって全体として参照により組み込まれる）に提供される。

【０２３１】

一部の態様において、本発明は、１つ以上のポリヌクレオチド、例えば、または本明細書に記載の１つ以上のベクター、１つ以上のその転写物、および／またはそれから転写さ

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

【０２３２】

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

【０２３３】

脂質：核酸複合体、例として、ターゲティングされるリポソーム、例えば、免疫脂質複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、Ｃｒｙｓｔａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４０４－４１０（１９９５）；Ｂｌａｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２：２９１－２９７（１９９５）；Ｂｅｈｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：３８２－３８９（１９９４）；Ｒｅｍｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．５：６４７－６５４（１９９４）；Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２：７１０－７２２（１９９５）；Ａｈｍａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５２：４８１７－４８２０（１９９２）；米国特許第４，１８６，１８３号明細書、同第４，２１７，３４４号明細書、同第４，２３５，８７１号明細書、同第４，２６１，９７５号明細書、同第４，４８５，０５４号明細書、同第４，５０１，７２８号明細書、同第４，７７４，０８５号明細書、同第４，８３７，０２８号明細書、および同第４，９４６，７８７号明細書参照）。

【０２３４】

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

【０２３５】

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

【０２３６】

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

【０２３７】

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

【０２３８】

典型的には、パッケージング細胞を使用して宿主細胞に感染し得るウイルス粒子を形成

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

【０２３９】

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

【０２４０】

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

が組換え体によって発現されるように外来性ＤＮＡを組換え体に挿入するための、かつｒｅｐおよび／またはｃａｐ機能を提供するためのプラスミドとを感受性細胞に形質移入することであって、従って形質移入により、機能性ｃａｐおよび／またはｒｅｐが欠損した、発現用ＤＮＡを含む外来性ＤＮＡを含有するｒＡＡＶがもたらされること。

【０２４１】

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

【０２４２】

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

【０２４３】

【表６】

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

【０２４４】

性核酸分子、例えば、プロモーターと、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質（推定ヌクレアーゼまたはヘリカーゼタンパク質）、例えばＣａｓ９をコードする核酸分子と、ターミネーターとを含むまたはそれから本質的になる第１のカセット、およびプロモーターと、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードする核酸分子と、ターミネーターとを含むまたはそれから本質的になる２つ、またはそれ以上の、有利にはベクターのパッケージングサイ

ズ限界に至るまでの、例えば合計で（第１のカセットを含めて）５つのカセット（例えば、各カセットは概略的に、プロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター、プロモーター－ｇＲＮＡ２－ターミネーター．．．プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーター（式中、Ｎは、ベクターのパッケージングサイズ限界の上限である挿入可能な数である）と表される）を含むまたはそれからなる複数のカセットを含むまたはそれから本質的になるｒＡＡＶ、または２つ以上の個々のｒＡＡＶであって、各々がＣＲＩＳＰＲ系の１つまたは２つ以上のカセットを含み、例えば、第１のｒＡＡＶが、プロモーターと、Ｃａｓ、例えばＣａｓ９をコードする核酸分子と、ターミネーターとを含むまたはそれから本質的になる第１のカセットを含み、および第２のｒＡＡＶが、プロモーターと、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードする核酸分子と、ターミネーターとを含むまたはそれから本質的になる複数の４つのカセット（例えば、各カセットは概略的に、プロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター、プロモーター－ｇＲＮＡ２－ターミネーター．．．プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーター（式中、Ｎは、ベクターのパッケージングサイズ限界の上限である挿入可能な数である）と表される）を含むｒＡＡＶを提供する。ｒＡＡＶはＤＮＡウイルスであるため、ＡＡＶまたはｒＡＡＶに関する本明細書の考察における核酸分子は、有利にはＤＮＡである。プロモーターは、一部の実施形態では有利にはヒトシナプシンＩプロモーター（ｈＳｙｎ）である。

【０２４５】

核酸を細胞に送達する追加の方法は、当業者に公知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２００３００８７８１７号明細書参照。

【０２４６】

一部の実施形態において、宿主細胞を、本明細書に記載の１つ以上のベクターにより一過的にまたは非一過的に形質移入する。一部の実施形態において、細胞を、それが対象中で天然に生じるままで形質移入する。一部の実施形態において、形質移入される細胞を対象から採取する。一部の実施形態において、細胞は、対象から採取された細胞、例えば、細胞系に由来する。組織培養のための広範な細胞系は、当技術分野において公知である。細胞系の例としては、限定されるものではないが、Ｃ８１６１、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ、ＭＯＬＴ、ｍＩＭＣＤ－３、ＮＨＤＦ、ＨｅＬａ－Ｓ３、Ｈｕｈ１、Ｈｕｈ４、Ｈｕｈ７、ＨＵＶＥＣ、ＨＡＳＭＣ、ＨＥＫｎ、ＨＥＫａ、ＭｉａＰａＣｅｌｌ、Ｐａｎｃ１、ＰＣ－３、ＴＦ１、ＣＴＬＬ－２、Ｃ１Ｒ、Ｒａｔ６、ＣＶ１、ＲＰＴＥ、Ａ１０、Ｔ２４、Ｊ８２、Ａ３７５、ＡＲＨ－７７、Ｃａｌｕ１、ＳＷ４８０、ＳＷ６２０、ＳＫＯＶ３、ＳＫ－ＵＴ、ＣａＣｏ２、Ｐ３８８Ｄ１、ＳＥＭ－Ｋ２、ＷＥＨＩ－２３１、ＨＢ５６、ＴＩＢ５５、Ｊｕｒｋａｔ、Ｊ４５．０１、ＬＲＭＢ、Ｂｃｌ－１、ＢＣ－３、ＩＣ２１、ＤＬＤ２、Ｒａｗ２６４．７、ＮＲＫ、ＮＲＫ－５２Ｅ、ＭＲＣ５、ＭＥＦ、Ｈｅｐ　Ｇ２、ＨｅＬａ　Ｂ、ＨｅＬａ　Ｔ４、ＣＯＳ、ＣＯＳ－１、ＣＯＳ－６、ＣＯＳ－Ｍ６Ａ、ＢＳ－Ｃ－１サル腎臓上皮、ＢＡＬＢ／３Ｔ３マウス胚線維芽細胞、３Ｔ３Ｓｗｉｓｓ、３Ｔ３－Ｌ１、１３２－ｄ５ヒト胎児線維芽細胞；１０．１マウス線維芽細胞、２９３－Ｔ、３Ｔ３、７２１、９Ｌ、Ａ２７８０、Ａ２７８０ＡＤＲ、Ａ２７８０ｃｉｓ、Ａ１７２、Ａ２０、Ａ２５３、Ａ４３１、Ａ－５４９、ＡＬＣ、Ｂ１６、Ｂ３５、ＢＣＰ－１細胞、ＢＥＡＳ－２Ｂ、ｂＥｎｄ．３、ＢＨＫ－２１、ＢＲ２９３、ＢｘＰＣ３、Ｃ３Ｈ－１０Ｔ１／２、Ｃ６／３６、Ｃａｌ－２７、ＣＨＯ、ＣＨＯ－７、ＣＨＯ－ＩＲ、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－Ｋ２、ＣＨＯ－Ｔ、ＣＨＯ　Ｄｈｆｒ－／－、ＣＯＲ－Ｌ２３、ＣＯＲ－Ｌ２３／ＣＰＲ、ＣＯＲ－Ｌ２３／５０１０、ＣＯＲ－Ｌ２３／Ｒ２３、ＣＯＳ－７、ＣＯＶ－４３４、ＣＭＬ　Ｔ１、ＣＭＴ、ＣＴ２６、Ｄ１７、ＤＨ８２、ＤＵ１４５、ＤｕＣａＰ、ＥＬ４、ＥＭ２、ＥＭ３、ＥＭＴ６／ＡＲ１、ＥＭＴ６／ＡＲ１０．０、ＦＭ３、Ｈ１２９９、Ｈ６９、ＨＢ５４、ＨＢ５５、ＨＣＡ２、ＨＥＫ－２９３、ＨｅＬａ、Ｈｅｐａ１ｃ１ｃ７、ＨＬ－６０、ＨＭＥＣ、ＨＴ－２９、Ｊｕｒｋａｔ、ＪＹ細胞、Ｋ５６２細胞、Ｋｕ８１２、ＫＣＬ２２、ＫＧ１、ＫＹＯ１、ＬＮＣａｐ、Ｍａ－Ｍｅｌ１－４８、ＭＣ－３８、ＭＣＦ－７、ＭＣＦ－１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５、ＭＤＣＫ　ＩＩ、ＭＤＣＫ　ＩＩ、ＭＯＲ／０．

２Ｒ、ＭＯＮＯ－ＭＡＣ６、ＭＴＤ－１Ａ、ＭｙＥｎｄ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＣＰＲ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ１０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ２０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ４、ＮＩＨ－３Ｔ３、ＮＡＬＭ－１、ＮＷ－１４５、ＯＰＣＮ／ＯＰＣＴ細胞系、Ｐｅｅｒ、ＰＮＴ－１Ａ／ＰＮＴ２、ＲｅｎＣａ、ＲＩＮ－５Ｆ、ＲＭＡ／ＲＭＡＳ、Ｓａｏｓ－２細胞、Ｓｆ－９、ＳｋＢｒ３、Ｔ２、Ｔ－４７Ｄ、Ｔ８４、ＴＨＰ１細胞系、Ｕ３７３、Ｕ８７、Ｕ９３７、ＶＣａＰ、Ｖｅｒｏ細胞、ＷＭ３９、ＷＴ－４９、Ｘ６３、ＹＡＣ－１、ＹＡＲ、およびそれらのトランスジェニック変種が挙げられる。細胞系は、当業者に公知の種々の資源から入手可能である（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（Ｍａｎａｓｓｕｓ，Ｖａ．）参照）。一部の実施形態において、本明細書に記載の１つ以上のベクターにより形質移入された細胞を使用して１つ以上のベクター由来配列を含む新たな細胞系を樹立する。一部の実施形態において、本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ系の成分により一過的に形質移入され（例えば、１つ以上のベクターの一過的形質移入、またはＲＮＡによる形質移入により）、ＣＲＩＳＰＲ複合体の活性を通して改変された細胞を使用して改変を含有するがあらゆる他の外因性配列を欠く細胞を含む新たな細胞系を樹立する。一部の実施形態において、本明細書に記載の１つ以上のベクターにより一過的にまたは非一過的に形質移入された細胞、またはそのような細胞に由来する細胞系を、１つ以上の試験化合物の評価において使用する。

【０２４７】

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

【０２４８】

作物ゲノミクスにおける最近の進歩に伴い、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を使用して効率的かつ費用対効果の高い遺伝子編集および操作を実施可能であることにより、生産を向上させかつ形質を強化するための単一の迅速な選択および比較ならびにかかるゲノムを形質転換する多重化した遺伝子操作が実現し得る。この点に関しては、米国特許および公開公報：米国特許第６，６０３，０６１号明細書－アグロバクテリウム属媒介性植物形質転換方法（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｐｌａｎｔ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｍｅｔｈｏｄ）；米国特許第７，８６８，１４９号明細書－植物ゲノム配列およびその使用（Ｐｌａｎｔ Ｇｅｎｏｍｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ａｎｄ Ｕｓｅｓ Ｔｈｅｒｅｏｆ）および米国特許出願公開第２００９／０１００５３６号明細書－強化された農業形質を備えるトランスジェニック植物（Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｐｌａｎｔｓ ｗｉｔｈ Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ａｇｒｏｎｏｍｉｃ Ｔｒａｉｔｓ）（これらの各々の内容および開示は全て、全体として参照により組み込まれる）が参照される。本発明の実施においては、Ｍｏｒｒｅｌｌ ｅｔ ａｌ「作物ゲノミクス：進歩と応用（Ｃｒｏｐ ｇｅｎｏｍｉｃｓ：ａｄｖａｎｃｅｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ）」Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｇｅｎｅｔ．２０１１ Ｄｅｃ ２９；１３（２）：８５－９６の内容および開示もまた、本明細書に全体として参照により組み込まれる。本発明の有利な実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系は微細藻類のエンジニアリングに用いられる。植物系においてＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を利用可能であることは、全体として参照により援用される、２０１３年７月にＮａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙに出版のため提出されたＦｅｎｇ ｅｔ ａｌ．による論稿「ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を使用した植物における効率的なゲノム編集（Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｄｉｔｉｎｇ ｉｎ Ｐｌａｎｔｓ ｕｓｉｎｇ ａ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ Ｓｙｓｔｅｍ）」にも提供され、ここでは、エンジニアリングされたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ複合体を使用して植物ゲノムの特定の部位に二本鎖切断を作り出し、双子葉植物および単子葉植物の両方で標的ゲノム改変を達成し得ることが実証されている。従って、本明細書における動物細胞に関する言及は、特に明らかでない限り、適宜修正して植物細胞にもまた適用し得る。

【０２４９】
一態様において、本発明は、真核細胞における標的ポリヌクレオチドを改変する方法を提供し、これはインビボ、エキソビボまたはインビトロであってよい。一部の実施形態では、本方法は、ヒトもしくは非ヒト動物または植物（微細藻類を含む）から細胞または細胞集団を採取すること、および１つまたは複数の細胞を改変することを含む。培養は任意の段階でエキソビボで行われ得る。１つまたは複数の細胞は、さらには非ヒト動物または植物（微細藻類を含む）に再導入されてもよい。再導入される細胞に関して、細胞が幹細胞であることが特に好ましい。
【０２５０】
一部の実施形態では、本方法は、ＣＲＩＳＰＲ複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせ、それにより標的ポリヌクレオチドを改変することを含み、ここでＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体形成するＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、前記ガイド配列はｔｒａｃｒメイト配列に結合し、次にはｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする。
【０２５１】
一態様において、本発明は、真核細胞におけるポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、ＣＲＩＳＰＲ複合体をポリヌクレオチドに結合させるステップであって、前記結合により前記ポリヌクレオチドの発現の増加または減少がもたらされることを含み；ここでＣＲＩＳＰＲ複合体は、前記ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体形成するＣＲＩＳＰＲ酵素を含み、前記ガイド配列はｔｒａｃｒメイト配列に結合し、次にはｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズする。同様の考慮事項および条件が、上記のとおり標的ポリヌクレオチドを改変する方法に適用される。実際上、これらの採取、培養および再導入のオプションは本発明の全態様に適用される。
【０２５２】
実際、本発明の任意の態様において、ＣＲＩＳＰＲ複合体は、標的配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体形成するＣＲＩＳＰＲ酵素を含むことができ、ここで前記ガイド配列はｔｒａｃｒメイト配列に結合することができ、次にはｔｒａｃｒメイト配列がｔｒａｃｒ配列にハイブリダイズすることができる。同様の考慮事項および条件が、上記のとおり標的ポリヌクレオチドを改変する方法に適用される。
【０２５３】
一態様において、本発明は、上記の方法および組成物に開示されるエレメントの任意の１つ以上を含むキットを提供する。エレメントは個々にまたは組み合わせで提供されてもよく、および任意の好適な容器、例えば、バイアル、ボトル、またはチューブに提供されてもよい。一部の実施形態では、キットは１つ以上の言語、例えば２つ以上の言語による説明書を含む。
【０２５４】
一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載のエレメントの１つ以上を利用するプロセスにおいて使用される１つ以上の試薬を含む。試薬は、任意の好適な容器中で提供することができる。例えば、キットは、１つ以上の反応または貯蔵緩衝液を提供し得る。試薬は、特定のアッセイにおいて使用可能な形態で、または使用前に１つ以上の他の成分の添加を要求する形態（例えば、濃縮物または凍結乾燥形態）で提供することができる。緩衝液は、任意の緩衝液、例として、限定されるものではないが、炭酸ナトリウム緩衝液、重炭酸ナトリウム緩衝液、ホウ酸緩衝液、Ｔｒｉｓ緩衝液、ＭＯＰＳ緩衝液、ＨＥＰＥＳ緩衝液、およびそれらの組合せであり得る。一部の実施形態において、緩衝液はアルカリ性である。一部の実施形態において、緩衝液は、約７から約１０のｐＨを有する。一部の実施形態において、キットは、ガイド配列および調節エレメントを作動可能に結合させるためのベクター中への挿入のためのガイド配列に対応する１つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、キットは、相同組換えテンプレートポリヌクレオ

チドを含む。

【０２５５】

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

【０２５６】

一実施形態において、本発明は、標的ポリヌクレオチドを開裂する方法を提供する。本方法は、標的ポリヌクレオチドに結合して前記標的ポリヌクレオチドの開裂を生じさせるＣＲＩＳＰＲ複合体を使用して標的ポリヌクレオチドを改変することを含む。典型的には、本発明のＣＲＩＳＰＲ複合体は、細胞に導入されると、ゲノム配列に切断（例えば、一本鎖または二本鎖切断）を作り出す。例えば、本方法を用いて細胞中の疾患遺伝子を開裂させることができる。

【０２５７】

ＣＲＩＳＰＲ複合体によって作り出された切断は、エラープローン非相同末端結合（ＮＨＥＪ）経路または高フィデリティ相同性組換え修復（ＨＤＲ）（図１１）などの修復プロセスによって修復され得る。これらの修復プロセスの間、ゲノム配列に外来性ポリヌクレオチドテンプレートを導入することができる。一部の方法では、ＨＤＲプロセスを用いてゲノム配列が改変される。例えば、上流配列および下流配列が隣接するインテグレートしようとする配列を含む外来性ポリヌクレオチドテンプレートが細胞に導入される。上流および下流配列は、染色体におけるインテグレーション部位の両側と配列類似性を共有する。

【０２５８】

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

【０２５９】

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

【０２６０】

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

【０２６１】
上流または下流配列は、約２０ｂｐ～約２５００ｂｐ、例えば、約５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、または２５００ｂｐを含み得る。一部の方法では、例示的上流または下流配列は、約２００ｂｐ～約２０００ｂｐ、約６００ｂｐ～約１０００ｂｐ、またはより詳細には約７００ｂｐ～約１０００ｂｐを有する。
【０２６２】
一部の方法では、外来性ポリヌクレオチドテンプレートはマーカーをさらに含み得る。かかるマーカーは標的インテグレーションのスクリーニングを容易にし得る。好適なマーカーの例としては、制限部位、蛍光タンパク質、または選択可能なマーカーが挙げられる。本発明の外来性ポリヌクレオチドテンプレートは組換え技術を用いて構築することができる（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００１およびＡｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６を参照）。
【０２６３】
外来性ポリヌクレオチドテンプレートをインテグレートすることにより標的ポリヌクレオチドを改変する例示的方法においては、ＣＲＩＳＰＲ複合体によってゲノム配列に二本鎖切断が導入され、その切断が、外来性ポリヌクレオチドテンプレートによる相同組換えでテンプレートがゲノムにインテグレートされることにより修復される。二本鎖切断の存在がテンプレートのインテグレーションを促進する。
【０２６４】
他の実施形態では、この発明は、真核細胞におけるポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。本方法は、そのポリヌクレオチドに結合するＣＲＩＳＰＲ複合体を使用して標的ポリヌクレオチドの発現を増加または低下させることを含む。
【０２６５】
一部の方法では、細胞における発現の改変を達成するため標的ポリヌクレオチドを不活性化させることができる。例えば、細胞中の標的配列にＣＲＩＳＰＲ複合体が結合すると、配列が転写されないか、コードされたタンパク質が産生されないか、または野生型配列が機能するとおりには配列が機能しないように、標的ポリヌクレオチドが不活性化される。例えば、タンパク質が産生されないようにタンパク質またはマイクロＲＮＡコード配列が不活性化されてもよい。
【０２６６】
一部の方法では、それ以上制御配列として機能しないように制御配列を不活性化することができる。本明細書で使用されるとき、「制御配列」は、核酸配列の転写、翻訳、または接触可能性を実現する任意の核酸配列を指す。制御配列の例としては、プロモーター、転写ターミネーターが挙げられ、およびエンハンサーが制御配列である。
【０２６７】
不活性化された標的配列は、欠失突然変異（すなわち、１つ以上のヌクレオチドの欠失）、挿入突然変異（すなわち、１つ以上のヌクレオチドの挿入）、またはナンセンス突然変異（すなわち、終止コドンが導入されるような単一のヌクレオチドによる別のヌクレオチドとの置換）を含み得る。一部の方法では、標的配列の不活性化は標的配列の「ノックアウト」をもたらす。
【０２６８】
本発明の方法を用いて、疾患モデルとして使用し得る植物、動物または細胞を作り出すことができる。本明細書で使用されるとき、「疾患」は、対象における疾患、障害、または徴候を指す。例えば、本発明の方法を用いて、疾患に関連する１つ以上の核酸配列に改変を含む動物もしくは細胞、または疾患に関連する１つ以上の核酸配列の発現が変化している植物、動物もしくは細胞を作り出すことができる。かかる核酸配列は疾患関連タンパク質配列をコードしてもよく、または疾患関連制御配列であってもよい。従って、本発明の実施形態において植物、対象、患者、生物または細胞は、非ヒトの対象、患者、生物ま

たは細胞であり得ることが理解される。従って、本発明は、本方法により作製された植物、動物もしくは細胞、またはその子孫を提供する。子孫は、作製された植物または動物のクローンであってもよく、またはさらに望ましい形質をその子孫に遺伝子移入させるため同じ種の他の個体と交配させることによる有性生殖から生じてもよい。細胞は、多細胞生物、特に動物または植物の場合にインビボまたはエキソビボであってよい。細胞が培養下にある例では、適切な培養条件が満たされる場合、かつ好ましくは細胞がこの目的に好適に適合する場合（例えば幹細胞）、細胞系が樹立され得る。本発明によって作製される細菌細胞系もまた想定される。ひいては細胞系もまた想定される。

【０２６９】

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

【０２７０】

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

【０２７１】

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

【０２７２】

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

【０２７３】

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

【０２７４】

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

【０２７５】

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

【０２７６】

本発明の目的上、増幅は、妥当なフィデリティで標的配列を複製する能力を有するプライマーおよびポリメラーゼを用いる任意の方法を意味する。増幅は、天然または組換えＤＮＡポリメラーゼ、例えば、ＴａｑＧｏｌｄ（商標）、Ｔ７　ＤＮＡポリメラーゼ、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＤＮＡポリメラーゼのクレノウ断片、および逆転写酵素によって行われ得る。好ましい増幅方法はＰＣＲである。詳細には、単離されたＲＮＡが、生化学的シグナル伝達経路に関連する配列の発現レベルを定量化するため定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）と組み合わされた逆転写アッセイに供され得る。

【０２７７】

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

【０２７８】

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

【０２７９】

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

【０２８０】

ハイブリダイゼーションは、種々のストリンジェンシーの条件下で実施することができる。本発明の実施に好適なハイブリダイゼーション条件は、プローブと生化学的シグナル伝達経路に関連する配列との間の認識相互作用が十分に特異的であるとともに十分に安定しているものである。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーが増加する条件

は当該技術分野で広く知られており、発表されている。例えば、（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，（１９８９）；Ｎｏｎｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ Ｉｎ Ｓｉｔｕ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ Ｍａｎｕａｌ，Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ，ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ）を参照のこと。ハイブリダイゼーションアッセイは、限定はされないが、ニトロセルロース、ガラス、ケイ素、および種々の遺伝子アレイを含めた任意の固体支持体上に固定化されたプローブを使用して形成され得る。好ましいハイブリダイゼーションアッセイは、米国特許第５，４４５，９３４号明細書に記載されるとおりの高密度遺伝子チップで実施される。

【０２８１】

ハイブリダイゼーションアッセイ中に形成されるプローブ－標的複合体を好都合に検出するため、ヌクレオチドプローブが検出可能標識にコンジュゲートされる。本発明における使用に好適な検出可能標識には、光化学的、生化学的、分光学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段で検出可能な任意の組成物が含まれる。幅広い種類の適切な検出可能標識が当該技術分野において公知であり、それには、蛍光または化学発光標識、放射性同位元素標識、酵素または他のリガンドが含まれる。好ましい実施形態では、ジゴキシゲニン、β－ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼ、アビジン／ビオチン複合体など、蛍光標識または酵素タグを用いることが所望されるものと思われる。

【０２８２】

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

【０２８３】

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

【０２８４】

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

【０２８５】

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

化合物、および化学発光化合物が挙げられる。

【０２８６】

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

【０２８７】

上記に概説した一般的原理に基づく多くのタンパク質分析技術は、当該技術分野において利用可能である。これには、限定はされないが、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合イムノラジオメトリックアッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、インサイチューイムノアッセイ（例えば、コロイド金、酵素または放射性同位元素標識を使用する）、ウエスタンブロット分析、免疫沈降アッセイ、免疫蛍光アッセイ、およびＳＤＳ－ＰＡＧＥが含まれる。

【０２８８】

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

【０２８９】

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

【０２９０】

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

【０２９１】

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

【０２９２】

本明細書に開示される任意の方法の実施においては、限定なしに、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、ソノポレーション、微粒子銃、リン酸カルシウム媒介性形質移入、カチオン性形質移入、リポソーム形質移入、デンドリマー形質移入、熱ショック形質移入、ヌクレオフェクション形質移入、マグネトフェクション、リポフェクション、インペイルフェクション（ｉｍｐａｌｅｆｅｃｔｉｏｎ）、光学的形質移入、有標の薬剤により増強される核酸取り込み、およびリポソーム、免疫リポソーム、ビロソーム、または人工ビリオンを介した送達を含めた当該技術分野で公知の１つ以上の方法によって細胞または胚に好適なベクターを導入することができる。一部の方法では、ベクターはマイクロインジェクションにより胚に導入される。１つまたは複数のベクターが胚の核または細胞質に微量注入され得る。一部の方法では、１つまたは複数のベクターはヌクレオフェクションにより細胞に導入され得る。

【０２９３】

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

【０２９４】

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

【０２９５】

ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチドは、真核細胞にとって内因性または外来性の任意のポリヌクレオチドであり得る。例えば、標的ポリヌクレオチドは、真核細胞の核に存在するポリヌクレオチドであり得る。標的ポリヌクレオチドは、遺伝子産物（例えばタンパク質）をコードする配列または非コード配列（例えば調節ポリヌクレオチドまたはジャンクＤＮＡ）であり得る。

【０２９６】

ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチドとしては、それぞれＢｒｏａｄ参照番号Ｂ

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

【０２９７】

標的ポリヌクレオチドの例としては、シグナリング生化学経路に関連する配列、例えば、シグナリング生化学経路関連遺伝子またはポリヌクレオチドが挙げられる。標的ポリヌクレオチドの例としては、疾患関連遺伝子またはポリヌクレオチドが挙げられる。「疾患関連」遺伝子またはポリヌクレオチドは、非疾患対照の組織または細胞と比較して患部組織に由来する細胞中で異常なレベルにおいてまたは異常な形態で転写または翻訳産物を生じさせている任意の遺伝子またはポリヌクレオチドを指す。これは、異常に高いレベルにおいて発現されるようになる遺伝子であり得；これは、異常に低いレベルにおいて発現されるようになる遺伝子であり得、発現の変化は、疾患の発生および／または進行と相関する。疾患関連遺伝子は、疾患の病因を直接担い、または疾患の病因を担う遺伝子と連鎖不平衡をなす突然変異または遺伝子変異を有する遺伝子も指す。転写または翻訳される産物は、既知または未知のものであり得、正常または異常レベルにおけるものであり得る。

【０２９８】

疾患関連遺伝子およびポリヌクレオチドの例を表ＡおよびＢに列記する。疾患特異的情報は、ＭｃＫｕｓｉｃｋ－Ｎａｔｈａｎｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ（Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．）およびＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．）から入手可能であり、ワールドワイドウェブから入手可能である。シグナリング生化学経路関連遺伝子およびポリヌクレオチドの例を表Ｃに列記する。

【０２９９】

これらの遺伝子および経路中の突然変異は、不適切なタンパク質の産生または機能に影響する不適切な量のタンパク質をもたらし得る。遺伝子、疾患およびタンパク質のさらなる例は、米国仮特許出願第６１／７３６，５２７号明細書および６１／７４８，４２７号明細書から参照により本明細書に組み込まれる。このような遺伝子、タンパク質および経路は、ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチドであり得る。

【０３００】

【表７】

**表Ａ**

| 疾患/障害 | 遺伝子 |
|---|---|
| 新形成 | PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; |
| | Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; |
| | HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR アルファ; PPAR |
| | ガンマ; WT1 (ウィルムス腫瘍); FGF 受容体ファミリー |
| | メンバー(5 つのメンバー: 1、2、3、4、5); CDKN2a; APC; RB |
| | (網膜芽細胞腫); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR |
| | (アンドロゲン受容体); TSG101; IGF; IGF 受容体; Igf1 (4 |
| | つのバリアント); Igf2 (3 つのバリアント); Igf 1 受容体; Igf 2 受容体; |
| | Bax; Bcl2;カスパーゼファミリー(9 つのメンバー: |
| | 1、2、3、4、6、7、8、9、12); Kras; Apc |
| 加齢黄斑変性症 | Abcr; Ccl2; Cc2; cp (セルロプラスミン); Timp3; カテプシン D; |
| | Vldlr; Ccr2 |
| 統合失調症 | ニューレグリン 1 (Nrg1); Erb4 (ニューレグリンについての受容体); |

【０３０１】

【表８】

| | |
|---|---|
| | コンプレキシン１(Cplx1); Tph1 トリプトファンヒドロキシラーゼ; Tph2 |
| | トリプトファンヒドロキシラーゼ２; ニューレキシン１; GSK3; GSK3a; |
| | GSK3b |
| 障害 | 5-HTT (Slc6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA; |
| | DTNBP1; Dao (Dao1) |
| トリヌクレオチドリピート | HTT (ハンチントン病 Dx); SBMA/SMAX1/AR (ケネディ病 |
| 障害 | Dx); FXN/X25 (フリードライヒ運動失調症); ATX3 (マシャド・ジョセフ病 |
| | Dx); ATXN1 および ATXN2 (脊髄小脳失調症 |
| | ); DMPK (筋強直性ジストロフィー); アトロフィン-1 および Atn1 |
| | (DRPLA Dx); CBP (Creb-BP - 球状不安定性); VLDLR |
| | (アルツハイマー病); Atxn7; Atxn10 |
| 脆弱性 X 症候群 | FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5 |
| セクレターゼ関連 | APH-1 (アルファおよびベータ);プレセニリン(Psen1);ニカストリン |
| 障害 | (Ncstn); PEN-2 |
| その他 | Nos1; Parp1; Nat1; Nat2 |
| プリオン関連障害 | Prp |
| ALS | SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; |
| | VEGF-b; VEGF-c) |
| 薬物嗜好 | Prkce (アルコール); Drd2; Drd4; ABAT (アルコール); GRIA2; |
| | Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1 (アルコール) |
| 自閉症 | Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A;ニューレキシン 1;脆弱性 X |
| | (FMR2 (AFF2); FXR1; FXR2; Mglur5) |
| アルツハイマー病 | E1; CHIP; UCH; UBB; Tau; LRP; PICALM;クラステリン; PS1; |
| | SORL1; CR1; Vldlr; Uba1; Uba3; CHIP28 (Aqp1, |
| | アクアポリン 1); Uchl1; Uchl3; APP |
| 炎症 | IL-10; IL-1 (IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17 (IL-17a (CTLA8); IL- |
| | 17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); II-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa; |
| | IBD についての NOD2/CARD15; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b); |
| | CTLA4; Cx3cl1 |
| パーキンソン病 | x-シヌクレイン; DJ-1; LRRK2;パーキン; PINK1 |

【０３０２】

【表９】

**表B:**

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

【０３０３】

【表１０】

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

【０３０４】

【表１１】

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

【０３０５】

【表１２】

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

【０３０６】
【表１３】

表C:

| 細胞機能 | 遺伝子 |
|---|---|
| PI3K/AKTシグナリング | PRKCE; ITGAM; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; |
| | PTEN; EIF4E; PRKCZ; GRK6; MAPK1; TSC1; PLK1; |
| | AKT2; IKBKB; PIK3CA; CDK8; CDKN1B; NFKB2; BCL2; |
| | PIK3CB; PPP2R1A; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC2; |
| | ITGA1; KRAS; EIF4EBP1; RELA; PRKCD; NOS3; |
| | PRKAA1; MAPK9; CDK2; PPP2CA; PIM1; ITGB7; |
| | YWHAZ; ILK; TP53; RAF1; IKBKG; RELB; DYRK1A; |
| | CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; |
| | CHUK; PDPK1; PPP2R5C; CTNNB1; MAP2K1; NFKB1; |
| | PAK3; ITGB3; CCND1; GSK3A; FRAP1; SFN; ITGA2; |
| | TTK; CSNK1A1; BRAF; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; |
| | HSP90AA1; RPS6KB1 |
| ERK/MAPKシグナリング | PRKCE; ITGAM; ITGA5; HSPB1; IRAK1; PRKAA2; |
| | EIF2AK2; RAC1; RAP1A; TLN1; EIF4E; ELK1; GRK6; |
| | MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; CREB1; |
| | PRKCI; PTK2; FOS; RPS6KA4; PIK3CB; PPP2R1A; |
| | PIK3C3; MAPK8; MAPK3; ITGA1; ETS1; KRAS; MYCN; |
| | EIF4EBP1; PPARG; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; |
| | CDK2; PPP2CA; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; YWHAZ; |
| | PPP1CC; KSR1; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; |

【０３０７】

【表１４】

| | |
|---|---|
| | MAP2K2; PAK4; PIK3R1; STAT3; PPP2R5C; MAP2K1; |
| | PAK3; ITGB3; ESR1; ITGA2; MYC; TTK; CSNK1A1; |
| | CRKL; BRAF; ATF4; PRKCA; SRF; STAT1; SGK |
| グルココルチコイド受容体 | RAC1; TAF4B; EP300; SMAD2; TRAF6; PCAF; ELK1; |
| シグナリング | MAPK1; SMAD3; AKT2; IKBKB; NCOR2; UBE2I; |
| | PIK3CA; CREB1; FOS; HSPA5; NFKB2; BCL2; |
| | MAP3K14; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; |
| | MAPK3; TSC22D3; MAPK10; NRJP1; KRAS; MAPK13; |
| | RELA; STAT5A; MAPK9; NOS2A; PBX1; NR3C1; |
| | PIK3C2A; CDKN1C; TRAF2; SERPINE1; NCOA3; |
| | MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; MAP3K7; CREBBP; |
| | CDKN1A; MAP2K2; JAK1; IL8; NCOA2; AKT1; JAK2; |
| | PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1; |
| | ESR1; SMAD4; CEBPB; JUN; AR; AKT3; CCL2; MMP1; |
| | STAT1; IL6; HSP90AA1 |
| 軸索ガイダンス<br>シグナリング | PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; ADAM12; |
| | IGF1; RAC1; RAP1A; EIF4E; PRKCZ; NRP1; NTRK2; |
| | ARHGEF7; SMO; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; |
| | PTPN11; GNAS; AKT2; PIK3CA; ERBB2; PRKCI; PTK2; |
| | CFL1; GNAQ; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; WNT11; |
| | PRKD1; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; |
| | PRKCD; PIK3C2A; ITGB7; GLI2; PXN; VASP; RAF1; |
| | FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; ADAM17; AKT1; PIK3R1; |
| | GLI1; WNT5A; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; |
| | CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; CRKL; RND1; GSK3B; |
| | AKT3; PRKCA |
| エフリン受容体<br>シグナリング | PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; IRAK1; |
| | PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAP1A; GRK6; ROCK2; |
| | MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; PLK1; AKT2; |
| | DOK1; CDK8; CREB1; PTK2; CFL1; GNAQ; MAP3K14; |
| | CXCL12; MAPK8; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; |
| | KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; |
| | PIM1; ITGB7; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; |
| | MAP2K2; PAK4; AKT1; JAK2; STAT3; ADAM10; |
| | MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; |
| | EPHA8; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; PTPN13; ATF4; |
| | AKT3; SGK |
| アクチン細胞骨格 | ACTN4; PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; IRAK1; |
| シグナリング | PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; INS; ARHGEF7; GRK6; |
| | ROCK2; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; |
| | PTK2; CFL1; PIK3CB; MYH9; DIAPH1; PIK3C3; MAPK8; |
| | F2R; MAPK3; SLC9A1; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; |
| | PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; |

【０３０８】

【表１５】

| | |
|---|---|
| | PPP1CC; PXN; VIL2; RAF1; GSN; DYRK1A; ITGB1; |
| | MAP2K2; PAK4; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; |
| | ITGB3; CDC42; APC; ITGA2; TTK; CSNK1A1; CRKL; |
| | BRAF; VAV3; SGK |
| ハンチントン病 | PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1; PRKCZ; HDAC4; TGM2; |
| シグナリング | MAPK1; CAPNS1; AKT2; EGFR; NCOR2; SP1; CAPN2; |
| | PIK3CA; HDAC5; CREB1; PRKCI; HSPA5; REST; |
| | GNAQ; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; PRKD1; |
| | GNB2L1; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; HDAC2; |
| | HDAC7A; PRKCD; HDAC11; MAPK9; HDAC9; PIK3C2A; |
| | HDAC3; TP53; CASP9; CREBBP; AKT1; PIK3R1; |
| | PDPK1; CASP1; APAF1; FRAP1; CASP2; JUN; BAX; |
| | ATF4; AKT3; PRKCA; CLTC; SGK; HDAC6; CASP3 |
| アポトーシスシグナリング | PRKCE; ROCK1; BID; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; BAK1; |
| | BIRC4; GRK6; MAPK1; CAPNS1; PLK1; AKT2; IKBKB; |
| | CAPN2; CDK8; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; |
| | BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; KRAS; RELA; |
| | PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; TP53; TNF; |
| | RAF1; IKBKG; RELB; CASP9; DYRK1A; MAP2K2; |
| | CHUK; APAF1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; LMNA; CASP2; |
| | BIRC2; TTK; CSNK1A1; BRAF; BAX; PRKCA; SGK; |
| | CASP3; BIRC3; PARP1 |
| B細胞受容体<br>シグナリング | RAC1; PTEN; LYN; ELK1; MAPK1; RAC2; PTPN11; |
| | AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; SYK; NFKB2; CAMK2A; |
| | MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; ABL1; |
| | MAPK3; ETS1; KRAS; MAPK13; RELA; PTPN6; MAPK9; |
| | EGR1; PIK3C2A; BTK; MAPK14; RAF1; IKBKG; RELB; |
| | MAP3K7; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; |
| | NFKB1; CDC42; GSK3A; FRAP1; BCL6; BCL10; JUN; |
| | GSK3B; ATF4; AKT3; VAV3; RPS6KB1 |
| 白血球の血管外遊出 | ACTN4; CD44; PRKCE; ITGAM; ROCK1; CXCR4; CYBA; |
| シグナリング | RAC1; RAP1A; PRKCZ; ROCK2; RAC2; PTPN11; |
| | MMP14; PIK3CA; PRKCI; PTK2; PIK3CB; CXCL12; |
| | PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ABL1; MAPK10; CYBB; |
| | MAPK13; RHOA; PRKCD; MAPK9; SRC; PIK3C2A; BTK; |
| | MAPK14; NOX1; PXN; VIL2; VASP; ITGB1; MAP2K2; |
| | CTNND1; PIK3R1; CTNNB1; CLDN1; CDC42; F11R; ITK; |
| | CRKL; VAV3; CTTN; PRKCA; MMP1; MMP9 |
| インテグリンシグナリング | ACTN4; ITGAM; ROCK1; ITGA5; RAC1; PTEN; RAP1A; |
| | TLN1; ARHGEF7; MAPK1; RAC2; CAPNS1; AKT2; |
| | CAPN2; PIK3CA; PTK2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; |
| | CAV1; CAPN1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; |
| | SRC; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; ILK; PXN; VASP; |
| | RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; |

【０３０９】

【表１６】

| | |
|---|---|
| | TNK2; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; RND3; ITGA2; |
| | CRKL; BRAF; GSK3B; AKT3 |
| 急性期反応 | IRAK1; SOD2; MYD88; TRAF6; ELK1; MAPK1; PTPN11; |
| シグナリング | AKT2; IKBKB; PIK3CA; FOS; NFKB2; MAP3K14; |
| | PIK3CB; MAPK8; RIPK1; MAPK3; IL6ST; KRAS; |
| | MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; FTL; NR3C1; |
| | TRAF2; SERPINE1; MAPK14; TNF; RAF1; PDK1; |
| | IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1; |
| | CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; FRAP1; CEBPB; JUN; |
| | AKT3; IL1R1; IL6 |
| PTENシグナリング | ITGAM; ITGA5; RAC1; PTEN; PRKCZ; BCL2L11; |
| | MAPK1; RAC2; AKT2; EGFR; IKBKB; CBL; PIK3CA; |
| | CDKN1B; PTK2; NFKB2; BCL2; PIK3CB; BCL2L1; |
| | MAPK3; ITGA1; KRAS; ITGB7; ILK; PDGFRB; INSR; |
| | RAF1; IKBKG; CASP9; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; |
| | AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; PDPK1; MAP2K1; |
| | NFKB1; ITGB3; CDC42; CCND1; GSK3A; ITGA2; |
| | GSK3B; AKT3; FOXO1; CASP3; RPS6KB1 |
| p53シグナリング | PTEN; EP300; BBC3; PCAF; FASN; BRCA1; GADD45A; |
| | BIRC5; AKT2; PIK3CA; CHEK1; TP53INP1; BCL2; |
| | PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; THBS1; ATR; BCL2L1; E2F1; |
| | PMAIP1; CHEK2; TNFRSF10B; TP73; RB1; HDAC9; |
| | CDK2; PIK3C2A; MAPK14; TP53; LRDD; CDKN1A; |
| | HIPK2; AKT1; PIK3R1; RRM2B; APAF1; CTNNB1; |
| | SIRT1; CCND1; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; JUN; |
| | SNAI2; GSK3B; BAX; AKT3 |
| アリール炭化水素<br>受容体 | HSPB1; EP300; FASN; TGM2; RXRA; MAPK1; NQO1; |
| シグナリング | NCOR2; SP1; ARNT; CDKN1B; FOS; CHEK1; |
| | SMARCA4; NFKB2; MAPK8; ALDH1A1; ATR; E2F1; |
| | MAPK3; NRIP1; CHEK2; RELA; TP73; GSTP1; RB1; |
| | SRC; CDK2; AHR; NFE2L2; NCOA3; TP53; TNF; |
| | CDKN1A; NCOA2; APAF1; NFKB1; CCND1; ATM; ESR1; |
| | CDKN2A; MYC; JUN; ESR2; BAX; IL6; CYP1B1; |
| | HSP90AA1 |
| 生体異物代謝 | PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; MAPK1; NQO1; |
| シグナリング | NCOR2; PIK3CA; ARNT; PRKCI; NFKB2; CAMK2A; |
| | PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; |
| | ALDH1A1; MAPK3; NRIP1; KRAS; MAPK13; PRKCD; |
| | GSTP1; MAPK9; NOS2A; ABCB1; AHR; PPP2CA; FTL; |
| | NFE2L2; PIK3C2A; PPARGC1A; MAPK14; TNF; RAF1; |
| | CREBBP; MAP2K2; PIK3R1; PPP2R5C; MAP2K1; |
| | NFKB1; KEAP1; PRKCA; EIF2AK3; IL6; CYP1B1; |
| | HSP90AA1 |
| SAPK/JNKシグナリング | PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; ELK1; |

【０３１０】

【表１７】

| | |
|---|---|
| | GRK6; MAPK1; GADD45A; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; |
| | FADD; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; |
| | GNB2L1; IRS1; MAPK3; MAPK10; DAXX; KRAS; |
| | PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; |
| | TRAF2; TP53; LCK; MAP3K7; DYRK1A; MAP2K2; |
| | PIK3R1; MAP2K1; PAK3; CDC42; JUN; TTK; CSNK1A1; |
| | CRKL; BRAF; SGK |
| PPAr/RXRシグナリング | PRKAA2; EP300; INS; SMAD2; TRAF6; PPARA; FASN; |
| | RXRA; MAPK1; SMAD3; GNAS; IKBKB; NCOR2; |
| | ABCA1; GNAQ; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK8; |
| | IRS1; MAPK3; KRAS; RELA; PRKAA1; PPARGC1A; |
| | NCOA3; MAPK14; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; |
| | CREBBP; MAP2K2; JAK2; CHUK; MAP2K1; NFKB1; |
| | TGFBR1; SMAD4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6; HSP90AA1; |
| | ADIPOQ |
| NF-KBシグナリング | IRAK1; EIF2AK2; EP300; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; |
| | TBK1; AKT2; EGFR; IKBKB; PIK3CA; BTRC; NFKB2; |
| | MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; HDAC2; |
| | KRAS; RELA; PIK3C2A; TRAF2; TLR4; PDGFRB; TNF; |
| | INSR; LCK; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; AKT1; |
| | PIK3R1; CHUK; PDGFRA; NFKB1; TLR2; BCL10; |
| | GSK3B; AKT3; TNFAIP3; IL1R1 |
| ニューレグリンシグナリング | ERBB4; PRKCE; ITGAM; ITGA5; PTEN; PRKCZ; ELK1; |
| | MAPK1; PTPN11; AKT2; EGFR; ERBB2; PRKCI; |
| | CDKN1B; STAT5B; PRKD1; MAPK3; ITGA1; KRAS; |
| | PRKCD; STAT5A; SRC; ITGB7; RAF1; ITGB1; MAP2K2; |
| | ADAM17; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; ITGB3; |
| | EREG; FRAP1; PSEN1; ITGA2; MYC; NRG1; CRKL; |
| | AKT3; PRKCA; HSP90AA1; RPS6KB1 |
| Wntおよびベータカテニン | CD44; EP300; LRP6; DVL3; CSNK1E; GJA1; SMO; |
| シグナリング | AKT2; PIN1; CDH1; BTRC; GNAQ; MARK2; PPP2R1A; |
| | WNT11; SRC; DKK1; PPP2CA; SOX6; SFRP2; ILK; |
| | LEF1; SOX9; TP53; MAP3K7; CREBBP; TCF7L2; AKT1; |
| | PPP2R5C; WNT5A; LRP5; CTNNB1; TGFBR1; CCND1; |
| | GSK3A; DVL1; APC; CDKN2A; MYC; CSNK1A1; GSK3B; |
| | AKT3; SOX2 |
| インスリン受容体<br>シグナリング | PTEN; INS; EIF4E; PTPN1; PRKCZ; MAPK1; TSC1; |
| | PTPN11; AKT2; CBL; PIK3CA; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; |
| | MAPK8; IRS1; MAPK3; TSC2; KRAS; EIF4EBP1; |
| | SLC2A4; PIK3C2A; PPP1CC; INSR; RAF1; FYN; |
| | MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; |
| | GSK3A; FRAP1; CRKL; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; |
| | RPS6KB1 |
| IL-6シグナリング | HSPB1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; MAPK1; PTPN11; |

【０３１１】

【表１８】

| | |
|---|---|
| | IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK3; |
| | MAPK10; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; |
| | MAPK9; ABCB1; TRAF2; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; |
| | RELB; MAP3K7; MAP2K2; IL8; JAK2; CHUK; STAT3; |
| | MAP2K1; NFKB1; CEBPB; JUN; IL1R1; SRF; IL6 |
| 肝臓胆汁鬱滞 | PRKCE; IRAK1; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; PPARA; |
| | RXRA; IKBKB; PRKCI; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; |
| | PRKD1; MAPK10; RELA; PRKCD; MAPK9; ABCB1; |
| | TRAF2; TLR4; TNF; INSR; IKBKG; RELB; MAP3K7; IL8; |
| | CHUK; NR1H2; TJP2; NFKB1; ESR1; SREBF1; FGFR4; |
| | JUN; IL1R1; PRKCA; IL6 |
| IGF-1シグナリング | IGF1; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; NEDD4; AKT2; |
| | PIK3CA; PRKCI; PTK2; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; |
| | IGF1R; IRS1; MAPK3; IGFBP7; KRAS; PIK3C2A; |
| | YWHAZ; PXN; RAF1; CASP9; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; |
| | PDPK1; MAP2K1; IGFBP2; SFN; JUN; CYR61; AKT3; |
| | FOXO1; SRF; CTGF; RPS6KB1 |
| NRF2媒介酸化的 | PRKCE; EP300; SOD2; PRKCZ; MAPK1; SQSTM1; |
| ストレス応答 | NQO1; PIK3CA; PRKCI; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; |
| | PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; GSTP1; MAPK9; FTL; |
| | NFE2L2; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; MAP3K7; CREBBP; |
| | MAP2K2; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PPIB; JUN; KEAP1; |
| | GSK3B; ATF4; PRKCA; EIF2AK3; HSP90AA1 |
| 肝線維症/肝星細胞 | EDN1; IGF1; KDR; FLT1; SMAD2; FGFR1; MET; PGF; |
| 活性化 | SMAD3; EGFR; FAS; CSF1; NFKB2; BCL2; MYH9; |
| | IGF1R; IL6R; RELA; TLR4; PDGFRB; TNF; RELB; IL8; |
| | PDGFRA; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; VEGFA; BAX; |
| | IL1R1; CCL2; HGF; MMP1; STAT1; IL6; CTGF; MMP9 |
| PPARシグナリング | EP300; INS; TRAF6; PPARA; RXRA; MAPK1; IKBKB; |
| | NCOR2; FOS; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK3; |
| | NRIP1; KRAS; PPARG; RELA; STAT5A; TRAF2; |
| | PPARGC1A; PDGFRB; TNF; INSR; RAF1; IKBKG; |
| | RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; CHUK; PDGFRA; |
| | MAP2K1; NFKB1; JUN; IL1R1; HSP90AA1 |
| FcイプシロンRIシグナリング | PRKCE; RAC1; PRKCZ; LYN; MAPK1; RAC2; PTPN11; |
| | AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; |
| | PRKD1; MAPK3; MAPK10; KRAS; MAPK13; PRKCD; |
| | MAPK9; PIK3C2A; BTK; MAPK14; TNF; RAF1; FYN; |
| | MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; AKT3; |
| | VAV3; PRKCA |
| Gタンパク質共役 | PRKCE; RAP1A; RGS16; MAPK1; GNAS; AKT2; IKBKB; |
| 受容体シグナリング | PIK3CA; CREB1; GNAQ; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; |
| | PIK3C3; MAPK3; KRAS; RELA; SRC; PIK3C2A; RAF1; |
| | IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; |

【０３１２】

【表１９】

| | |
|---|---|
| | PDPK1; STAT3; MAP2K1; NFKB1; BRAF; ATF4; AKT3; |
| | PRKCA |
| イノシトールリン酸 | PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; GRK6; |
| 代謝 | MAPK1; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; |
| | MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; |
| | PIM1; PIK3C2A; DYRK1A; MAP2K2; PIP5K1A; PIK3R1; |
| | MAP2K1; PAK3; ATM; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK |
| PDGFシグナリング | EIF2AK2; ELK1; ABL2; MAPK1; PIK3CA; FOS; PIK3CB; |
| | PIK3C3; MAPK8; CAV1; ABL1; MAPK3; KRAS; SRC; |
| | PIK3C2A; PDGFRB; RAF1; MAP2K2; JAK1; JAK2; |
| | PIK3R1; PDGFRA; STAT3; SPHK1; MAP2K1; MYC; |
| | JUN; CRKL; PRKCA; SRF; STAT1; SPHK2 |
| VEGFシグナリング | ACTN4; ROCK1; KDR; FLT1; ROCK2; MAPK1; PGF; |
| | AKT2; PIK3CA; ARNT; PTK2; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; |
| | BCL2L1; MAPK3; KRAS; HIF1A; NOS3; PIK3C2A; PXN; |
| | RAF1; MAP2K2; ELAVL1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; SFN; |
| | VEGFA; AKT3; FOXO1; PRKCA |
| ナチュラルキラー細胞シグナリング | PRKCE; RAC1; PRKCZ; MAPK1; RAC2; PTPN11; |
| | KIR2DL3; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; |
| | PIK3C3; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PTPN6; |
| | PIK3C2A; LCK; RAF1; FYN; MAP2K2; PAK4; AKT1; |
| | PIK3R1; MAP2K1; PAK3; AKT3; VAV3; PRKCA |
| 細胞周期: G1/S | HDAC4; SMAD3; SUV39H1; HDAC5; CDKN1B; BTRC; |
| チェックポイント調節 | ATR; ABL1; E2F1; HDAC2; HDAC7A; RB1; HDAC11; |
| | HDAC9; CDK2; E2F2; HDAC3; TP53; CDKN1A; CCND1; |
| | E2F4; ATM; RBL2; SMAD4; CDKN2A; MYC; NRG1; |
| | GSK3B; RBL1; HDAC6 |
| T細胞受容体シグナリング | RAC1; ELK1; MAPK1; IKBKB; CBL; PIK3CA; FOS; |
| | NFKB2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; |
| | RELA; PIK3C2A; BTK; LCK; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; |
| | MAP2K2; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; ITK; BCL10; |
| | JUN; VAV3 |
| デス受容体シグナリング | CRADD; HSPB1; BID; BIRC4; TBK1; IKBKB; FADD; |
| | FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; RIPK1; CASP8; |
| | DAXX; TNFRSF10B; RELA; TRAF2; TNF; IKBKG; RELB; |
| | CASP9; CHUK; APAF1; NFKB1; CASP2; BIRC2; CASP3; |
| | BIRC3 |
| FGFシグナリング | RAC1; FGFR1; MET; MAPKAPK2; MAPK1; PTPN11; |
| | AKT2; PIK3CA; CREB1; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; |
| | MAPK3; MAPK13; PTPN6; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; |
| | AKT1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FGFR4; CRKL; ATF4; |
| | AKT3; PRKCA; HGF |
| GM-CSFシグナリング | LYN; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CAMK2A; |

【０３１３】

【表２０】

| | |
|---|---|
| | STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; GNB2L1; BCL2L1; MAPK3; |
| | ETS1; KRAS; RUNX1; PIM1; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; |
| | AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; CCND1; AKT3; |
| | STAT1 |
| 筋萎縮性側索硬化症 | BID; IGF1; RAC1; BIRC4; PGF; CAPNS1; CAPN2; |
| シグナリング | PIK3CA; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; CAPN1; |
| | PIK3C2A; TP53; CASP9; PIK3R1; RAB5A; CASP1; |
| | APAF1; VEGFA; BIRC2; BAX; AKT3; CASP3; BIRC3 |
| JAK/Statシグナリング | PTPN1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; STAT5B; |
| | PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A; |
| | PTPN6; PIK3C2A; RAF1; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; |
| | AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FRAP1; AKT3; |
| | STAT1 |
| ニコチン酸および<br>ニコチンアミド | PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; GRK6; MAPK1; |
| 代謝 | PLK1; AKT2; CDK8; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; |
| | PBEF1; MAPK9; CDK2; PIM1; DYRK1A; MAP2K2; |
| | MAP2K1; PAK3; NT5E; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK |
| ケモカインシグナリング | CXCR4; ROCK2; MAPK1; PTK2; FOS; CFL1; GNAQ; |
| | CAMK2A; CXCL12; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK13; |
| | RHOA; CCR3; SRC; PPP1CC; MAPK14; NOX1; RAF1; |
| | MAP2K2; MAP2K1; JUN; CCL2; PRKCA |
| IL-2シグナリング | ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; FOS; |
| | STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; |
| | SOCS1; STAT5A; PIK3C2A; LCK; RAF1; MAP2K2; |
| | JAK1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; JUN; AKT3 |
| シナプス長期 | PRKCE; IGF1; PRKCZ; PRDX6; LYN; MAPK1; GNAS; |
| 抑圧 | PRKCI; GNAQ; PPP2R1A; IGF1R; PRKD1; MAPK3; |
| | KRAS; GRN; PRKCD; NOS3; NOS2A; PPP2CA; |
| | YWHAZ; RAF1; MAP2K2; PPP2R5C; MAP2K1; PRKCA |
| エストロゲン受容体 | TAF4B; EP300; CARM1; PCAF; MAPK1; NCOR2; |
| シグナリング | SMARCA4; MAPK3; NRIP1; KRAS; SRC; NR3C1; |
| | HDAC3; PPARGC1A; RBM9; NCOA3; RAF1; CREBBP; |
| | MAP2K2; NCOA2; MAP2K1; PRKDC; ESR1; ESR2 |
| タンパク質ユビキチン化 | TRAF6; SMURF1; BIRC4; BRCA1; UCHL1; NEDD4; |
| 経路 | CBL; UBE2I; BTRC; HSPA5; USP7; USP10; FBXW7; |
| | USP9X; STUB1; USP22; B2M; BIRC2; PARK2; USP8; |
| | USP1; VHL; HSP90AA1; BIRC3 |
| IL-10シグナリング | TRAF6; CCR1; ELK1; IKBKB; SP1; FOS; NFKB2; |
| | MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; MAPK14; TNF; |
| | IKBKG; RELB; MAP3K7; JAK1; CHUK; STAT3; NFKB1; |
| | JUN; IL1R1; IL6 |
| VDR/RXR活性化 | PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; GADD45A; HES1; |
| | NCOR2; SP1; PRKCI; CDKN1B; PRKD1; PRKCD; |
| | RUNX2; KLF4; YY1; NCOA3; CDKN1A; NCOA2; SPP1; |

【０３１４】

【表２１】

| | |
|---|---|
| | LRP5; CEBPB; FOXO1; PRKCA |
| TGF-ベータシグナリング | EP300; SMAD2; SMURF1; MAPK1; SMAD3; SMAD1; |
| | FOS; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK9; RUNX2; |
| | SERPINE1; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; |
| | MAP2K1; TGFBR1; SMAD4; JUN; SMAD5 |
| Toll様受容体<br>シグナリング | IRAK1; EIF2AK2; MYD88; TRAF6; PPARA; ELK1; |
| | IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; |
| | RELA; TLR4; MAPK14; IKBKG; RELB; MAP3K7; CHUK; |
| | NFKB1; TLR2; JUN |
| p38 MAPKシグナリング | HSPB1; IRAK1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; FADD; FAS; |
| | CREB1; DDIT3; RPS6KA4; DAXX; MAPK13; TRAF2; |
| | MAPK14; TNF; MAP3K7; TGFBR1; MYC; ATF4; IL1R1; |
| | SRF; STAT1 |
| ニューロトロフィン/TRK<br>シグナリング | NTRK2; MAPK1; PTPN11; PIK3CA; CREB1; FOS; |
| | PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; PIK3C2A; |
| | RAF1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; |
| | CDC42; JUN; ATF4 |
| FXR/RXR活性化 | INS; PPARA; FASN; RXRA; AKT2; SDC1; MAPK8; |
| | APOB; MAPK10; PPARG; MTTP; MAPK9; PPARGC1A; |
| | TNF; CREBBP; AKT1; SREBF1; FGFR4; AKT3; FOXO1 |
| シナプス長期 | PRKCE; RAP1A; EP300; PRKCZ; MAPK1; CREB1; |
| 増強 | PRKCI; GNAQ; CAMK2A; PRKD1; MAPK3; KRAS; |
| | PRKCD; PPP1CC; RAF1; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; |
| | ATF4; PRKCA |
| カルシウムシグナリング | RAP1A; EP300; HDAC4; MAPK1; HDAC5; CREB1; |
| | CAMK2A; MYH9; MAPK3; HDAC2; HDAC7A; HDAC11; |
| | HDAC9; HDAC3; CREBBP; CALR; CAMKK2; ATF4; |
| | HDAC6 |
| EGF シグナリング | ELK1; MAPK1; EGFR; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; |
| | MAPK8; MAPK3; PIK3C2A; RAF1; JAK1; PIK3R1; |
| | STAT3; MAP2K1; JUN; PRKCA; SRF; STAT1 |
| 心血管系中の低酸素症 | EDN1; PTEN; EP300; NQO1; UBE2I; CREB1; ARNT; |
| シグナリング | HIF1A; SLC2A4; NOS3; TP53; LDHA; AKT1; ATM; |
| | VEGFA; JUN; ATF4; VHL; HSP90AA1 |
| RXR機能の | IRAK1; MYD88; TRAF6; PPARA; RXRA; ABCA1; |
| LPS/IL-1 媒介阻害 | MAPK8; ALDH1A1; GSTP1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; |
| | TLR4; TNF; MAP3K7; NR1H2; SREBF1; JUN; IL1R1 |
| LXR/RXR活性化 | FASN; RXRA; NCOR2; ABCA1; NFKB2; IRF3; RELA; |
| | NOS2A; TLR4; TNF; RELB; LDLR; NR1H2; NFKB1; |
| | SREBF1; IL1R1; CCL2; IL6; MMP9 |
| アミロイドプロセシング | PRKCE; CSNK1E; MAPK1; CAPNS1; AKT2; CAPN2; |
| | CAPN1; MAPK3; MAPK13; MAPT; MAPK14; AKT1; |

【０３１５】

【表２２】

| | |
|---|---|
| | PSEN1; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; APP |
| IL-4シグナリング | AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; IRS1; KRAS; SOCS1; |
| | PTPN6; NR3C1; PIK3C2A; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; |
| | FRAP1; AKT3; RPS6KB1 |
| 細胞周期: G2/M DNA | EP300; PCAF; BRCA1; GADD45A; PLK1; BTRC; |
| 損傷チェックポイント | CHEK1; ATR; CHEK2; YWHAZ; TP53; CDKN1A; |
| 調節 | PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A |
| 心血管系中の一酸化窒素シグナリング | KDR; FLT1; PGF; AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; |
| | CAV1; PRKCD; NOS3; PIK3C2A; AKT1; PIK3R1; |
| | VEGFA; AKT3; HSP90AA1 |
| プリン代謝 | NME2; SMARCA4; MYH9; RRM2; ADAR; EIF2AK4; |
| | PKM2; ENTPD1; RAD51; RRM2B; TJP2; RAD51C; |
| | NT5E; POLD1; NME1 |
| cAMP媒介シグナリング | RAP1A; MAPK1; GNAS; CREB1; CAMK2A; MAPK3; |
| | SRC; RAF1; MAP2K2; STAT3; MAP2K1; BRAF; ATF4 |
| ミトコンドリア機能障害 | SOD2; MAPK8; CASP8; MAPK10; MAPK9; CASP9; |
| | PARK7; PSEN1; PARK2; APP; CASP3 |
| Notchシグナリング | HES1; JAG1; NUMB; NOTCH4; ADAM17; NOTCH2; |
| | PSEN1; NOTCH3; NOTCH1; DLL4 |
| 小胞体 | HSPA5; MAPK8; XBP1; TRAF2; ATF6; CASP9; ATF4; |
| ストレス経路 | EIF2AK3; CASP3 |
| ピリミジン代謝 | NME2; AICDA; RRM2; EIF2AK4; ENTPD1; RRM2B; |
| | NT5E; POLD1; NME1 |
| パーキンソン病シグナリング | UCHL1; MAPK8; MAPK13; MAPK14; CASP9; PARK7; |
| | PARK2; CASP3 |
| 心臓およびベータアドレナリン作動性シグナリング | GNAS; GNAQ; PPP2R1A; GNB2L1; PPP2CA; PPP1CC; |
| | PPP2R5C |
| 解糖/糖新生インターフェロン | HK2; GCK; GPI; ALDH1A1; PKM2; LDHA; HK1 |
| シグナリング | IRF1; SOCS1; JAK1; JAK2; IFITM1; STAT1; IFIT3 |
| ソニックヘッジホッグシグナリング | ARRB2; SMO; GLI2; DYRK1A; GLI1; GSK3B; DYRK1B |
| グリセロリン脂質 | PLD1; GRN; GPAM; YWHAZ; SPHK1; SPHK2 |
| 代謝 | |
| リン脂質分解 | PRDX6; PLD1; GRN; YWHAZ; SPHK1; SPHK2 |
| トリプトファン代謝 | SIAH2; PRMT5; NEDD4; ALDH1A1; CYP1B1; SIAH1 |
| リジン分解 | SUV39H1; EHMT2; NSD1; SETD7; PPP2R5C |
| ヌクレオチド除去修復 | ERCC5; ERCC4; XPA; XPC; ERCC1 |
| 経路 | |

【０３１６】

【表２３】

| | |
|---|---|
| デンプンおよびスクロース | UCHL1; HK2; GCK; GPI; HK1 |
| 代謝 | |
| アミノ糖代謝 | NQO1; HK2; GCK; HK1 |
| アラキドン酸 | PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1 |
| 代謝 | |
| サーカディアンリズム | CSNK1E; CREB1; ATF4; NR1D1 |
| シグナリング | |
| 凝固系 | BDKRB1; F2R; SERPINE1; F3 |
| ドーパミン受容体 | PPP2R1A; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C |
| シグナリング | |
| グルタチオン代謝 | IDH2; GSTP1; ANPEP; IDH1 |
| グリセロ脂質代謝 | ALDH1A1; GPAM; SPHK1; SPHK2 |
| リノール酸代謝 | PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1 |
| メチオニン代謝 | DNMT1; DNMT3B; AHCY; DNMT3A |
| ピルビン酸代謝 | GLO1; ALDH1A1; PKM2; LDHA |
| アルギニンおよびプロリン | ALDH1A1; NOS3; NOS2A |
| 代謝 | |
| エイコサノイドシグナリング | PRDX6; GRN; YWHAZ |
| フルクトースおよびマンノース | HK2; GCK; HK1 |
| 代謝 | |
| ガラクトース代謝 | HK2; GCK; HK1 |
| スチルベン、クマリンおよび | PRDX6; PRDX1; TYR |
| リグニン生合成 | |
| 抗原提示 | CALR; B2M |
| 経路 | |
| ステロイドの生合成 | NQO1; DHCR7 |
| ブタン酸代謝 | ALDH1A1; NLGN1 |
| クエン酸回路 | IDH2; IDH1 |
| 脂肪酸代謝 | ALDH1A1; CYP1B1 |
| グリセロリン脂質 | PRDX6; CHKA |
| 代謝 | |
| ヒスチジン代謝 | PRMT5; ALDH1A1 |
| イノシトール代謝 | ERO1L; APEX1 |
| シトクロムp450による | GSTP1; CYP1B1 |
| 生体異物の | |
| 代謝 | |
| メタン代謝 | PRDX6; PRDX1 |
| フェニルアラニン | PRDX6; PRDX1 |
| 代謝 | |
| プロパン酸代謝 | ALDH1A1; LDHA |
| セレノアミノ酸 | PRMT5; AHCY |
| 代謝 | |
| スフィンゴ脂質代謝 | SPHK1; SPHK2 |
| アミノホスホン酸 | PRMT5 |

【０３１７】

【表２４】

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

【０３１８】

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

【０３１９】

本発明のさらなる態様は、ラフォラ病に関連することが同定されているＥＭＰ２ＡおよびＥＭＰ２Ｂ遺伝子の異常の補正のためのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の利用に関する。ラフォラ病は、青年期において癲癇性発作として始まり得る進行性ミオクローヌス癲癇を特徴とする常染色体劣性病態である。この疾患の数例は、未だ同定されていない遺伝子の突然変異により引き起こされ得る。この疾患は、発作、筋痙攣、歩行困難、認知症、および最終的に死亡を引き起こす。現在、疾患進行に対して有効であることが証明されている治療は存在しない。癲癇に関連する他の遺伝子異常を、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系によりターゲティングすることもでき、基礎となる遺伝学は、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ｏｆ Ｅｐｉｌｅｐｓｙ ａｎｄ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｐｉｌｅｐｓｉｅｓ，Ｇｉｕｌｉａｎｏ Ａｖａｎｚｉｎｉ，Ｊｅｆｆｒｅｙ Ｌ．Ｎｏｅｂｅｌｓにより編集，Ｍａｒｉａｎｉ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ Ｐａｅｄｉａｔｒｉｃ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ：２０；２００９）にさらに記載されている。

【０３２０】

本発明のさらに別の態様では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を使用して、Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｄｉｓｅａｓｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｅｙｅ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，編者Ｅｌｉａｓ Ｉ．Ｔｒａｂｏｕｌｓｉ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，２０１２にさらに記載されるいくつかの遺伝子突然変異により生じる眼の異常が補修され得る。

【０３２１】

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

【０３２２】

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

【０３２３】

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

【０３２４】

嗜好関連タンパク質の例としては、例えば、ＡＢＡＴを挙げることができる。

【０３２５】

炎症関連タンパク質の例としては、例えば、Ｃｃｒ２遺伝子によりコードされる単球走

化性タンパク質－１（ＭＣＰ１）、Ｃｃｒ５遺伝子によりコードされるＣ－Ｃケモカイン受容体５型（ＣＣＲ５）、Ｆｃｇｒ２ｂ遺伝子によりコードされるＩｇＧ受容体ＩＩＢ（ＦＣＧＲ２ｂ、ＣＤ３２とも称される）、またはＦｃｅｒ１ｇ遺伝子によりコードされるＦｃイプシロンＲ１ｇ（ＦＣＥＲ１ｇ）タンパク質を挙げることができる。

【０３２６】

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

【０３２７】

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

【０３２８】

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

【０３２９】

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

【０３３０】

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

【０３３１】

腫瘍抑制に関与するタンパク質の例としては、例えば、ＡＴＭ（毛細血管拡張性運動失調症変異）、ＡＴＲ（毛細血管拡張性運動失調症およびＲａｄ３関連）、ＥＧＦＲ（上皮成長因子受容体）、ＥＲＢＢ２（ｖ－ｅｒｂ－ｂ２赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ２）、ＥＲＢＢ３（ｖ－ｅｒｂ－ｂ２赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ３）、ＥＲＢＢ４（ｖ－ｅｒｂ－ｂ２赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ４）、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、またはＮｏｔｃｈ４を挙げることができる。

【０３３２】

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

【０３３３】

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

【０３３４】

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

【０３３５】

プリオン障害における神経変性病態に関連するタンパク質の例としては、例えば、Ａ２Ｍ（アルファ－２－マクログロブリン）、ＡＡＴＦ（アポトーシス拮抗転写因子）、ＡＣＰＰ（前立腺酸性ホスファターゼ）、ＡＣＴＡ２（大動脈平滑筋アクチンアルファ２）、ＡＤＡＭ２２（ＡＤＡＭメタロペプチダーゼドメイン）、ＡＤＯＲＡ３（アデノシンＡ３受容体）、またはＡＤＲＡ１Ｄ（アルファ－１Ｄアドレナリン受容体についてのアルファ－１Ｄアドレナリン作動性受容体）を挙げることができる。

【０３３６】

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

【０３３７】

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

【０３３８】

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

【０３３９】

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

【０３４０】

本発明の系により治療可能な好ましい病態のさらなる例は、以下のものから選択することができる：アルカルディ－グティエール症候群；アレキサンダー病；アラン－ハーンドン－ダッドリー症候群；ＰＯＬＧ関連障害；アルファ－マンノシドーシス（ＩＩおよびＩＩＩ型）；アルストレム症候群；アンジェルマン症候群；毛細血管拡張性運動失調症；神経セロイドリポフスチン症；ベーター－セラサミア；両側性視神経委縮症および（幼児型）視神経委縮症１型；網膜芽腫（両側性）；カナバン病；脳・眼・顔・骨格症候群１［ＣＯ

ＦＳ１］；脳腱黄色腫症；コルネリア・デ・ラング症候群；ＭＡＰＴ関連障害；遺伝性プリオン病；ドラベ症候群；早期発症型家族性アルツハイマー病；フリードライヒ運動失調症［ＦＲＤＡ］；フリンス症候群；フコシドーシス；福山型先天性筋ジストロフィー；ガラクトシアリドーシス；ゴーシェ病；有機酸血症；血球貪食性リンパ組織球症；ハッチンソン－ギルフォード早老症候群；ムコリピドーシスＩＩ型；幼児遊離シアル酸蓄積症；ＰＬＡ２Ｇ６関連神経変性症；ジャーベル・ランゲ－ニールセン症候群；接合型表皮水疱症；ハンチントン病；クラッベ病（幼児型）；ミトコンドリアＤＮＡ関連リー症候群およびＮＡＲＰ；レッシュ－ナイハン症候群；ＬＩＳ１関連滑脳症；ロウ症候群；メープルシロップ尿症；ＭＥＣＰ２重複症候群；ＡＴＰ７Ａ関連銅輸送障害；ＬＡＭＡ２関連筋ジストロフィー；アリールスルファターゼＡ欠損症；ムコ多糖症Ｉ、ＩＩまたはＩＩＩ型；ペルオキシソーム形成異常症、ツェルウェーガー症候群スペクトラム；脳の鉄蓄積症を伴う神経変性症；酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損症；ニーマン－ピック病Ｃ型；グリシン脳症；ＡＲＸ関連障害；尿素サイクル異常症；ＣＯＬ１Ａ１／２関連骨形成不全症；ミトコンドリアＤＮＡ欠失症候群；ＰＬＰ１関連障害；ペリー症候群；フェラン－マクダーモット症候群；グリコーゲン蓄積症ＩＩ型（ポンペ病）（幼児型）；ＭＡＰＴ関連障害；ＭＥＣＰ２関連障害；肢根型点状軟骨異形成症１型；ロバーツ症候群；サンドホフ病；シンドラー病１型；アデノシンデアミナーゼ欠損症；スミス－レムリ－オピッツ症候群；脊髄性筋萎縮症；幼児期発症型脊髄小脳失調症；ヘキソサミニダーゼＡ欠損症；致死性異形成１型；コラーゲンＶＩ型関連障害；アッシャー症候群Ｉ型；先天性筋ジストロフィー；ウォルフ－ヒルシュホーン症候群；リソソーム酸リパーゼ欠損症；ならびに色素性乾皮症。

【０３４１】

明らかなとおり、本発明の系を使用して任意の目的ポリヌクレオチド配列をターゲティングすることができることが想定される。本発明の系を使用して有用に治療することができる病態または疾患の一部の例を上記表に含め、それらの病態に現在関連する遺伝子の例もその表に提供する。しかしながら、例示される遺伝子は排他的なものではない。

【０３４２】

例えば、「野生型ＳｔＣａｓ９」は、タンパク質配列がＳｗｉｓｓＰｒｏｔデータベースにおいて受託番号Ｇ３ＥＣＲ１として提供されるＳ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ（Ｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）由来の野生型Ｃａｓ９を指す。同様に、化膿連鎖球菌（Ｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９が、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔに受託番号Ｑ９９ＺＷ２として含まれる。

【０３４３】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を使用して効率的かつ費用対効果の高い遺伝子編集および操作を実施可能であることにより、生産を向上させかつ形質を強化するための単一の迅速な選択および比較ならびにかかるゲノムを形質転換する多重化した遺伝子操作が実現し得る。この点に関しては、米国特許および公開公報：米国特許第６，６０３，０６１号明細書－アグロバクテリウム属媒介性植物形質転換方法（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ　Ｐｌａｎｔ　Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ　Ｍｅｔｈｏｄ）；米国特許第７，８６８，１４９号明細書－植物ゲノム配列およびその使用（Ｐｌａｎｔ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ａｎｄ　Ｕｓｅｓ　Ｔｈｅｒｅｏｆ）および米国特許出願公開第２００９／０１００５３６号明細書－強化された農業形質を備えるトランスジェニック植物（Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ　Ｐｌａｎｔｓ　ｗｉｔｈ　Ｅｎｈａｎｃｅｄ　Ａｇｒｏｎｏｍｉｃ　Ｔｒａｉｔｓ）（これらの各々の内容および開示は全て、全体として参照により組み込まれる）が参照される。本発明の実施においては、Ｍｏｒｒｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ「作物ゲノミクス：進歩と応用（Ｃｒｏｐ　ｇｅｎｏｍｉｃｓ：ａｄｖａｎｃｅｓ　ａｎｄ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ）」Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｇｅｎｅｔ．２０１１　Ｄｅｃ　２９；１３（２）：８５－９６の内容および開示もまた、本明細書に全体として参照により組み込まれる。

【実施例】

【０３４４】

以下の実施例を、本発明の種々の実施形態を説明する目的のために挙げ、それらは本発

明をいかなる様式にも限定することを意味しない。本実施例は、本明細書に記載の方法とともに、目下好ましい実施形態の代表例であり、例示であり、本発明の範囲に対する限定を意図するものではない。特許請求の範囲の範囲により定義される本発明の趣旨に包含されるその変更および他の使用は、当業者が行う。

【０３４５】

実施例１：クローニングおよび送達を単純化する方法論的改良。

プラスミド上のＵ６プロモーターおよびガイドＲＮＡをコードするよりむしろ、本出願人らはＵ６プロモーターをＤＮＡオリゴと共に増幅してガイドＲＮＡを付加した。得られたＰＣＲ産物を細胞に形質移入してガイドＲＮＡの発現をドライブすることができる。

【０３４６】

Ｕ６プロモーター：：ヒトＥｍｘ１遺伝子座を標的にするガイドＲＮＡからなるＰＣＲ産物の生成を可能にする例示的プライマー対：

フォワードプライマー：

【化２】

AAACTCTAGAgagggcctatttcccatgattc

リバースプライマー（ガイドＲＮＡ（下線）を有する）：

【化３】

acctctagAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGC
CTTATTTTAACTTGCTATGCTGTTTTGTTTCCAAAACAGCATAGCTCTAAAACCCC
TAGTCATTGGAGGTGACGGTGTTTCGTCCTTTCCACaag

【０３４７】

実施例２：活性を向上させる方法論的改良：

真核細胞でガイドＲＮＡを発現させるためにｐｏｌ３プロモーター、詳細にはＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ（例えばＵ６またはＨ１プロモーター）を使用するよりむしろ、本出願人らは真核細胞でＴ７ポリメラーゼを発現させることにより、Ｔ７プロモーターを使用してガイドＲＮＡの発現をドライブする。

【０３４８】

この系の一例は、３つのＤＮＡ断片の導入を伴い得る：

１．Ｃａｓ９の発現ベクター

２．Ｔ７ポリメラーゼの発現ベクター

３．Ｔ７プロモーターと融合したガイドＲＮＡを含む発現ベクター

【０３４９】

実施例３：Ｃａｓ９の毒性を低下させる方法論的改良：ｍＲＮＡ形態のＣａｓ９の送達。

Ｃａｓ９をｍＲＮＡの形態で送達することにより、細胞でのＣａｓ９の一過性発現が可能となり、毒性が低下する。例えば、ヒト化ＳｐＣａｓ９は、以下のプライマー対を使用して増幅し得る：

フォワードプライマー（インビトロ転写用にＴ７プロモーターを付加するため）：

【化４】

TAATACGACTCACTATAGGAAGTGCGCCACCATGGCCCCAAAGAAGAAGCGG

リバースプライマー（ポリＡテールを付加するため）：

【化５】

GGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTttcttaCTTTTTCTTTTTTGCCTGGCCG

本出願人らは、真核細胞におけるガイドＲＮＡ発現をドライブするようにＲＮＡまたは

ＤＮＡカセットの形態のいずれかのガイドＲＮＡと共にＣａｓ９　ｍＲＮＡを細胞に形質移入する。

【０３５０】

実施例４：Ｃａｓ９の毒性を低下させる方法論的改良：誘導性プロモーターの使用

本出願人らは、ゲノム改変を実行するのに必要となった場合に限りＣａｓ９発現を一過性にオンにする。誘導性システムの例には、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Ｔｅｔ－ＯｎまたはＴｅｔ－Ｏｆｆ）、小分子２ハイブリッド転写活性化システム（ＦＫＢＰ、ＡＢＡ等）、または光誘導性システム（フィトクロム、ＬＯＶドメイン、またはクリプトクロム）が含まれる。

【０３５１】

実施例５：インビボ適用のためのＣａｓ９系の改良

本出願人らは、低分子量のＣａｓ９に対してメタゲノム検索を行った。多くのＣａｓ９ホモログはかなり大きい。例えばＳｐＣａｓ９は約１３６８アミノ酸長であり、これは大き過ぎるため送達用のウイルスベクターへのパッケージングが容易でない。ＧｅｎＢａｎｋに寄託されている配列からＣａｓ９ホモログの長さ分布を表すグラフが作成される（図５）。配列の中には誤って注釈されているものもあり、従って各長さについての正確な度数は必ずしも正しいとは限らない。それでもなお、これによりＣａｓ９タンパク質の分布の概観が得られ、より短いＣａｓ９ホモログの存在が示唆される。

【０３５２】

本出願人らは、コンピュータ解析により、細菌株カンピロバクター属（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ）に１０００アミノ酸未満のＣａｓ９タンパク質が２つあることを見出した。カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）由来の１つのＣａｓ９の配列を以下に提供する。この長さでは、ＣｊＣａｓ９は、初代細胞へのおよび動物モデルにおけるインビボでのロバストな送達のためＡＡＶ、レンチウイルス、アデノウイルス、および他のウイルスベクターに容易にパッケージングすることができる。本発明の好ましい実施形態では、黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）由来のＣａｓ９タンパク質が使用される。

【０３５３】

＞カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）Ｃａｓ９（ＣｊＣａｓ９）

【化６】

MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLAR
SARKRLARRKARLNHLKHLIANEFKLNYEDYQSFDESLAKAYKGSLISPYELRFRALN
ELLSKQDFARVILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYQSVGEYLYK
EYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYERCIAQSFLKDELKLIFKKQREFGFSFSKKFEEEVL
SVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRIINLLNNLKNTEGIL
YTKDDLNALLNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGTYFIEFKKYKEFIKAL
GEHNLSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQIDSLSKLEFKDHLNISFKAL
KLVTPLMLEGKKYDEACNELNLKVAINEDKKDFLPAFNETYYKDEVTNPVVLRAIKE
YRKVLNALLKKYGKVHKINIELAREVGKNHSQRAKIEKEQNENYKAKKDAELECEK
LGLKINSKNILKLRLFKEQKEFCAYSGEKIKISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSFDDSYMN
KVLVFTKQNQEKLNQTPFEAFGNDSAKWQKIEVLAKNLPTKKQKRILDKNYKDKEQ
KNFKDRNLNDTRYIARLVLNYTKDYLDFLPLSDDENTKLNDTQKGSKVHVEAKSGM
LTSALRHTWGFSAKDRNNHLHHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAK
KISELDYKNKRKFFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFYQS
YGGKEGVLKALELGKIRKVNGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFALK
VLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYEFCFSLYKDSLILIQTKDMQEPEFVYYNAFTSS
TVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVFEKYIVSALGEVTKA
EFRQREDFKK

【０３５４】

このＣｊＣａｓ９に対する推定ｔｒａｃｒＲＮＡエレメントは以下である：

【化７】

TATAATCTCATAAGAAATTTAAAAAGGGACTAAAATAAAGAGTTTGCG
GGACTCTGCGGGGTTACAATCCCCTAAAACCGCTTTTAAAATT

【０３５５】

ダイレクトリピート配列は以下である：

【化８】

ATTTTACCATAAAGAAATTTAAAAAGGGACTAAAAC

【０３５６】

ＣｊＣａｓ９に対するキメラガイドＲＮＡの例は以下である：

【化９】

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGUCCCGAAAGGGACUAAAAU
AAAGAGUUUGCGGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU

【０３５７】

実施例６：Ｃａｓ９最適化

機能強化のためまたは新規機能を開発するため、本出願人らは異なるＣａｓ９ホモログの断片を組み合わせることにより、キメラＣａｓ９タンパク質を作成する。例えば、２つの例示的なキメラＣａｓ９タンパク質：

例えば、本出願人らは、Ｓｔ１Ｃａｓ９（このタンパク質からの断片は太字とする）のＮ末端を、ＳｐＣａｓ９（このタンパク質からの断片には下線を引く）のＣ末端と融合し

た。

＞Ｓｔ１（Ｎ）Ｓｐ（Ｃ）Ｃａｓ９

【化１０】

MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTN
RQGRRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEE
LFIALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLERY
QTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEFINR
YLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEFRAAK
ASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAKLFKYIAK
LLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETLDKLAYVLT
LNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGWHNFSVKLMME
LIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIYNPVVAKSVRQAIK
IVNAAIKEYGDFDNIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE
NTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT
RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDK
AGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQ
FYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV
LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSV
LVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS
LFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF
VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNL
GAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD

＞Ｓｐ（Ｎ）Ｓｔ１（Ｃ）Ｃａｓ９

【化１１】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGA
LLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVE
EDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRG
HFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENL
IAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIG
DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ
QLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLL
RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN
SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKANKDEKDAAMLKAANQYNGKA
ELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYTGKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSI
TFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNK
KKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLVDTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVR
GQFTSQLRRHWGIEKTRDTYHHHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEDQL
LDIETGELISDDEYKESVFKAPYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATI
YATRQAKVGKDKADETYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQT
FEKVIEPILENYPNKQINEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYY
DSKLGNHIDITPKDSNNKVVLQSVSPWRADVYFNKTTGKYEILGLKYADLQFEKG
TGTYKISQEKYNDIKKKEGVDSDSEFKFTLYKNDLLLVKDTETKEQQLFRFLSRT
MPKQKHYVELKPYDKQKFEGGEALIKVLGNVANSGQCKKGLGKSNISIYKVRTD
VLGNQHIIKNEGDKPKLDF

【０３５８】

キメラＣａｓ９を作製することの利益には、以下が含まれる：

毒性が低下する

真核細胞における発現が向上する

特異性が強化される

タンパク質の分子量が低下し、異なるＣａｓ９ホモログからの最も小さいドメインを組み合わせることによりタンパク質が小さくなる。

ＰＡＭ配列要件の変更

【０３５９】

実施例７：汎用ＤＮＡ結合タンパク質としてのＣａｓ９の利用

本出願人らは、ＤＮＡ標的の両鎖の開裂に関与する２つの触媒ドメイン（Ｄ１０およびＨ８４０）を突然変異させることにより、Ｃａｓ９を汎用ＤＮＡ結合タンパク質として使用した。標的遺伝子座における遺伝子転写を上方制御するため、本出願人らはＣａｓ９に転写活性化ドメイン（ＶＰ６４）を融合した。本出願人らは、転写因子活性化強度が標的で費やされる時間の関数であるため、Ｃａｓ９－ＶＰ６４融合タンパク質の強力な核局在

を認めることが重要であるという仮説を立てた。従って、本出願人らは一組のＣａｓ９－ＶＰ６４－ＧＦＰ構築物をクローニングし、それらを２９３細胞に形質移入し、形質移入後１２時間でその局在を蛍光顕微鏡下で評価した。

【０３６０】

嵩高いＧＦＰの存在が妨げとなることなく構築物を機能的に試験するため、同じ構築物を、直接的な融合ではなく、２Ａ－ＧＦＰとしてクローニングした。Ｓｏｘ２遺伝子座は細胞の再プログラム化に有用となり得るとともに、この遺伝子座はＴＡＬＥ－ＴＦ媒介性転写活性化の標的として既に検証されているため、本出願人らはＳｏｘ２遺伝子座をＣａｓ９トランス活性化因子による標的とすることにした。Ｓｏｘ２遺伝子座について、本出願人らは転写開始部位（ＴＳＳ）近傍の８つの標的を選んだ。各標的は２０ｂｐ長であり、隣接するＮＧＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を有した。各Ｃａｓ９－ＶＰ６４構築物を各ＰＣＲ生成キメラｃｒｉｓｐｒ　ＲＮＡ（ｃｈｉＲＮＡ）と２９３細胞に同時形質移入した。形質移入後７２時間でＲＴ－ｑＰＣＲを使用して転写活性化を評価した。

【０３６１】

転写活性化因子をさらに最適化するため、本出願人らは、ｃｈｉＲＮＡ（Ｓｏｘ２．１およびＳｏｘ２．５）とＣａｓ９（ＮＬＳ－ＶＰ６４－ＮＬＳ－ｈＳｐＣａｓ９－ＮＬＳ－ＶＰ６４－ＮＬＳ）との比率をタイトレートし、２９３細胞に形質移入し、およびＲＴ－ｑＰＣＲを使用して定量化した。これらの結果は、Ｃａｓ９を汎用ＤＮＡ結合ドメインとして使用して標的遺伝子座における遺伝子転写を上方制御し得ることを示している。

【０３６２】

本出願人らは、第２世代の構築物を設計した（以下の表）。

【０３６３】

【表２５】

| |
|---|
| pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-VP64-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A)-NLS |
| pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-VP64-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A) |
| pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-VP64-NLS-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A) |
| pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A)-NLS |
| pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A) |
| pLenti-EF1a-GFP-2A-6xHis-NLS-NLS-hSpCsn1(D10A, H840A) |

【０３６４】

本出願人らはこれらの構築物を使用して転写活性化（ＶＰ６４融合構築物）および抑制（Ｃａｓ９のみ）をＲＴ－ｑＰＣＲにより評価する。本出願人らは抗Ｈｉｓ抗体を使用して各構築物の細胞局在を評価し、Ｓｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイを使用してヌクレアーゼ活性を評価し、およびゲルシフトアッセイを使用してＤＮＡ結合親和性を評価する。本発明の好ましい実施形態において、ゲルシフトアッセイはＥＭＳＡゲルシフトアッセイである。

【０３６５】

実施例８：Ｃａｓ９トランスジェニックおよびノックインマウス

Ｃａｓ９ヌクレアーゼを発現するマウスを作成するため、本出願人らは２つの一般的戦略、トランスジェニックとノックインとを提示する。これらの戦略は、目的とする任意の他のモデル生物の作成、例えばラットに適用し得る。これらの一般的戦略の各々について、本出願人らは、構成的に活性なＣａｓ９と、条件的に発現する（Ｃｒｅリコンビナーゼ依存性の）Ｃａｓ９とを作製する。構成的に活性なＣａｓ９ヌクレアーゼは以下のコンテクストで発現する：ｐＣＡＧ－ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＮＬＳ－Ｐ２Ａ－ＥＧＦＰ－ＷＰＲＥ－ｂＧＨｐｏｌｙＡ。ｐＣＡＧはプロモーターであり、ＮＬＳは核局在化シグナルであり

、Ｐ２Ａはペプチド開裂配列であり、ＥＧＦＰは高感度緑色蛍光タンパク質であり、ＷＰＲＥはウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメントであり、およびｂＧＨｐｏｌｙＡはウシ成長ホルモンポリＡシグナル配列である（図７Ａ～図７Ｂ）。条件的バージョンは、プロモーターの後ろおよびＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＮＬＳの前に１つのさらなる終止カセットエレメント、ｌｏｘＰ－ＳＶ４０　ｐｏｌｙＡ　ｘ３－ｌｏｘＰを有する（すなわち　ｐＣＡＧ－ｌｏｘＰ－ＳＶ４０ｐｏｌｙＡｘ３－ｌｏｘＰ－ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＮＬＳ－Ｐ２Ａ－ＥＧＦＰ－ＷＰＲＥ－ｂＧＨｐｏｌｙＡ）。重要な発現エレメントは図８のとおり可視化することができる。構成的構築物は開発全体を通して全ての細胞型で発現しなければならないが、条件的構築物は、同じ細胞がＣｒｅリコンビナーゼを発現するときに限りＣａｓ９発現を可能にし得る。この後者のバージョンは、Ｃｒｅが組織特異的プロモーターの発現下にあるときＣａｓ９の組織特異的発現を可能にし得る。さらに、ＣｒｅをＴＥＴ　ｏｎまたはｏｆｆシステムなどの誘導性プロモーターの発現下に置くことにより、Ｃａｓ９発現を成体マウスで誘導することができる。

【０３６６】

Ｃａｓ９構築物の検証：各プラスミドを３つの方法で機能検証した：１）２９３細胞における一過性形質移入と、続くＧＦＰ発現の確認；２）２９３細胞における一過性形質移入と、続くＰ２Ａ配列を認識する抗体を使用した免疫蛍光法；および３）一過性形質移入と、続くＳｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイ。２９３細胞は、目的の細胞に応じて２９３ＦＴ細胞または２９３　Ｔ細胞であってもよい。好ましい実施形態では、細胞は２９３ＦＴ細胞である。Ｓｕｒｖｅｙｏｒの結果は、条件的および構成的構築物についてゲルのそれぞれ最上列および最下列で実施した。各々を、ｈＥＭＸ１遺伝子座を標的にするキメラＲＮＡ（キメラＲＮＡ　ｈＥＭＸ１．１）の存在下および非存在下で試験した。結果は、この構築物がキメラＲＮＡ（および条件的の場合にはＣｒｅ）の存在下においてのみｈＥＭＸ１遺伝子座のターゲティングに成功し得ることを示している。ゲルを定量化した。結果は３試料の平均切断効率および標準偏差として提供する。

【０３６７】

トランスジェニックＣａｓ９マウス：構築物を有するトランスジェニックマウスを作成するため、本出願人らは純粋な線状ＤＮＡを偽妊娠ＣＢ５６雌由来の接合体の前核に注入する。ファウンダーを同定し、遺伝子型を決定し、ＣＢ５７マウスと戻し交配させる。構築物がクローニングが成功し、これはサンガーシーケンシングによって確認された。

【０３６８】

ノックインＣａｓ９マウス：Ｃａｓ９ノックインマウスを作成するため、本出願人らは同じ構成的および条件的構築物をＲｏｓａ２６遺伝子座にターゲティングする。本出願人らはこれを、以下のエレメントを有するＲｏｓａ２６ターゲティングベクターに各々をクローニングすることにより行った：Ｒｏｓａ２６ショート相同性アーム－構成的／条件的Ｃａｓ９発現カセット－ｐＰＧＫ－Ｎｅｏ－Ｒｏｓａ２６ロング相同性アーム－ｐＰＧＫ－ＤＴＡ。ｐＰＧＫは、ＰＧＫによりドライブされる、ネオマイシンに対する耐性を付与するポジティブ選択マーカーＮｅｏ、１ｋｂショートアーム、４．３ｋｂロングアーム、およびネガティブ選択ジフテリア毒素（ＤＴＡ）に対するプロモーターである。

【０３６９】

２つの構築物をＲ１　ｍＥＳＣにエレクトロポレートし、２日間成長させておいた後、ネオマイシン選択を適用した。５～７日目まで生存していた個々のコロニーを取り、個別のウェルで成長させた。５～７日後にコロニーを回収し、半分は凍結し、残りの半分は遺伝子タイピングに使用した。遺伝子タイピングはゲノムＰＣＲにより行い、ここでは一方のプライマーをドナープラスミド（ＡｔｔｐＦ）内にアニールし、他方のプライマーをショート相同性アーム（Ｒｏｓａ２６－Ｒ）の外側にアニールした。条件的ケース用に回収した２２個のコロニーのうち、７個が陽性であった（左）。構成的ケース用に回収した２７個のコロニーのうち、陽性は０個であった（右）。Ｃａｓ９がｍＥＳＣにおいてあるレベルの毒性を引き起こし、そのため陽性クローンがなかったものと思われる。これを試験するため、本出願人らは正しくターゲティングされる条件的Ｃａｓ９細胞にＣｒｅ発現プ

ラスミドを導入し、培養下で何日も経った後にも極めて低毒性であることを認めた。正しくターゲティングされる条件的Ｃａｓ９細胞におけるＣａｓ９のコピー数の低下（細胞当たり１～２コピー）は、安定発現および相対的な無細胞毒性を可能にするのに十分である。さらに、このデータはＣａｓ９コピー数が毒性を決定することを示している。エレクトロポレーション後、各細胞は数コピーのＣａｓ９を得るはずで、これが、構成的Ｃａｓ９構築物の場合に陽性コロニーが認められなかった理由であると思われる。これは、条件的Ｃｒｅ依存戦略を利用すると毒性の低下が示されるはずであるという強力なエビデンスを提供する。本出願人らは、正しくターゲティングされる細胞を胚盤胞に注入して雌マウスに移植する。キメラを同定し、戻し交配させる。ファウンダーを同定し、遺伝子型を決定する。

【０３７０】

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

【０３７１】

実施例９：Ｃａｓ９の多様性およびキメラＲＮＡ

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、細菌および古細菌にわたる多様な種により用いられる侵入外来性ＤＮＡに対する適応免疫機構である。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座への外来ＤＮＡの「獲得」に関与するタンパク質をコードする一組の遺伝子、ならびにＤＮＡ開裂機構の「遂行」をコードする一組の遺伝子からなる；これらには、ＤＮＡヌクレアーゼ（Ｃａｓ９）、非コードトランス活性化ｃｒ－ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）、および外来ＤＮＡ由来のスペーサーにダイレクトリピートが隣接したアレイ（ｃｒＲＮＡ）が含まれる。Ｃａｓ９による成熟時、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡ二重鎖が、スペーサーガイド配列により特定されるＣａｓ９ヌクレアーゼを標的ＤＮＡ配列にガイドし、開裂に必要でかつ各ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系に特異的な、標的ＤＮＡの短鎖配列モチーフ近傍でのＤＮＡの二本鎖切断を媒介する。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は細菌界全体にわたり見られ、Ｃａｓ９タンパク質配列およびサイズ、ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡダイレクトリピート配列、これらのエレメントのゲノム構成、および標的開裂のモチーフ要件の点で高度に多様である。１つの種が複数の異なるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を有し得る。

【０３７２】

本出願人らは、既知のＣａｓ９との配列相同性および既知のサブドメイン、例えばＨＮＨエンドヌクレアーゼドメインおよびＲｕｖＣエンドヌクレアーゼドメイン［Ｅｕｇｅｎｅ　ＫｏｏｎｉｎおよびＫｉｒａ　Ｍａｋａｒｏｖａからの情報］とオルソロガスな構造に基づき同定された細菌種から２０７個の推定Ｃａｓ９を評価した。このセットのタンパク質配列保存に基づく系統発生解析から、３群の大型Ｃａｓ９（約１４００アミノ酸）および２群の小型Ｃａｓ９（約１１００アミノ酸）を含む５つのＣａｓ９ファミリーが明らかとなった（図３および図４Ａ～図４Ｆ）。

【０３７３】

本出願人らはまた、インビトロ方法を用いてＣａｓ９ガイドＲＮＡの最適化も行ってい

る。
【０３７４】
実施例１０：Ｃａｓ９突然変異
本実施例において、本出願人らは、以下の突然変異がＳｐＣａｓ９をニック形成酵素に変換し得ることを示す：Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａ、Ｄ９８６Ａ。
【０３７５】
本出願人らは、突然変異点がＳｐＣａｓ９遺伝子内のどこに局在するかを示す配列を提供する（図６Ａ～図６Ｍ）。本出願人らは、ニッカーゼが相同組換えを依然として媒介し得ることも示す。さらに、本出願人らは、これらの突然変異を有するＳｐＣａｓ９が（個々に）二本鎖切断を誘導しないことを示す。
【０３７６】
Ｃａｓ９オルソログは全て、３～４個のＲｕｖＣドメインおよびＨＮＨドメインの一般的構成を共有する。最も５’側のＲｕｖＣドメインが非相補鎖を開裂し、ＨＮＨドメインが相補鎖を開裂する。表記は全てガイド配列を参照する。
【０３７７】
５’ＲｕｖＣドメインの触媒残基は、目的のＣａｓ９を他のＣａｓ９オルソログ（化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座、Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座１、Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座３、およびフランシセラ・ノビシダ（Ｆｒａｎｃｉｓｃｉｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ）ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座由来）と相同性比較することによって同定され、保存されたＡｓｐ残基をアラニンに突然変異させることにより、Ｃａｓ９が相補鎖ニッキング酵素に変換される。同様に、ＨＮＨドメインの保存されたＨｉｓおよびＡｓｎ残基をアラニンに突然変異させることにより、Ｃａｓ９が非相補鎖ニッキング酵素に変換される。
【０３７８】
実施例１１：Ｃａｓ９転写活性化およびＣａｓ９リプレッサー
Ｃａｓ９転写活性化
第２世代の構築物を設計してパイプライン中で試験する（表１）。これらの構築物を使用して転写活性化（ＶＰ６４融合構築物）および抑制（Ｃａｓ９のみ）をＲＴ－ｑＰＣＲにより評価する。本出願人らは、抗Ｈｉｓ抗体を使用して各構築物の細胞局在を評価し、Ｓｕｒｖｅｙｏｒヌクレアーゼアッセイを使用してヌクレアーゼ活性を評価し、およびゲルシフトアッセイを使用してＤＮＡ結合親和性を評価する。
【０３７９】
Ｃａｓリプレッサー
ｄＣａｓ９を汎用ＤＮＡ結合ドメインとして使用して遺伝子発現を抑制し得ることがこれまでに示されている。本出願人らは、改良されたｄＣａｓ９設計ならびにリプレッサードメインＫＲＡＢおよびＳＩＤ４ｘに対するｄＣａｓ９融合を報告する。表１におけるＣａｓ９を使用して転写を調節するため作成されたプラスミドライブラリから、以下のリプレッサープラスミドがｑＰＣＲにより機能的に特徴付けられた：ｐＸＲＰ２７、ｐＸＲＰ２８、ｐＸＲＰ２９、ｐＸＲＰ４８、ｐＸＲＰ４９、ｐＸＲＰ５０、ｐＸＲＰ５１、ｐＸＲＰ５２、ｐＸＲＰ５３、ｐＸＲＰ５６、ｐＸＲＰ５８、ｐＸＲＰ５９、ｐＸＲＰ６１、およびｐＸＲＰ６２。
【０３８０】
各ｄＣａｓ９リプレッサープラスミドを、β－カテニン遺伝子のコード鎖にターゲティングされた２つのガイドＲＮＡと共に同時形質移入した。形質移入後７２時間でＲＮＡを単離し、ＲＴ－ｑＰＣＲによって遺伝子発現を定量化した。内在性対照遺伝子はＧＡＰＤＨであった。２つのバリデートされたｓｈＲＮＡを陽性対照として使用した。陰性対照はｇＲＮＡなしに形質移入した特定のプラスミド（これらは「ｐＸＲＰ＃＃対照」と表される）であった。プラスミドｐＸＲＰ２８、ｐＸＲＰ２９、ｐＸＲＰ４８、およびｐＸＲＰ

４９は、指定される標的化戦略を用いるときβ－カテニン遺伝子を抑制することができた。このようなプラスミドは、機能ドメインを有しないｄＣａｓ９（ｐＸＲＰ２８およびｐＸＲＰ２８）、およびＳＩＤ４ｘに融合したｄＣａｓ９（ｐＸＲＰ４８およびｐＸＲＰ４９）に対応する。

【０３８１】

さらなる研究では以下を調べる：上記の実験の反復、種々の遺伝子のターゲティング、他のｇＲＮＡを利用した最適なターゲティング位置の決定、および多重抑制。

【０３８２】

【表２６】

**表1**

| |
|---|
| pXRP024-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP025-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-$GGGGS_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP026-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-$EAAAK_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP027-pLenti2-EF1a-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP028-pLenti2-EF1a-NLS-$GGGGS_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP029-pLenti2-EF1a-NLS-$EAAAK_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP030-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP031-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP032-pLenti2-LTR-VP64-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP033-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-$GGGGS_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP034-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-$GGGGS_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP035-pLenti2-LTR-VP64-NLS-$GGGGS_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP036-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-$EAAAK_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP037-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-$EAAAK_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP038-pLenti2-LTR-VP64-NLS-$EAAAK_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP048-pLenti2-EF1a-SID4x-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP049-pLenti2-EF1a-SID4X-NLS-$GGGGS_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |

【０３８３】

【表２７】

| |
|---|
| pXRP050-pLenti2-EF1a-SID4X-NLS-EAAAK$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP051-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-FLAG-リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP052-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-GGGGS$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP053-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-EAAAK$_3$リンカー-dCas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP054-pLenti2-EF1a-dCas9-リンカー-FLAG-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP055-pLenti2-EF1a-dCas9-リンカー-FLAG-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP056-pLenti2-EF1a-dCas9-リンカー-FLAG-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP057-pLenti2-EF1a-dCas9-GGGGGS$_3$-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP058-pLenti2-EF1a-dCas9-GGGGGS$_3$-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP059-pLenti2-EF1a-dCas9-GGGGGS$_3$-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP060-pLenti2-EF1a-dCas9-EAAAK$_3$-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP061-pLenti2-EF1a-dCas9-EAAAK$_3$-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP062-pLenti2-EF1a-dCas9-EAAAK$_3$-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP024-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP025-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP026-pLenti2-EF1a-VP64-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP027-pLenti2-EF1a-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP028-pLenti2-EF1a-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP029-pLenti2-EF1a-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP030-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP031-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP032-pLenti2-LTR-VP64-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP033-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP034-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP035-pLenti2-LTR-VP64-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP036-pLenti2-pSV40-VP64-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP037-pLenti2-pPGK-VP64-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP038-pLenti2-LTR-VP64-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP048-pLenti2-EF1a-SID4x-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP049-pLenti2-EF1a-SID4X-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP050-pLenti2-EF1a-SID4X-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP051-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-FLAG-リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP052-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-GGGGS$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP053-pLenti2-EF1a-KRAB-NLS-EAAAK$_3$リンカー-Cas9-NLS-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP054-pLenti2-EF1a-Cas9-リンカー-FLAG-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP055-pLenti2-EF1a-Cas9-リンカー-FLAG-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP056-pLenti2-EF1a-Cas9-リンカー-FLAG-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP057-pLenti2-EF1a-Cas9-GGGGGS$_3$-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP058-pLenti2-EF1a-Cas9-GGGGGS$_3$-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP059-pLenti2-EF1a-Cas9-GGGGGS$_3$-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE |

【０３８４】

【表２８】

| |
|---|
| pXRP060-pLenti2-EF1a-Cas9-EAAAK$_3$-NLS-VP64-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP061-pLenti2-EF1a-Cas9-EAAAK$_3$-NLS-SID4X-gLuc-2A-GFP-WPRE |
| pXRP062-pLenti2-EF1a-Cas9-EAAAK$_3$-NLS-KRAB-gLuc-2A-GFP-WPRE |

【０３８５】
実施例１２：コレステロール生合成、脂肪酸生合成、および他の代謝疾患に関与する遺伝子、アミロイド病および他の疾患に関与する誤って折り畳まれたタンパク質をコードする遺伝子、細胞形質転換を引き起こす癌遺伝子、潜伏ウイルス遺伝子、および数ある障害の中でも特にドミナントネガティブ障害を引き起こす遺伝子の標的欠失。
本出願人らは、ウイルス送達系あるいはナノ粒子送達系を用いた、代謝疾患、アミロイドーシスおよびタンパク質凝集関連疾患、遺伝子突然変異および転座により生じる細胞形質転換、遺伝子突然変異のドミナントネガティブ効果、潜伏ウイルス感染、および他の関連症状に罹患した、必要性のある対象または患者における肝組織、脳組織、眼組織、上皮組織、造血組織、または別の組織でのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の遺伝子送達を実証する。
【０３８６】
研究設計：代謝疾患、アミロイドーシスおよびタンパク質凝集関連疾患に罹患した、必要性のある対象または患者としては、限定はされないが、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、他の家畜および関連哺乳動物が含まれる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系はキメラガイドＲＮＡにガイドされ、開裂しようとするヒトゲノム遺伝子座の特定の部位を標的にする。開裂および非相同末端結合媒介性修復の後、フレームシフト突然変異により遺伝子のノックアウトがもたらされる。
【０３８７】
本出願人らは、上述の障害に関わる遺伝子を標的にするガイドＲＮＡを、最小限のオフターゲット活性で内因性遺伝子座に特異的であるように選択する。２つ以上のガイドＲＮＡを単一のＣＲＩＳＰＲアレイにコードすることによりＤＮＡに同時の二本鎖切断を誘導し、罹患した遺伝子または染色体領域の微小欠失を生じさせてもよい。
【０３８８】
遺伝子標的の同定および設計
各候補疾患遺伝子について、本出願人らは目的のＤＮＡ配列を選択し、それにはタンパク質コードエクソン、既知のドミナントネガティブ突然変異部位を含みかつそれに隣接する配列、病的反復配列を含みかつそれに隣接する配列が含まれる。遺伝子ノックアウト手法に関して、開始コドンに最も近接した初期コードエクソンが、完全なノックアウトを達成し、かつ部分的な機能を保持するトランケート型タンパク質産物となる可能性を最小限に抑えるのに最良の選択肢を提供する。
【０３８９】
本出願人らは、ＮＧＧモチーフ（ＳｐＣａｓ９系について）またはＮＮＡＧＡＡＷ（Ｓｔ１Ｃａｓ９系について）の直ちに５’側にある可能な全てのターゲティング可能２０ｂｐ配列に関して目的の配列を分析する。本出願人らは、特異性を決定する計算アルゴリズムに基づきオフターゲット効果が最小限に抑えられるように、ゲノムにおけるＲＮＡによってガイドされるユニークな単一のＣａｓ９認識用配列を選択する。
【０３９０】
送達系へのガイド配列のクローニング
ガイド配列は二本鎖２０～２４ｂｐオリゴヌクレオチドとして合成される。オリゴを５’－リン酸化処理し、アニーリングにより二重鎖を形成した後、オリゴを送達方法に応じた好適なベクターにライゲートする：
ウイルスベースの送達方法
ＡＡＶベースのベクター（ＰＸ２６０、３３０、３３４、３３５）が他の部分に記載されている。
レンチウイルスベースのベクターは、Ｕ６プロモーターによってドライブされるキメラＲＮＡ足場と、ＥＦ１ａプロモーターによってドライブされるＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼとを担持する単一のベクターにガイド配列を直接ライゲートする同様のクローニング戦略を用いる。
【０３９１】
ウイルス産生については他の部分に記載される。

ナノ粒子ベースのＲＮＡ送達方法
１．Ｔ７プロモーター－ガイド配列キメラＲＮＡをコードするオリゴヌクレオチド二重鎖としてガイド配列を合成する。Ｔ７プロモーターを Ｃａｓ９の５’にＰＣＲ方法によって付加する。
【０３９２】
２．Ｔ７によりドライブされるＣａｓ９およびガイドキメラＲＮＡをインビトロで転写し、市販のキットを使用してＣａｓ９　ｍＲＮＡをさらにキャッピングし、Ａテールを付加する。キットの説明書に従いＲＮＡ産物を精製する。
【０３９３】
流体力学的尾静脈送達方法（マウスに対して）
ガイド配列を、上記および本出願の他の部分に記載するとおりＡＡＶプラスミドにクローニングする。
【０３９４】
細胞系に関するインビトロ検証
形質移入
１．ＤＮＡプラスミド形質移入
ガイド配列を担持するプラスミドをヒト胎児腎臓（ＨＥＫ２９３Ｔ）細胞またはヒト胚性幹（ｈＥＳ）細胞、他の関連性のある細胞型に、脂質ベース、化学ベースまたはエレクトロポレーションベースの方法を使用して形質移入する。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の２４ウェル形質移入（約２６０，０００細胞）に対しては、５００ｎｇの総ＤＮＡを、リポフェクタミン２０００を使用して各ウェルに形質移入する。ｈＥＳ細胞の１２ウェル形質移入に対しては、１ｕｇの総ＤＮＡを、Ｆｕｇｅｎｅ　ＨＤを使用して単一のウェルに形質移入する。
【０３９５】
２．ＲＮＡ形質移入
上記に記載する精製ＲＮＡを、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞への形質移入に使用する。１～２ｕｇのＲＮＡを、製造者の指示に従いリポフェクタミン２０００を使用して約２６０，０００個に形質移入し得る。Ｃａｓ９およびキメラＲＮＡのＲＮＡ送達を図１０に示す。
【０３９６】
インビトロインデル形成アッセイ
形質移入後７２時間で細胞を回収し、二本鎖切断の指標としてのインデル形成に関してアッセイする。
【０３９７】
簡潔に言えば、標的配列の周りのゲノム領域を、高フィデリティポリメラーゼを使用してＰＣＲ増幅する（約４００～６００ｂｐアンプリコンサイズ）。産物を精製し、等濃度に標準化し、９５℃から４℃まで徐々にアニーリングしてＤＮＡヘテロ二本鎖を形成させる。アニーリング後、Ｃｅｌ－Ｉ酵素を使用してヘテロ二本鎖を開裂し、得られた産物をポリアクリルアミドゲル上で分離し、インデル効率を計算する。
【０３９８】
動物におけるインビボ原理証明
送達機構
ＡＡＶまたはレンチウイルス作製については他の部分に記載される。
【０３９９】
ナノ粒子製剤：ナノ粒子製剤にＲＮＡを混合する
市販のキットを使用して、マウスにおけるＤＮＡプラスミドの流体力学的尾静脈注射を実施する。
Ｃａｓ９およびガイド配列は、ウイルス、ナノ粒子コーティングＲＮＡ混合物、またはＤＮＡプラスミドとして送達され、被験動物に注射される。並行する一組の対照動物に、滅菌生理食塩水、Ｃａｓ９およびＧＦＰ、またはガイド配列およびＧＦＰ単独を注射する。

【０４００】
注射後３週間で症状の改善に関して動物を調べて犠牲にする。関係する臓器系のインデル形成を分析する。表現型アッセイには、ＨＤＬ、ＬＤＬ、脂質の血中濃度が含まれる。
【０４０１】
インデル形成アッセイ
市販キットを使用して組織からＤＮＡを抽出する；インデルアッセイは、インビトロ実証について記載されるとおり実施し得る。
【０４０２】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の治療適用は、候補疾患遺伝子の組織特異的かつ時間的に制御された標的欠失の達成に適している。例としては、数ある障害の中でも特に、コレステロールおよび脂肪酸代謝、アミロイド病、ドミナントネガティブ疾患、潜伏ウイルス感染症に関与する遺伝子が挙げられる。
【０４０３】
遺伝子座に標的インデルを導入するためのシングルガイドＲＮＡの例
【０４０４】
【表２９】

| 疾患 | 遺伝子 | スペーサー | PAM | 機構 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| 高コレステロール血症 | HMG-CR | GCCAAATTGGACGACCCTCG | CGG | ノックアウト | 「フルバスタチン: その薬理学および高コレステロール血症の管理における使用のレビュー(Fluvastatin: a review of its pharmacology and use in the management of hypercholesterolaemia)」(Plosker GL et al. Drugs 1996, 51(3):433-459) |
| 高コレステロール血症 | SQLE | CGAGGAGACCCCCGTTTCGG | TGG | ノックアウト | 「非スタチン系コレステロール降下剤の潜在的な役割(Potential role of nonstatin cholesterol lowering agents)」(Trapani et al. IUBMB Life, Volume 63, Issue 11, pages 964–971, November 2011) |
| 高脂血症 | DGAT1 | CCCGCCGCCGCCGTGGCTCG | AGG | ノックアウト | 「抗肥満剤および抗糖尿病剤としてのDGAT1 阻害因子(DGAT1 inhibitors as anti-obesity and anti-diabetic agents)」(Birch AM et al. Current Opinion in Drug Discovery & Development [2010, 13(4):489-496) |
| 白血病 | BCR-ABL | TGAGCTCTACGAGATCCACA | AGG | ノックアウト | 「RNA 干渉(RNAi)による BCR/ABL 融合遺伝子を用いた白血病細胞の死滅(Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi))」(Fuchs et al. Oncogene 2002, 21(37):5716-5724) |

【０４０５】
遺伝子座に染色体微小欠失を導入するためのガイドＲＮＡ対の例
【０４０６】

【表３０】

| 疾患 | 遺伝子 | スペーサー | PAM | 機構 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|
| 高脂血症 | PLIN2ガイド1 | CTCAAAATTCATACCGGTTG | TGG | 微小欠失 | 「ペリリピン-2ヌルマウスは食事性肥満、脂肪炎症および脂肪肝疾患から保護される(Perilipin-2 Null Mice are Protected Against Diet-Induced Obesity, Adipose Inflammation and Fatty Liver Disease)」(McManaman JL et al. The Journal of Lipid Research, jlr.M035063. First Published on February 12, 2013) |
| 高脂血症 | PLIN2ガイド2 | CGTTAAACAACAACCGGACT | TGG | 微小欠失 | |
| 高脂血症 | SREBPガイド1 | TTCACCCCGCGGCGCTGAAT | ggg | 微小欠失 | 「小分子ベツリンによるSREBPの阻害は高脂血症およびインスリン抵抗性を改善し、動脈硬化性プラークを低減する(Inhibition of SREBP by a Small Molecule, Betulin, Improves Hyperlipidemia and Insulin Resistance and Reduces Atherosclerotic Plaques)」(Tang J et al. Cell Metabolism, Volume 13, Issue 1, 44-56, 5 January 2011) |
| 高脂血症 | SREBPガイド2 | ACCACTACCAGTCCGTCCAC | agg | 微小欠失 | |

【０４０７】

実施例１３：疾患原因突然変異を有する遺伝子に対する修復の標的インテグレーション；酵素欠損症および他の関連疾患の再現

研究設計

Ｉ．遺伝子標的の同定および設計

・実施例１６に記載される

ＩＩ．送達系に対するガイド配列および修復テンプレートのクローニング

・上記の実施例１６に記載される

・本出願人らは、罹患アレルを含む相同性アームを含めるためのＤＮＡ修復テンプレートならびに野生型修復テンプレートをクローニングする

ＩＩＩ．細胞系に関するインビトロ検証

ａ．形質移入については、上記の実施例１６に記載される；Ｃａ９、ガイドＲＮＡ、および修復テンプレートを関連性のある細胞型に同時形質移入する。

ｂ．インビトロ修復アッセイ

ｉ．本出願人らは形質移入後７２時間で細胞を回収し、修復に関してアッセイする

ｉｉ．簡潔に言えば、本出願人らは修復テンプレートの周りのゲノム領域を、高フィデリティポリメラーゼを使用してＰＣＲ増幅する。本出願人らは突然変異体アレルの発生率の低下に関して産物を配列決定する。

ＩＶ．動物におけるインビボ原理証明

ａ．送達機構については、上記の実施例１６および２９に記載される。

ｂ．インビボ修復アッセイ

ｉ．本出願人らは、インビトロ実証に記載するとおり修復アッセイを実施する。

Ｖ．治療適用

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、候補疾患遺伝子の組織特異的かつ時間的に制御された標的欠失の達成に適している。例としては、数ある障害の中でも特に、コレステロールおよび脂肪酸代謝、アミロイド病、ドミナントネガティブ疾患、潜伏ウイルス感染症に関与する遺伝子が挙げられる。

【０４０８】

修復テンプレートによる一つの単一ミスセンス突然変異の例：

【０４０９】
【表３１】

| 疾患 | 遺伝子 | スペーサー | PAM |
|---|---|---|---|
| 家族性アミロイド多発ニューロパチー | TTR | AGCCTTTCTGAACACATGCA | CGG |

| 機構 | 参考文献 |
|---|---|
| V30M修復 | 「健康及び疾患におけるトランスサイレチン突然変異(Transthyretin mutations in health and disease)」(Joao et al. Human Mutation, Volume 5, Issue 3, pages 191–196, 1995) |

V30M
アレル　CCTGCCATCAATGTGGCCATGCATGTGTTCAGAAAGGCT
WT
アレル　CCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTCAGAAAGGCT

【０４１０】
実施例１４：緑内障、アミロイドーシス、およびハンチントン病におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の治療適用
緑内障：本出願人らは、ミオシリン（ｍｙｃｉｌｉｎ）（ＭＹＯＣ）遺伝子の第１のエクソンをターゲティングするガイドＲＮＡを設計する。本出願人らはアデノウイルスベクター（Ａｄ５）を使用してＣａｓ９ならびにＭＹＯＣ遺伝子をターゲティングするガイドＲＮＡの両方をパッケージングする。本出願人らはこのアデノウイルスベクターを、細胞が緑内障の病態生理に関係付けられている小柱網に注入する。本出願人らは、初めにこれを、突然変異ＭＹＯＣ遺伝子を有するマウスモデルで試験して、アデノウイルスベクターが視力を改善し、および眼圧を低下させるかどうかを見る。ヒトにおける治療適用も同様の戦略を用いる。
【０４１１】
アミロイドーシス：本出願人らは、肝臓におけるトランスサイレチン（ＴＴＲ）遺伝子の第１のエクソンをターゲティングするガイドＲＮＡを設計する。本出願人らはＡＡＶ８を使用してＣａｓ９ならびにＴＴＲ遺伝子の第１のエクソンをターゲティングするガイドＲＮＡをパッケージングする。ＡＡＶ８は、効率的に肝臓をターゲティングすることが示されており、静脈内投与され得る。Ｃａｓ９は、アルブミンプロモーターなどの肝臓特異的プロモーターを使用するか、あるいは構成的プロモーターを使用してドライブすることができる。ｐｏｌ３プロモーターがガイドＲＮＡをドライブする。
【０４１２】
あるいは、本出願人らは、プラスミドＤＮＡの流体力学的送達を利用してＴＴＲ遺伝子をノックアウトする。本出願人らは、Ｃａｓ９とＴＴＲのエクソン１をターゲティングするガイドＲＮＡとをコードするプラスミドを送達する。
【０４１３】
さらなる代替的な手法として、本出願人らはＲＮＡの組み合わせ（Ｃａｓ９のｍＲＮＡ、およびガイドＲＮＡ）を投与する。ＲＮＡはＬｉｆｅ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのＩｎｖｉｖｏｆｅｃｔａｍｉｎｅなどのリポソームを使用してパッケージングし、静脈内送達することができる。ＲＮＡによって誘発される免疫原性を低下させ、Ｃａｓ９発現レベルおよびガイドＲＮＡの安定性を高めるため、本出願人らは５’キャッピングを用いてＣａｓ９　ｍＲＮＡを改変する。本出願人らはまた、改変されたＲＮＡヌクレオチドをＣａｓ９　ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡに組み込むことにより、それらの安定性を高め、免疫原性を低下させる（例えばＴＬＲの活性化）。効率を高めるため、本出願人らは複数回用量のウイルス、ＤＮＡ、またはＲＮＡを投与する。
【０４１４】
ハンチントン病：本出願人らは、患者のＨＴＴ遺伝子におけるアレル特異的突然変異に基づきガイドＲＮＡを設計する。例えば、ＣＡＧリピートが伸長したＨＴＴがヘテロ接合の患者において、本出願人らは、突然変異体ＨＴＴアレルに特有のヌクレオチド配列を同定し、それを使用してガイドＲＮＡを設計する。本出願人らは、突然変異体塩基がガイド

ＲＮＡの最後の９ｂｐの範囲内に位置することを確実にする（これは標的サイズとガイドＲＮＡとの間の単一のＤＮＡ塩基ミスマッチ間を識別する能力を有することが、本出願人らにより確認されている）。

【０４１５】

本出願人らは、突然変異体ＨＴＴアレル特異的ガイドＲＮＡおよびＣａｓ９をＡＡＶ９にパッケージングし、ハンチントン病患者の線条体内に送達する。ウイルスは開頭術によって定位的に線条体に注入する。ＡＡＶ９は、ニューロンを効率的に形質導入することが知られる。本出願人らはヒトシナプシンＩなどのニューロン特異的プロモーターを使用してＣａｓ９をドライブする。

【０４１６】

実施例１５：ＨＩＶにおけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の治療適用

慢性ウイルス感染症は、有意な罹患率および死亡率の原因である。これらのウイルスの多くに関しては、ウイルス複製の種々の側面を有効にターゲティングする従来の抗ウイルス治療薬が存在するが、現在の治療モダリティは、通常、「ウイルス潜伏」に起因して非治癒的な性質のものである。その性質上、ウイルス潜伏は、活性のあるウイルス産生のないウイルスのライフサイクルにおける休眠期により特徴付けられる。この期間中、ウイルスは大部分が免疫監視機構および従来の治療薬の両方を回避することができるため、ウイルスが宿主内に長期にわたるウイルスリザーバを構築することが可能となり、続いてそこから再活性化し、ウイルスの伝播および伝染を続行することができる。ウイルス潜伏の鍵は、ウイルスゲノムを安定的に維持する能力であり、これは、それぞれウイルスゲノムを細胞質に貯えるかまたはそれを宿主ゲノムにインテグレートするものであるエピソーム潜伏またはプロウイルス潜伏のいずれかによって達成される。初感染を防ぐ有効なワクチン接種がない場合、潜伏リザーバおよび溶菌作用のエピソードにより特徴付けられる慢性ウイルス感染症は重大な影響を及ぼし得る：ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）は子宮頸癌をもたらすことがあり、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）は肝細胞癌の原因となり、およびヒト免疫不全ウイルスは最終的には宿主免疫系を破壊して日和見感染に対する感受性をもたらす。このように、これらの感染症では、現在利用可能な抗ウイルス治療薬の生涯にわたる使用が必要となる。さらに問題を複雑にしているのは、これらのウイルスゲノムの多くの高い変異性であり、これが有効な治療の存在しない耐性株の進化につながっている。

【０４１７】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、多重的能力のある配列特異的な形で二本鎖ＤＮＡ切断（ＤＳＢ）を誘導することが可能な細菌性適応免疫系であり、最近になって哺乳類細胞系内で再構成されている。１つまたは多数のガイドＲＮＡによってＤＮＡをターゲティングすると、介在配列にそれぞれインデルおよび欠失の両方がもたらされ得ることが示されている。このように、この新規技術は、高効率および高特異性で単一細胞内における標的化されかつ多重化されたＤＮＡ突然変異作成を達成し得る手段に相当する。結果的に、ウイルスＤＮＡ配列に対するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の送達は、進行中のウイルス産生がない場合であっても、潜伏ウイルスゲノムの標的化した破壊および欠失を可能にし得る。

【０４１８】

例として、ＨＩＶ－１による慢性感染症は、３３００万人の感染者を抱え、毎年２６０万人の感染が発生している世界的な健康問題である。ウイルス複製の複数の側面を同時にターゲティングする集学的高活性抗レトロウイルス療法（ＨＡＡＲＴ）の使用により、ＨＩＶ感染の大部分を、末期的でない慢性の病気として管理することが可能となっている。治療しなければ、通常９～１０年以内にＨＩＶからＡＩＤＳへの進行が起こり、宿主免疫系の枯渇および日和見感染症の発生がもたらされ、通常はその後間もなく死亡に至る。ウイルス潜伏に続発して、ＨＡＡＲＴの中断は必然的にウイルスのリバウンドを引き起こす。さらに、一時的ではあっても治療の寸断により、利用可能な手段では制御不可能なＨＩＶ耐性株が選択され得る。加えて、ＨＡＡＲＴ治療のコストは著しく高い：１年に１人当たり１０，０００～１５，０００米国ドルの範囲内である。このように、ウイルス複製のプロセスではなしに、ＨＩＶゲノムを直接ターゲティングする治療手法は、潜伏リザー

バの根絶による治癒的な治療選択肢を可能にし得る手段に相当する。

【０４１９】

ＨＩＶ－１ターゲティングＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の開発および送達は、既存の標的ＤＮＡ突然変異生成手段、すなわちＺＦＮおよびＴＡＬＥＮとは区別され得るユニークな手法に相当し、数多くの治療的関連性を有する。ＨＡＡＲＴと併せたＣＲＩＳＰＲ媒介性ＤＳＢおよびインデルによるＨＩＶ－１ゲノムの標的破壊および欠失は、宿主内での活性なウイルス産生ならびに潜伏ウイルスリザーバの枯渇を同時に防ぐことを可能にし得る。

【０４２０】

宿主免疫系にインテグレートされると、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系によりＨＩＶ－１抵抗性亜集団の生成が可能となり、この亜集団は、ウイルスが完全には根絶されていない場合であっても、宿主免疫活性の維持および再構成を可能にし得る。これは、ウイルスゲノムの破壊によりウイルスの産生およびインテグレーションを妨げることで潜在的に初感染を予防するもので、「ワクチン接種」の手段に相当し得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の多重化した性質により、個々の細胞内においてゲノムの複数の側面を同時に標的化することが可能となる。

【０４２１】

ＨＡＡＲＴなどでは、複数の適応突然変異を同時に獲得する必要があるため、突然変異生成によるウイルスのエスケープが最小限に抑えられる。複数のＨＩＶ－１株を同時にターゲティングすることができ、従って重感染の可能性が最小限に抑えられ、かつ続く新規組換え株の作成が妨げられる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の、タンパク質媒介性よりむしろヌクレオチド媒介性の配列特異性により、送達機構を大幅に変更することなく治療薬を迅速に作成することが可能となる。

【０４２２】

これを達成するため、本出願人らは、有効範囲および有効性を最大化するためのＨＩＶ－１株変異体を考慮しながら大多数のＨＩＶ－１ゲノムを標的とするＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓガイドＲＮＡを作成する。ＨＩＶ－１サブタイプと変異体との間のゲノム保存の配列解析から、介在するウイルス配列を欠失させるかまたはウイルスの遺伝子機能を破壊し得るフレームシフト突然変異を導入することを目的としたゲノムの隣接保存領域のターゲティングが可能になるはずである。

【０４２３】

本出願人らは、従来どおり宿主免疫系のアデノウイルスまたはレンチウイルス媒介性感染によるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の送達を達成する。手法に応じて、宿主免疫細胞は、ａ）単離され、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓが形質導入され、選択され、および宿主に再導入されてもよく、またはｂ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の全身送達によりインビボで形質導入されてもよい。第１の手法は、抵抗性免疫集団の作成を可能にする一方、第２の手法は宿主内の潜伏ウイルスリザーバを標的にする傾向が強い。

【０４２４】

【表３２】

| 潜在的HIV-1標的スペーサーの例(出典Mcintyre *et al*)、これはHIV-1変異体の有効範囲が最大となるように最適化されたHIV-1に対するshRNAを生成した。 |
|---|
| CACTGCTTAAGCCTCGCTCGAGG |
| TCACCAGCAATATTCGCTCGAGG |
| CACCAGCAATATTCCGCTCGAGG |
| TAGCAACAGACATACGCTCGAGG |
| GGGCAGTAGTAATACGCTCGAGG |
| CCAATTCCCATACATTATTGTAC |

【０４２５】

実施例１６：嚢胞性線維症におけるΔＦ５０８または他の突然変異の標的補修

本発明の態様は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子治療粒子と生体適合性医薬担体とを含み得る医薬組成物を提供する。別の態様によれば、ＣＦＴＲ遺伝子に突然変異を有する対象

を治療するための遺伝子治療方法は、対象の細胞に治療有効量のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子治療粒子を投与することを含む。

【０４２６】

本実施例は、嚢胞性線維症または嚢胞性線維症関連症状に罹患した、必要性がある対象または患者の気道における、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）粒子を使用したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の遺伝子導入または遺伝子送達を実証する。

【０４２７】

研究設計：必要性がある対象または患者：関連するヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の家畜。この研究は、ＡＡＶベクターによるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の遺伝子導入の有効性を試験する。本出願人らは、遺伝子発現に十分な導入遺伝子レベルを決定し、Ｃａｓ９酵素を含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を利用してΔＦ５０８または他のＣＦＴＲ誘導突然変異をターゲティングする。

【０４２８】

治療対象は、自発呼吸下に各肺につき薬学的に有効な量のエアロゾル化したＡＡＶベクター系の気管支内送達を受ける。対照対象は、内在性の対照遺伝子を含む同量の偽型ＡＡＶベクター系の投与を受ける。ベクター系は、薬学的に許容可能なまたは生体適合性の医薬担体と共に送達され得る。ベクター投与後３週間または適切なインターバルを置いて、嚢胞性線維症関連症状の改善に関して治療対象を調べる。

【０４２９】

本出願人らは、アデノウイルスまたはＡＡＶ粒子を使用する。

【０４３０】

本出願人らは、各々が１つ以上の調節配列（Ｃａｓ９用のＣｂｈまたはＥＦ１ａプロモーター、キメラガイドＲＮＡ用のＵ６またはＨ１プロモーター）に作動可能に結合している以下の遺伝子構築物を、１つ以上のアデノウイルスまたはＡＡＶベクターまたは任意の他の適合性ベクターにクローニングする：ＣＦＴＲΔ５０８ターゲティングキメラガイドＲＮＡ（図１３Ｂ）、ΔＦ５０８突然変異の修復テンプレート（図１３Ｃ）および場合により１つ以上の核局在化シグナルまたは配列（ＮＬＳ）、例えば２つのＮＬＳを有するコドン最適化Ｃａｓ９酵素。

【０４３１】

Ｃａｓ９標的部位の同定

本出願人らはヒトＣＦＴＲゲノム遺伝子座を解析し、Ｃａｓ９標的部位を同定した（図１３Ａ）。（ＰＡＭはＮＧＧまたはＮＮＡＧＡＡＷモチーフを含み得る）。

【０４３２】

遺伝子修復戦略

本出願人らは、Ｃａｓ９（またはＣａｓ９ニッカーゼ）およびガイドＲＮＡを含むアデノウイルス／ＡＡＶベクター系を、Ｆ５０８残基を含有する相同性修復テンプレートを含むアデノウイルス／ＡＡＶベクター系と共に対象に、先に考察した送達方法の一つによって導入する。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系はＣＦＴＲΔ　５０８キメラガイドＲＮＡによりガイドされ、ニックを入れられるかあるいは開裂されるＣＦＴＲゲノム遺伝子座の特定の部位を標的にする。開裂後、嚢胞性線維症をもたらしまたは嚢胞性線維症関連症状を引き起こす欠失を補修する相同組換えによって開裂部位に修復テンプレートが挿入される。適切なガイドＲＮＡでＣＲＩＳＰＲ系を直接送達し、その全身性の導入を提供するこの戦略を用いて遺伝子突然変異をターゲティングし、表Ｂにあるような代謝、肝臓、腎臓およびタンパク質の疾患および障害を引き起こす遺伝子を編集または他の方法で操作することができる。

【０４３３】

実施例１７：遺伝子ノックアウト細胞ライブラリの作成

本実施例は、各細胞がノックアウトされた単一遺伝子を有する細胞ライブラリを作成する方法を実証する：

本出願人らは、ＥＳ細胞のライブラリであって、各細胞はノックアウトされた単一遺伝

子を有し、かつＥＳ細胞のライブラリ全体はあらゆる単一遺伝子がノックアウトされているライブラリを作製する。このライブラリは、細胞プロセスならびに疾患における遺伝子機能のスクリーニングに有用である。

【０４３４】

この細胞ライブラリを作成するため、本出願人らは、誘導性プロモーター（例えばドキシサイクリン誘導性プロモーター）によりドライブされるＣａｓ９をＥＳ細胞にインテグレートする。加えて、本出願人らは、ＥＳ細胞において特定の遺伝子を標的にする単一のガイドＲＮＡをインテグレートする。ＥＳ細胞ライブラリを作成するため、本出願人らは、単純に、ヒトゲノムにおける各遺伝子を標的にするガイドＲＮＡをコードする遺伝子のライブラリとＥＳ細胞を混合する。本出願人らは、初めに、単一のＢｘＢ１　ａｔｔＢ部位をヒトＥＳ細胞のＡＡＶＳ１遺伝子座に導入する。次に本出願人らは、ＢｘＢ１インテグラーゼを使用して、ＡＡＶＳ１遺伝子座のＢｘＢ１　ａｔｔＢ部位に対する個々のガイドＲＮＡ遺伝子のインテグレーションを促進する。インテグレーションを促進するため、各ガイドＲＮＡ遺伝子は単一のａｔｔＰ部位を担持するプラスミド上に含まれる。このようにしてＢｘＢ１がゲノムのａｔｔＢ部位をガイドＲＮＡ含有プラスミド上のａｔｔＰ部位と組み換え得る。

【０４３５】

細胞ライブラリを作成するため、本出願人らは、インテグレートされた単一のガイドＲＮＡを有しかつＣａｓ９発現を誘導する細胞のライブラリを取る。誘導後、ガイドＲＮＡによって指定された部位でＣａｓ９が二本鎖切断を媒介する。この細胞ライブラリの多様性を確認するため、本出願人らは全エクソンシーケンシングを実施し、本出願人らが単一の標的遺伝子毎に突然変異を観察可能であることを確実にする。この細胞ライブラリは、全ライブラリベースのスクリーニングを含めた種々の用途に使用することができ、または選別して個々の細胞クローンにし、個々のノックアウトヒト遺伝子を有するクローン細胞系の迅速作成を促進することができる。

【０４３６】

実施例１８：Ｃａｓ９を使用する微細藻類のエンジニアリング

Ｃａｓ９を送達する方法

方法１：本出願人らは、構成的プロモーター、例えば、Ｈｓｐ７０Ａ－Ｒｂｃ　Ｓ２またはベータ２－チューブリンの制御下でＣａｓ９を発現するベクターを使用してＣａｓ９およびガイドＲＮＡを送達する。

【０４３７】

方法２：本出願人らは、構成的プロモーター、例えば、Ｈｓｐ７０Ａ－Ｒｂｃ　Ｓ２またはベータ２－チューブリンの制御下でＣａｓ９およびＴ７ポリメラーゼを発現するベクターを使用してＣａｓ９およびＴ７ポリメラーゼを送達する。ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡをドライブするＴ７プロモーターを含有するベクターを使用して送達する。

【０４３８】

方法３：本出願人らは、Ｃａｓ９ｍＲＮＡおよびインビトロで転写されたガイドＲＮＡを藻類細胞に送達する。ＲＮＡは、インビトロで転写させることができる。Ｃａｓ９ｍＲＮＡは、Ｃａｓ９についてのコード領域およびＣａｓ９ｍＲＮＡの安定化を確保するためのＣｏｐ１からの３’ＵＴＲからなる。

【０４３９】

相同組換えのため、本出願人らは、追加の相同組換え修復テンプレートを提供する。

【０４４０】

ベーター２チューブリンプロモーターの制御下でＣａｓ９の発現をドライブするカセットと、それに続くＣｏｐ１の３’ＵＴＲについての配列。

【化１２】

TCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGA

GACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTC

CTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATA

GCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAAC

ACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGC

TAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACATGTACCCATA

CGATGTTCCAGATTACGCTTCGCCGAAGAAAAAGCGCAAGGTCGAAGCGTCCGA

CAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTG

ATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACC

【化１３】

GACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCGACAGCGGC
GAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAG
ACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAA
GGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGAAGAGGAT
AAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTAC
CACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACC
GACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCC
GGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACA
AGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAAAACCCCAT
CAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAG
CAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCT
GTTCGGCAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAAC
TTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGAC
GACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGG
CCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACAC
CGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCA
CCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAG
TACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATTGACG
GCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGA
TGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGA
AGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGC
TGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCCTGAAGGACAACCG
GGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTG
GCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATC
ACCCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCCAGAGCTTCA
TCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCA
AGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAA
ATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAAAA
GGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCT
GAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGC
GTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATTA

【化１４】

TCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATA
TCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGA
AAACCTATGCCCACCTGTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGA
GATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACA
AGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAG
AAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAG
AAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTG
GCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGAC
GAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATG
GCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAAT
GAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACA
CCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG
AATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGAC
TACGATGTGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACA
ACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCT
CCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCA
AGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCC
TGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGC
AGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACG
ACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCTGAAGTCCAAGC
TGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGAGATCAACAA
CTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATC
AAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTAC
GACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCC
AAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGG
CCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGG
AGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCA
TGCCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCA
AAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGG
ACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGT
GCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTGAA

【化１５】

AGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAA
GCTGCCTAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGC
CTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGT
GAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGAT
AATGAGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATC
ATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGG
ACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGG
CCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTT
CAAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGT
GCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGAT
CGACCTGTCTCAGCTGGGAGGCGACAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGGAGGC
CAGCTAAGGATCCGGCAAGACTGGCCCCGCTTGGCAACGCAACAGTGAGCCCCTC
CCTAGTGTGTTTGGGGATGTGACTATGTATTCGTGTGTTGGCCAACGGGTCAACC
CGAACAGATTGATACCCGCCTTGGCATTTCCTGTCAGAATGTAACGTCAGTTGAT
GGTACT

【０４４１】

ベーター２チューブリンプロモーターの制御下でＴ７ポリメラーゼの発現をドライブするカセットと、それに続くＣｏｐ１の３’ＵＴＲについての配列：

【化１６】

TCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGA
GACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTC
CTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATA
GCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAAC
ACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGC
TAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACatgcctaagaagaaga
ggaaggttaacacgattaacatcgctaagaacgacttctctgacatcgaactggctgctatcccgttcaacactctggctgaccatt
acggtgagcgtttagctcgcgaacagttggcccttgagcatgagtcttacgagatgggtgaagcacgcttccgcaagatgtttga
gcgtcaacttaaagctggtgaggttgcggataacgctgccgccaagcctctcatcactaccctactccctaagatgattgcacgc
atcaacgactggtttgaggaagtgaaagctaagcgcggcaagcgcccgacagccttccagttcctgcaagaaatcaagccgga
agccgtagcgtacatcaccattaagaccactctggcttgcctaaccagtgctgacaatacaaccgttcaggctgtagcaagcgca
atcggtcgggccattgaggacgaggctcgcttcggtcgtatccgtgaccttgaagctaagcacttcaagaaaaacgttgaggaa
caactcaacaagcgcgtagggcacgtctacaagaaagcatttatgcaagttgtcgaggctgacatgctctctaagggtctactcg

【化１７】

gtggcgaggcgtggtcttcgtggcataaggaagactctattcatgtaggagtacgctgcatcgagatgctcattgagtcaaccgg
aatggttagcttacaccgccaaaatgctggcgtagtaggtcaagactctgagactatcgaactcgcacctgaatacgctgaggct
atcgcaacccgtgcaggtgcgctggctggcatctctccgatgttccaaccttgcgtagttcctcctaagccgtggactggcattac
tggtggtggctattgggctaacggtcgtcgtcctctggcgctggtgcgtactcacagtaagaaagcactgatgcgctacgaagac
gtttacatgcctgaggtgtacaaagcgattaacattgcgcaaaacaccgcatggaaaatcaacaagaaagtcctagcggtcgcc
aacgtaatcaccaagtggaagcattgtccggtcgaggacatccctgcgattgagcgtgaagaactcccgatgaaaccggaaga
catcgacatgaatcctgaggctctcaccgcgtggaaacgtgctgccgctgctgtgtaccgcaaggacaaggctcgcaagtctcg
ccgtatcagccttgagttcatgcttgagcaagccaataagtttgctaaccataaggccatctggttcccttacaacatggactggcg
cggtcgtgtttacgctgtgtcaatgttcaacccgcaaggtaacgatatgaccaaaggactgcttacgctggcgaaaggtaaacca
atcggtaaggaaggttactactggctgaaaatccacggtgcaaactgtgcgggtgtcgacaaggttccgttcctgagcgcatca
agttcattgaggaaaaccacgagaacatcatggcttgcgctaagtctccactggagaacacttggtgggctgagcaagattctcc
gttctgcttccttgcgttctgctttgagtacgctggggtacagcaccacggcctgagctataactgctcccttccgctggcgtttgac
gggtcttgctctggcatccagcacttctccgcgatgctccgagatgaggtaggtggtcgcgcggttaacttgcttcctagtgaaac
cgttcaggacatctacgggattgttgctaagaaagtcaacgagattctacaagcagacgcaatcaatgggaccgataacgaagta
gttaccgtgaccgatgagaacactggtgaaatctctgagaaagtcaagctgggcactaaggcactggctggtcaatggctggct
tacggtgttactcgcagtgtgactaagcgttcagtcatgacgctggcttacgggtccaaagagttcggcttccgtcaacaagtgct
ggaagataccattcagccagctattgattccggcaagggtctgatgttcactcagccgaatcaggctgctggatacatggctaag
ctgatttgggaatctgtgagcgtgacggtggtagctgcggttgaagcaatgaactggcttaagtctgctgctaagctgctggctgc
tgaggtcaaagataagaagactggagagattcttcgcaagcgttgcgctgtgcattgggtaactcctgatggtttccctgtgtggc
aggaatacaagaagcctattcagacgcgcttgaacctgatgttcctcggtcagttccgcttacagcctaccattaacaccaacaa
agatagcgagattgatgcacacaaacaggagtctggtatcgctcctaactttgtacacagccaagacggtagccaccttcgtaag
actgtagtgtgggcacacgagaagtacggaatcgaatcttttgcactgattcacgactccttcggtacgattccggctgacgctgc
gaacctgttcaaagcagtgcgcgaaactatggttgacacatatgagtcttgtgatgtactggctgatttctacgaccagttcgctga
ccagttgcacgagtctcaattggacaaaatgccagcacttccggctaaaggtaacttgaacctccgtgacatcttagagtcggact
tcgcgttcgcgtaaGGATCCGGCAAGACTGGCCCCGCTTGGCAACGCAACAGTGAGCCC
CTCCCTAGTGTGTTTGGGGATGTGACTATGTATTCGTGTGTTGGCCAACGGGTCA
ACCCGAACAGATTGATACCCGCCTTGGCATTTCCTGTCAGAATGTAACGTCAGTT
GATGGTACT

【０４４２】

ＴＦプロモーターによりドライブされるガイドＲＮＡの配列（ＴＦプロモーター、Ｎは、ターゲティング配列を表す）：

【化１８】

gaaat**TAATACGACTCACTATA**NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagc
taGAAAtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcttttttt

【０４４３】

遺伝子送達：

Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　Ｃｅｎｔｅｒからのコナミドリムシ

（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）株ＣＣ－１２４およびＣＣ－１２５を、エレクトロポレーションに使用する。エレクトロポレーションプロトコルは、ＧｅｎｅＡｒｔ　Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇキットからの標準的な推奨プロトコルに従う。

【０４４４】

また、本出願人らは、Ｃａｓ９を構成的に発現するコナミドリムシ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）の系統を生成する。このことは、ｐＣｈｌａｍｙ１（ＰｖｕＩを使用して線形化）を使用し、ハイグロマイシン耐性コロニーを選択することにより行うことができる。Ｃａｓ９を含有するｐＣｈｌａｍｙ１についての配列を以下に示す。遺伝子ノックアウトを達成するためのこの手法において、ガイドＲＮＡのためのＲＮＡを送達することが必要なだけである。相同組換えのため、本出願人らは、ガイドＲＮＡおよび線形化相同組換えテンプレートを送達する。

ｐＣｈｌａｍｙ１－Ｃａｓ９：

【化１９】

TGCGGTATTTCACACCGCATCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGC
GCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA
GATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAA
ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATC
AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACT
CCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCT
GCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACC
AGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT
CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGT
TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGG
TATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCC
ATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTA
AGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACT
GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATT
CTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGAT
AATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTT
CGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACC
CACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGT

【化２０】

GAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGG
AAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGG
TTATTGTCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG
ACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATC
TGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATC
AAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACC
AAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTA
GCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGTTGCCAGTGG
CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG
CAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACG
ACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTC
CCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGA
GAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCG
GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGG
AGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTG
GCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA
TTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG
CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGTCGCTGAGGCTTGACATGATTGGTGCGTATGT
TTGTATGAAGCTACAGGACTGATTTGGCGGGCTATGAGGGCGGGGGAAGCTCTGG
AAGGGCCGCGATGGGGCGCGCGGCGTCCAGAAGGCGCCATACGGCCCGCTGGCG
GCACCCATCCGGTATAAAAGCCCGCGACCCCGAACGGTGACCTCCACTTTCAGCG
ACAAACGAGCACTTATACATACGCGACTATTCTGCCGCTATACATAACCACTCAG
CTAGCTTAAGATCCCATCAAGCTTGCATGCCGGGCGCGCCAGAAGGAGCGCAGC
CAAACCAGGATGATGTTTGATGGGGTATTTGAGCACTTGCAACCCTTATCCGGAA
GCCCCCTGGCCCACAAAGGCTAGGCGCCAATGCAAGCAGTTCGCATGCAGCCCCT
GGAGCGGTGCCCTCCTGATAAACCGGCCAGGGGGCCTATGTTCTTTACTTTTTTAC
AAGAGAAGTCACTCAACATCTTAAAATGGCCAGGTGAGTCGACGAGCAAGCCCG
GCGGATCAGGCAGCGTGCTTGCAGATTTGACTTGCAACGCCCGCATTGTGTCGAC
GAAGGCTTTTGGCTCCTCTGTCGCTGTCTCAAGCAGCATCTAACCCTGCGTCGCCG
TTTCCATTTGCAGGAGATTCGAGGTACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACG
CTTCGCCGAAGAAAAAGCGCAAGGTCGAAGCGTCCGACAAGAAGTACAGCATCG

【化２１】

GCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAA
GGTGCCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAA
GAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCAC
CCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTG
CTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTC
CACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCAC
CCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACCA
TCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
TGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGA
GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGT
GCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGA
CGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCT
GATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTCGGCAACCTGATTGC
CCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGAT
GCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTG
GCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCG
ACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCC
CCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTG
CTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCG
ACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAG
AGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAAC
TGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACA
ACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCG
GCAGGAAGATTTTTACCCATTCCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGAT
CCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGA
TTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCCTGGAACTTCGAG
GAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAAC
TTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTAC
GAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGTGACCGAGGGA
ATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCT
GCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTT

【化２２】

CAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAGATCGGTTC
AACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACT
TCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGA
CACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCCACC
TGTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGG
GCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGA
CAATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAAACTTCATGCAGCT
GATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCAGGTGTC
CGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGC
CATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAGT
GATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCA
GACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAG
AGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACA
CCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATA
TGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACC
ATATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGAC
CAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCG
TGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCC
AGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCTGAGCGAACTGG
ATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGC
ACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACA
AGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTT
CCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGAGATCAACAACTACCACCACGCC
CACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTA
AGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGA
TGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATC
CGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGAT
AAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCATGCCCCAAGTGAAT
ATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTG
CCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAAG

【化２３】

AAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCA
AAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGG
ATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTTCTGGAAG
CCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACT
CCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAAC
TGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTTCCTGTACC
TGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGCAGAAAC
AGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCA
GCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCTGTC
CGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCAT
CCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCC
TGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCT
GGGAGGCGACAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGGAGGCCAGCTAACATATGATT
CGAATGTCTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCG
GGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCC
CGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTG
TTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCAT
ATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCG
CACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACAT
GACACAAGAATCCCTGTTACTTCTCGACCGTATTGATTCGGATGATTCCTACGCG
AGCCTGCGGAACGACCAGGAATTCTGGGAGGTGAGTCGACGAGCAAGCCCGGCG
GATCAGGCAGCGTGCTTGCAGATTTGACTTGCAACGCCCGCATTGTGTCGACGAA
GGCTTTTGGCTCCTCTGTCGCTGTCTCAAGCAGCATCTAACCCTGCGTCGCCGTTT
CCATTTGCAGCCGCTGGCCCGCCGAGCCCTGGAGGAGCTCGGGCTGCCGGTGCCG
CCGGTGCTGCGGGTGCCCGGCGAGAGCACCAACCCCGTACTGGTCGGCGAGCCC
GGCCCGGTGATCAAGCTGTTCGGCGAGCACTGGTGCGGTCCGGAGAGCCTCGCG
TCGGAGTCGGAGGCGTACGCGGTCCTGGCGGACGCCCCGGTGCCGGTGCCCCGC
CTCCTCGGCCGCGGCGAGCTGCGGCCCGGCACCGGAGCCTGGCCGTGGCCCTACC
TGGTGATGAGCCGGATGACCGGCACCACCTGGCGGTCCGCGATGGACGGCACGA
CCGACCGGAACGCGCTGCTCGCCCTGGCCCGCGAACTCGGCCGGGTGCTCGGCCG

【化２４】

GCTGCACAGGGTGCCGCTGACCGGGAACACCGTGCTCACCCCCCATTCCGAGGTC
TTCCCGGAACTGCTGCGGGAACGCCGCGCGGCGACCGTCGAGGACCACCGCGGG
TGGGGCTACCTCTCGCCCCGGCTGCTGGACCGCCTGGAGGACTGGCTGCCGGACG
TGGACACGCTGCTGGCCGGCCGCGAACCCCGGTTCGTCCACGGCGACCTGCACGG
GACCAACATCTTCGTGGACCTGGCCGCGACCGAGGTCACCGGGATCGTCGACTTC
ACCGACGTCTATGCGGGAGACTCCCGCTACAGCCTGGTGCAACTGCATCTCAACG
CCTTCCGGGGCGACCGCGAGATCCTGGCCGCGCTGCTCGACGGGGCGCAGTGGA
AGCGGACCGAGGACTTCGCCCGCGAACTGCTCGCCTTCACCTTCCTGCACGACTT
CGAGGTGTTCGAGGAGACCCCGCTGGATCTCTCCGGCTTCACCGATCCGGAGGAA
CTGGCGCAGTTCCTCTGGGGGCCGCCGGACACCGCCCCCGGCGCCTGATAAGGAT
CCGGCAAGACTGGCCCCGCTTGGCAACGCAACAGTGAGCCCCTCCCTAGTGTGTT
TGGGGATGTGACTATGTATTCGTGTGTTGGCCAACGGGTCAACCCGAACAGATTG
ATACCCGCCTTGGCATTTCCTGTCAGAATGTAACGTCAGTTGATGGTACT

【０４４５】
全ての改変コナミドリムシ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）細胞について、本出願人らは、ＰＣＲ、ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ、およびＤＮＡシーケンシングを使用して良好な改変を確認した。

【０４４６】
実施例１９：Ｃａｓ９を使用して種々の疾患型をターゲティングする
タンパク質コード配列の突然変異が関与する疾患：
優性障害は、ドミナントネガティブアレルを不活性化することによりターゲティングされ得る。本出願人らは、Ｃａｓ９を使用してドミナントネガティブアレルにおけるユニーク配列をターゲティングし、ＮＨＥＪによって突然変異を導入する。ＮＨＥＪによって誘導されるインデルは、ドミナントネガティブアレルにフレームシフト突然変異を導入してドミナントネガティブタンパク質を除去することが可能であり得る。これは遺伝子がハプロ不全でない（ｈａｐｌｏ－ｓｕｆｆｉｃｉｅｎｔ）場合に機能し得る（例えばＭＹＯＣ突然変異によって生じる緑内障およびハンチントン病）。

【０４４７】
劣性遺伝疾患は、両方のアレルで疾患突然変異を修復することによりターゲティングされ得る。分裂細胞について、本出願人らはＣａｓ９を使用して突然変異部位の近傍に二本鎖切断を導入し、外来性組換えテンプレートを使用して相同組換え速度を増加させる。分裂細胞について、これは多重ニッカーゼ活性を用いて達成されてもよく、それにより、相補的なオーバーハングを有する外来性ＤＮＡ断片のＮＨＥＪ媒介性ライゲーションによる両方のアレルの突然変異配列の置換が触媒される。

【０４４８】
本出願人らはまた、Ｃａｓ９を使用して保護突然変異も導入する（例えばＨＩＶ感染を防ぐためのＣＣＲ５の不活性化、コレステロールを減少させるためのＰＣＳＫ９の不活性化、またはアルツハイマー病の可能性を低下させるＡＰＰへのＡ６７３Ｔの導入）。

【０４４９】
非コード配列が関与する疾患
本出願人らは、Ｃａｓ９を使用してプロモーター領域の非コード配列を破壊し、転写因子結合部位を変化させ、およびエンハンサーまたはリプレッサーエレメントを変化させる。例えば、Ｃａｓ９を使用して造血幹細胞のＫｌｆ１エンハンサーＥＨＳ１を切り出すこ

とにより、ＢＣＬ１１ａレベルを低下させ、分化した赤血球における胎児グロビン遺伝子発現を再活性化し得る。

【０４５０】

本出願人らはまた、Ｃａｓ９を使用して５’または３’非翻訳領域の機能性モチーフを破壊する。例えば、筋強直性ジストロフィーの治療のため、Ｃａｓ９を使用してＤＭＰＫ遺伝子のＣＴＧリピート伸長を除去し得る。

【０４５１】

実施例２０：多重化ニッカーゼ

本出願に詳説されるＣａｓ９の最適化の態様および教示を使用してＣａｓ９ニッカーゼもまた作成し得る。本出願人らは、Ｃａｓ９ニッカーゼをガイドＲＮＡのペアと組み合わせて使用して、規定のオーバーハングを有するＤＮＡ二本鎖切断を作成する。ガイドＲＮＡの２つのペアが使用されるとき、介在するＤＮＡ断片を切り出すことが可能である。２つのガイドＲＮＡペアで外来性ＤＮＡ断片を開裂することによってゲノムＤＮＡと適合性のオーバーハングを作成する場合、外来性ＤＮＡ断片をゲノムＤＮＡにライゲートして切り出された断片を置き換え得る。例えば、これを用いてハンチンチン（ｈｕｎｔｉｎｔｉｎ）（ＨＴＴ）遺伝子のトリヌクレオチドリピート伸長を除去し、ハンチントン病を治療し得る。

【０４５２】

より少数のＣＡＧリピートを有する外来性ＤＮＡが提供される場合、同じオーバーハングを有するＤＮＡ断片を作成することが可能であり得るとともに、ＨＴＴゲノム遺伝子座にライゲートして、切り出された断片を置き換えることができる。

【化２５】

【０４５３】

ゲノムへの外来性ＤＮＡ断片のライゲーションに相同組換え機構は必須ではなく、従ってこの方法はニューロンなどの分裂終了細胞で用いられてもよい。

【０４５４】

実施例２１：ＣＲＩＳＰＲ系の送達

Ｃａｓ９およびそのキメラガイドＲＮＡ、またはｔｒａｃｒＲＮＡとｃｒＲＮＡとの組み合わせは、ＤＮＡとしても、あるいはＲＮＡとしても送達することができる。Ｃａｓ９およびガイドＲＮＡを両方ともにＲＮＡ（普通のまたは塩基もしくは骨格改変を含む）分子として送達することを用いて、Ｃａｓ９タンパク質が細胞内に留まる時間を低減することができる。これにより標的細胞におけるオフターゲット開裂活性のレベルが低下し得る。ｍＲＮＡとしてのＣａｓ９の送達はタンパク質に翻訳されるまでに時間がかかるため、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを送達した数時間後にガイドＲＮＡを送達して、Ｃａｓ９タンパク質との相互作用に利用可能なガイドＲＮＡのレベルを最大化することが有利であり得る。

【０４５５】

ガイドＲＮＡの量が限られている状況では、Ｃａｓ９をｍＲＮＡとして導入し、かつガイドＲＮＡを、ガイドＲＮＡの発現をドライブするプロモーターを含むＤＮＡ発現カセットの形態で導入することが望ましい場合もある。このようにして利用可能なガイドＲＮＡの量を転写によって増幅し得る。

【０４５６】

Ｃａｓ９（ＤＮＡまたはＲＮＡ）およびガイドＲＮＡ（ＤＮＡまたはＲＮＡ）を宿主細胞に導入するため種々の送達系を導入することができる。これには、リポソーム、ウイルスベクター、エレクトロポレーション、ナノ粒子、ナノワイヤ（Ｓｈａｌｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｎｏ Ｌｅｔｔｅｒｓ，２０１２）、エキソソームの使用が含まれる。分子トロイの木馬リポソーム（Ｐａｒｄｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ Ｐｒｏｔｏｃ；２０１０；ｄｏｉ：１０．１１０１／ｐｄｂ．ｐｒｏｔ５４０７）を使用して、Ｃａｓ９およびガイドＲＮＡを血液脳関門を越えて送達してもよい。

【０４５７】

実施例２２：Ｃａｓ９オルソログ

本出願者らはＣａｓ９オルソログ（図３および図４Ａ～図４Ｆ）を分析することにより、関連するＰＡＭ配列および対応するキメラガイドＲＮＡを同定した。この拡張ＰＡＭセットは、ゲノムにわたるより広範囲のターゲティングを提供し、またユニークな標的部位の数を大幅に増加させ、ゲノムにおいて高い特異性レベルの新規Ｃａｓ９を同定し得る可能性を提供し得る。本出願者らは、黄色ブドウ球菌種アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ ｓｐ．Ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９のＰＡＭがＮＮＧＲＲであることを決定した。黄色ブドウ球菌種アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ ｓｐ．Ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９はＳａＣａｓ９としても知られる。

【０４５８】

Ｃａｓ９オルソログの特異性は、各Ｃａｓ９がガイドＲＮＡとそのＤＮＡ標的との間のミスマッチを許容する能力を試験することにより評価し得る。例えば、ＳｐＣａｓ９の特異性は、ガイドＲＮＡの突然変異が開裂効率に及ぼす効果を試験することによって特徴付けられている。ガイド配列と標的ＤＮＡとの間で単一または複数のミスマッチを有するガイドＲＮＡのライブラリを作製した。これらの知見に基づけば、以下の指針に基づきＳｐＣａｓ９の標的部位を選択することができる：

特定の遺伝子の編集に対するＳｐＣａｓ９の特異性を最大化するためには、目的の遺伝子座内の標的部位は、潜在的な「オフターゲット」ゲノム配列が以下の４つの制約に従うように選択しなければならない：何よりも第一に、それらの配列の後に５’－ＮＧＧまたはＮＡＧ配列のいずれかを有するＰＡＭが続いてはならない。第二に、標的配列とのそれらの大域的な配列類似性が最小限でなければならない。第三に、最大数のミスマッチがオフターゲット部位のＰＡＭ近位領域内になければならない。最後に、最大数のミスマッチは連続していなければならず、または４塩基以上離れていてはならない。

【０４５９】

同様の方法を用いて他のＣａｓ９オルソログの特異性を評価し、標的種のゲノム内にある特定の標的部位を選択するための基準を確立することができる。

【０４６０】

実施例２３：トリヌクレオチドリピート障害の治療戦略

本出願で既述したとおり、ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的ポリヌクレオチドは複数の疾患関連遺伝子およびポリヌクレオチドを含んでもよく、それらの疾患関連遺伝子の一部はトリヌクレオチドリピート障害と称される（またトリヌクレオチドリピート伸長障害、トリプレットリピート伸長障害またはコドン反復障害とも称される）一連の遺伝的障害に属し得る。

【０４６１】

これらの疾患は、特定の遺伝子のトリヌクレオチドリピートが正常な安定閾値（通常は遺伝子の点で異なり得る）を超える突然変異により引き起こされる。リピート伸長障害の発見が増えるにつれ、これらの障害を、根底にある類似した特性に基づきいくつかのカテゴリーに分類することが可能となっている。特定の遺伝子のタンパク質コード部分におけるＣＡＧリピート伸長によって引き起こされるハンチントン病（ＨＤ）および脊髄小脳失調症は、カテゴリーＩに含められる。伸長を有する疾患または障害であって、その表現型が多様になる傾向のある、かつ伸長が通常は規模が小さく、遺伝子のエクソンにも認められるものは、カテゴリーＩＩに含められる。カテゴリーＩＩＩは、カテゴリーＩまたはＩ

Ｉと比べてはるかに大きいリピート伸長によって特徴付けられ、かつ概してタンパク質コード領域の外側に位置する障害または疾患を含む。カテゴリーＩＩＩ疾患または障害の例には、限定はされないが、脆弱Ｘ症候群、筋強直性ジストロフィー、脊髄小脳失調症と、若年性ミオクローヌスてんかんと、フリードライヒ失調症とのうちの２つが含まれる。

【０４６２】

以下でフリードライヒ失調症に関して言及するものなどの、同様の治療戦略を取り入れて、さらに他のトリヌクレオチドリピートまたは伸長障害にも対処し得る。例えば、ほぼ同一の戦略を用いて治療することのできる別のトリプルリピート疾患は、３’ＵＴＲに伸長したＣＴＧモチーフがある筋強直性ジストロフィー１型（ＤＭ１）である。フリードライヒ失調症においては、疾患はフラタキシン（ＦＸＮ）の最初のイントロンにおけるＧＡＡトリヌクレオチドの伸長により生じる。ＣＲＩＳＰＲを使用した一つの治療戦略は、最初のイントロンからＧＡＡリピートを切り出すことである。伸長したＧＡＡリピートはＤＮＡ構造に影響を及ぼすと考えられ、ヘテロクロマチンの形成の動員がもたらされてフラタキシン遺伝子がオフになる（図１４Ａ）。

【０４６３】

他の治療戦略と比べて競争力のある利点を以下に列挙する：

疾患がフラタキシンの発現低下に起因するため、この場合にｓｉＲＮＡノックダウンは適用できない。ウイルス遺伝子療法が現在調査されている。動物モデルにおいてＨＳＶ－１ベースのベクターを使用してフラタキシン遺伝子が送達され、治療効果が示されている。しかしながら、ウイルスベースのフラタキシン送達の長期有効性は、いくつかの問題を抱えている：第一に、フラタキシンの発現を健常者の天然レベルに一致するように調節することが困難であり、第二に、フラタキシンの長期過剰発現は細胞死を引き起こす。

【０４６４】

ヌクレアーゼを使用してＧＡＡリピートを切り出すことにより健常な遺伝子型を回復し得るが、ジンクフィンガーヌクレアーゼおよびＴＡＬＥＮ戦略は、高い有効性のヌクレアーゼの２つのペアを送達する必要があり、これは送達ならびにヌクレアーゼのエンジニアリングの両方にとって困難である（ＺＦＮまたはＴＡＬＥＮによるゲノムＤＮＡの効率的な切り出しは達成が困難である）。

【０４６５】

上記の戦略とは対照的に、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系には明らかな利点がある。Ｃａｓ９酵素は効率性が高く、かつ多重化し易い、つまり１つ以上の標的を同時に設定し得るということになる。これまでのところ、ゲノムＤＮＡの効率的な切り出しはＣａｓ９によるとヒト細胞で３０％を超え、３０％もの高さであることもあり、将来改善され得る。さらに、ハンチントン病（ＨＤ）のような特定のトリヌクレオチドリピート障害に関しては、２つのアレル間に違いがある場合にコード領域におけるトリヌクレオチドリピートが対処され得る。具体的には、ＨＤ患者が突然変異体ＨＴＴに関してヘテロ接合であり、かつ野生型と突然変異体とのＨＴＴアレル間にＳＮＰなどのヌクレオチドの違いがある場合、Ｃａｓ９を使用して突然変異体ＨＴＴアレルを特異的に標的化し得る。ＺＦＮまたはＴＡＬＥＮは、一塩基の違いに基づく２つのアレルを区別する能力を有しないであろう。

【０４６６】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９酵素を使用してフリードライヒ失調症に対処する戦略を採るにおいて、本出願人らは、ＧＡＡ伸長に隣接する部位を標的にする複数のガイドＲＮＡを設計し、最も効率性および特異性が高いものを選択する（図１４Ｂ）。

【０４６７】

本出願人らは、ＦＸＮのイントロン１を標的にするガイドＲＮＡとＣａｓ９との組み合わせを送達することにより、ＧＡＡ伸長領域の切り出しを媒介する。ＡＡＶ９を使用してＣａｓ９のおよび脊髄における効率的な送達を媒介し得る。

【０４６８】

ＧＡＡ伸長に隣接するＡｌｕエレメントが重要であると考えられる場合、標的にすることのできる部位の数に制約があり得るが、本出願人らはＡｌｕエレメントの破壊を回避す

る戦略を採り得る。
【０４６９】
代替的戦略：
Ｃａｓ９を使用してゲノムを改変するよりむしろ、本出願人らはまた、Ｃａｓ９（ヌクレアーゼ活性欠損）ベースのＤＮＡ結合ドメインを使用して転写活性化ドメインをＦＸＮ遺伝子にターゲティングすることでＦＸＮ遺伝子を直接活性化し得る。
【０４７０】
実施例２４：Ｃａｓ９ニッカーゼを使用してオフターゲット開裂を最小限に抑えるための戦略
本出願において既述したとおり、Ｃａｓ９を、以下の１つ以上の突然変異を介して一本鎖開裂を媒介し得るように突然変異させ得る：Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、およびＨ８４０Ａ。
【０４７１】
ＮＨＥＪによる遺伝子ノックアウトを媒介するため、本出願人らはニッカーゼバージョンのＣａｓ９を２つのガイドＲＮＡと共に使用する。各個別のガイドＲＮＡによるオフターゲットニッキングは主に突然変異を伴わず修復されてもよく、二本鎖切断（ＮＨＥＪによる突然変異を生じさせ得る）は、標的部位が互いに隣接するときに限り起こる。二重ニッキングにより導入される二本鎖切断は平滑末端ではないため、ＴＲＥＸ１などの末端プロセシング酵素の同時発現がＮＨＥＪ活性レベルを増加させ得る。
【０４７２】
以下の表形式の標的リストは、以下の疾患に関与する遺伝子に対するものである：
ラフォラ病－ニューロンにおけるグリコーゲンを低下させるための標的ＧＳＹ１またはＰＰＰ１Ｒ３Ｃ（ＰＴＧ）。
【０４７３】
高コレステロール血症－標的ＰＣＳＫ９
標的配列をペア（ＬおよびＲ）で列挙し、ここではスペーサーにおけるヌクレオチドの数は異なる（０～３ｂｐ）。各スペーサーそれ自体を野生型Ｃａｓ９と共に使用して標的遺伝子座に二本鎖切断を導入し得る。
【０４７４】

【表３３】

| | | |
|---|---|---|
| GYS1 (ヒト) | GGCC-L | ACCCTTGTTAGCCACCTCCC |
| | GGCC-R | GAACGCAGTGCTCTTCGAAG |
| | GGNCC-L | CTCACGCCCTGCTCCGTGTA |
| | GGNCC-R | GGCGACAACTACTTCCTGGT |
| | GGNNCC-L | CTCACGCCCTGCTCCGTGTA |
| | GGNNCC-R | GGGCGACAACTACTTCCTGG |
| | GGNNNCC-L | CCTCTTCAGGGCCGGGGTGG |
| | GGNNNCC-R | GAGGACCCAGGTGGAACTGC |
| PCSK9 (ヒト) | GGCC-L | TCAGCTCCAGGCGGTCCTGG |
| | GGCC-R | AGCAGCAGCAGCAGTGGCAG |
| | GGNCC-L | TGGGCACCGTCAGCTCCAGG |
| | GGNCC-R | CAGCAGTGGCAGCGGCCACC |
| | GGNNCC-L | ACCTCTCCCCTGGCCCTCAT |
| | GGNNCC-R | CCAGGACCGCCTGGAGCTGA |
| | GGNNNCC-L | CCGTCAGCTCCAGGCGGTCC |
| | GGNNNCC-R | AGCAGCAGCAGCAGTGGCAG |
| PPP1R3C (PTG) (ヒト) | GGCC-L | ATGTGCCAAGCAAAGCCTCA |
| | GGCC-R | TTCGGTCATGCCCGTGGATG |
| | GGNCC-L | GTCGTTGAAATTCATCGTAC |
| | GGNCC-R | ACCACCTGTGAAGAGTTTCC |
| | GGNNCC-L | CGTCGTTGAAATTCATCGTA |
| | GGNNCC-R | ACCACCTGTGAAGAGTTTCC |
| Gys1 (マウス) | GGCC-L | GAACGCAGTGCTTTTCGAGG |
| | GGCC-R | ACCCTTGTTGGCCACCTCCC |
| | GGNCC-L | GGTGACAACTACTATCTGGT |
| | GGNCC-R | CTCACACCCTGCTCCGTGTA |
| | GGNNCC-L | GGGTGACAACTACTATCTGG |
| | GGNNCC-R | CTCACACCCTGCTCCGTGTA |
| | GGNNNCC-L | CGAGAACGCAGTGCTTTTCG |
| | GGNNNCC-R | ACCCTTGTTGGCCACCTCCC |
| PPP1R3C (PTG) (マウス) | GGCC-L | ATGAGCCAAGCAAATCCTCA |
| | GGCC-R | TTCCGTCATGCCCGTGGACA |
| | GGNCC-L | CTTCGTTGAAAACCATTGTA |
| | GGNCC-R | CCACCTCTGAAGAGTTTCCT |
| | GGNNCC-L | CTTCGTTGAAAACCATTGTA |
| | GGNNCC-R | ACCACCTCTGAAGAGTTTCC |
| | GGNNNCC-L | CTTCCACTCACTCTGCGATT |

【０４７５】

【表３４】

| | | |
|---|---|---|
| PCSK9 (マウス) | GGNNNCC-R | ACCATGTCTCAGTGTCAAGC |
| | GGCC-L | GGCGGCAACAGCGGCAACAG |
| | GGCC-R | ACTGCTCTGCGTGGCTGCGG |
| | GGNNCC-L | CCGCAGCCACGCAGAGCAGT |
| | GGNNCC-R | GCACCTCTCCTCGCCCCGAT |

【０４７６】

ガイドＲＮＡの安定性を向上させかつ特異性を増加させるための代替的戦略

１．ガイドＲＮＡの５’におけるヌクレオチドは、天然ＲＮＡのようなリン酸エステル結合よりむしろ、チオールエステル結合で連結され得る。チオールエステル結合は、内因性ＲＮＡ分解機構によるガイドＲＮＡの消化を防止し得る。

【０４７７】

２．ガイドＲＮＡのガイド配列（５’２０ｂｐ）におけるヌクレオチドは、結合特異性を改善するためのベースとして架橋核酸（ｂｒｉｄｇｅｄ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ：ＢＮＡ）を使用することができる。

【０４７８】

実施例２５：迅速多重ゲノム編集用のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ

本発明の態様は、標的設計後３～４日以内に遺伝子改変の効率および特異性を試験することができ、かつ２～３週間以内に改変されたクローン細胞系を得ることができるプロトコルおよび方法に関する。

【０４７９】

プログラム可能なヌクレアーゼは、ゲノムエンジニアリングを高精度で媒介するのに強力な技術である。微生物ＣＲＩＳＰＲ適応免疫系由来のＲＮＡガイドＣａｓ９ヌクレアーゼを使用して、単純にそのガイドＲＮＡにおいて２０ｎｔターゲティング配列を指定することにより真核細胞における効率的なゲノム編集を促進することができる。本出願人らは、哺乳類細胞における効率的なゲノム編集を促進し、かつ下流機能性研究用の細胞系を作成するためＣａｓ９を応用する一組のプロトコルを記載する。標的設計から始めて３～４日以内に効率的かつ特異的な遺伝子改変を達成することができ、かつ２～３週間以内に改変されたクローン細胞系を得ることができる。

【０４８０】

生体系および生物をエンジニアリングする能力は、基礎科学、医薬、およびバイオテクノロジー全域にわたる非常に大きな適用可能性を有している。ここで、内在性ゲノム遺伝子座の正確な編集を促進するプログラム可能な配列特異的エンドヌクレアーゼが、これまで遺伝学的に扱い易くなかったものを含め、広範囲の種における遺伝的エレメントおよび原因遺伝子変異の体系的調査を可能にする。ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、およびＲＮＡガイドＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼシステムを含め、多くのゲノム編集技術が近年出現している。最初の２つの技術は、エンドヌクレアーゼ触媒ドメインをモジュール式ＤＮＡ結合タンパク質にテザー係留して、特定のゲノム遺伝子座に標的ＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）を誘導するという共通した戦略を用いる。対照的に、Ｃａｓ９は、標的ＤＮＡとのワトソン・クリック型塩基対合を介して小さいＲＮＡにガイドされるヌクレアーゼであり、設計が容易で効率的な、かつ種々の細胞型および生物のハイスループットの多重化した遺伝子編集に良く適したシステムを呈する。ここで本出願人らは、最近開発されたＣａｓ９ヌクレアーゼを応用して哺乳類細胞における効率的なゲノム編集を促進し、かつ下流機能性研究用の細胞系を作成する一組のプロトコルを記載する。

【０４８１】

ＺＦＮおよびＴＡＬＥＮと同様に、Ｃａｓ９は標的ゲノム遺伝子座におけるＤＳＢを刺激することによりゲノム編集を促進する。Ｃａｓ９によって開裂されると、標的遺伝子座

は２つの主要なＤＮＡ損傷修復経路であるエラープローン非相同末端結合（ＮＨＥＪ）経路または高フィデリティ相同性組換え修復（ＨＤＲ）経路のうちの一方を経る。いずれの経路を利用しても所望の編集結果を達成し得る。

【０４８２】

ＮＨＥＪ：修復テンプレートが存在しない場合、ＮＨＥＪプロセスはＤＳＢを再びライゲートし直し、これによりインデル突然変異の形態の傷跡が残り得る。コードエクソン内に現れるインデルはフレームシフト突然変異および未成熟終止コドンをもたらし得るため、このプロセスを利用して遺伝子ノックアウトを達成することができる。ゲノムにおいて大きい欠失を媒介するため複数のＤＳＢも利用し得る。

【０４８３】

ＨＤＲ：相同性組換え修復は、ＮＨＥＪの代替となる主要なＤＮＡ修復経路である。ＨＤＲは典型的にはＮＨＥＪと比べて起こる頻度が低いが、ＨＤＲを利用すると、外因的に導入された修復テンプレートの存在下で標的遺伝子座に正確な定義付けられた改変を作成し得る。修復テンプレートは、二本鎖ＤＮＡの形態であって、挿入配列に隣接する相同性アームを含む従来のＤＮＡターゲティング構築物と同様に設計されてもよく、あるいは一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）の形態であってもよい。後者は、原因遺伝子変異を探索するための単一のヌクレオチド突然変異の導入など、ゲノムに小さい編集を作製するための有効かつ単純な方法を提供する。ＮＨＥＪと異なり、ＨＤＲは概して分裂細胞においてのみ活性であり、その効率は細胞型および細胞状態に応じて変化する。

【０４８４】

ＣＲＩＳＰＲの概要：ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、対照的に、Ｃａｓ９ヌクレアーゼと低分子ガイドＲＮＡとからなる最小でも二成分系である。Ｃａｓ９を異なる遺伝子座にターゲティングし直し、または複数の遺伝子を同時に編集するために必要なことは、単純に、異なる２０ｂｐオリゴヌクレオチドのクローニングである。Ｃａｓ９ヌクレアーゼの特異性は未だ完全には解明されていないが、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の単純なワトソン・クリック型塩基対合はＺＦＮまたはＴＡＬＥＮドメインのそれより予測可能性が高いように思われる。

【０４８５】

ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ（クラスター化等間隔短鎖回分リピート）は、Ｃａｓ９を使用して外来性遺伝子エレメントを開裂する細菌適応免疫系である。Ｃａｓ９は、可変的ｃｒＲＮＡと必須の補助的ｔｒａｃｒＲＮＡとの非コードＲＮＡのペアによりガイドされる。ｃｒＲＮＡは、ワトソン・クリック型塩基対合で標的ＤＮＡの位置を特定することにより特異性を決定する２０ｎｔガイド配列を含む。天然の細菌系では複数のｃｒＲＮＡが共転写され、Ｃａｓ９を種々の標的に向けさせる。化膿性連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）に由来するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系では、標的ＤＮＡが５’－ＮＧＧ／ＮＲＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）（他のＣＲＩＳＰＲ系については異なり得る）の直前になければならない。

【０４８６】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓは、哺乳類細胞ではヒトコドン最適化Ｃａｓ９および必須のＲＮＡ成分の異種発現により再構成される。さらに、ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡとを融合してキメラの合成ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を作り出すことができる。このように、ｓｇＲＮＡ内の２０ｎｔガイド配列を変えることにより、目的とするいかなる標的にもＣａｓ９を仕向け直すことができる。

【０４８７】

その実現の容易さおよび多重化可能性を所与として、Ｃａｓ９は、ＮＨＥＪおよびＨＤＲの両方による特定の突然変異を担持するエンジニアリングされた真核細胞の作成に用いられてきた。加えて、ｓｇＲＮＡおよびＣａｓ９をコードするｍＲＮＡの胚への直接注入が、複数の改変アレルを有するトランスジェニックマウスの迅速な作成を可能にしている；これらの結果は、本来遺伝的に扱いが困難な生物の編集に有望である。

【０４８８】

その触媒ドメインの１つに破壊を有する突然変異体Ｃａｓ９が、ＤＮＡを開裂するというよりむしろそれにニックを入れるようにエンジニアリングされており、一本鎖切断およびＨＤＲによる優先的修復が可能となって、オフターゲットＤＳＢによる望ましくないインデル突然変異が潜在的に改良されている。加えて、突然変異したＤＮＡ開裂触媒残基を両方ともに有するＣａｓ９突然変異体が、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）における転写調節を可能にするように適合されており、多様な適用に合わせてＣａｓ９を機能性にし得る可能性を実証している。本発明の特定の態様は、ヒト細胞の多重編集用Ｃａｓ９の構築および適用に関する。

【０４８９】

本出願人らは、真核生物遺伝子編集を促進するため核局在化配列が隣接するヒトコドン最適化Ｃａｓ９を提供している。本出願人らは、２０ｎｔガイド配列を設計するに当たっての考慮点、ｓｇＲＮＡの迅速な構築および機能検証プロトコル、および最後に、Ｃａｓ９ヌクレアーゼを使用したヒト胎児腎臓系（ＨＥＫ－２９３ＦＴ）およびヒト幹細胞系（ＨＵＥＳ９）におけるＮＨＥＪベースおよびＨＤＲベースの両方のゲノム改変の媒介を記載する。このプロトコルは他の細胞型および生物にも同様に適用することができる。

【０４９０】

ｓｇＲＮＡの標的選択：遺伝子ターゲティング用の２０ｎｔガイド配列の選択には、２つの主な考慮点がある：１）化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９については標的配列が５’－ＮＧＧ　ＰＡＭの前になければならず、および２）ガイド配列はオフターゲット活性を最小限に抑えるように選択されなければならない。本出願人らは、目的の入力配列を取り込み好適な標的部位を同定するオンラインＣａｓ９ターゲティング設計ツールを提供した。各ｓｇＲＮＡについてオフターゲット改変を実験的に評価するため、本出願人らはまた、塩基対合ミスマッチのアイデンティティ、位置、および分布の効果に関する本出願人らの定量的特異性分析に従い順位が付けられた、意図する各標的についての計算的に予測されたオフターゲット部位も提供する。

【０４９１】

計算的に予測されたオフターゲット部位に関する詳細情報は以下のとおりである：

オフターゲット開裂活性の考慮点：他のヌクレアーゼと同様に、Ｃａｓ９は低い頻度でゲノムにおけるオフターゲットＤＮＡ標的を開裂し得る。所与のガイド配列がオフターゲット活性を呈する程度は、酵素濃度、用いられる特定のガイド配列の熱力学、および標的ゲノムにおける同様の配列の存在量を含めた複合的な要因に依存する。Ｃａｓ９の常法の適用については、オフターゲット開裂の程度を最小限に抑えるとともに、オフターゲット開裂の存在を検出可能である方法を考慮することが重要である。

【０４９２】

オフターゲット活性の最小化：細胞系における適用について、本出願人らは、以下の２ステップでオフターゲットゲノム改変の程度を低下させることを推奨する。第一に、本発明者らのオンラインＣＲＩＳＰＲ標的選択ツールを使用して、所与のガイド配列がオフターゲット部位を有する可能性を計算的に評価することが可能である。このような分析は、ガイド配列と同様の配列であるオフターゲット配列に関してゲノムを網羅的に検索することにより実施される。ｓｇＲＮＡとその標的ＤＮＡとの間のミスマッチ塩基の効果の包括的な実験研究から、ミスマッチの許容範囲は、１）位置依存性－ガイド配列の３’末端側８～１４ｂｐは、５’塩基と比べてミスマッチに対する許容度が低い、２）数量依存性－一般に３個より多いミスマッチは許容されない、３）ガイド配列依存性－一部のガイド配列は他と比べてミスマッチに対する許容度が低い、および４）濃度依存性－オフターゲット開裂は形質移入されたＤＮＡの量に対する感度が極めて高いことが明らかになった。本出願人らの標的部位分析ウェブツール（ウェブサイトｇｅｎｏｍｅ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．ｏｒｇ／ｔｏｏｌｓで利用可能）は、これらの基準を統合し、標的ゲノムにおける推定オフターゲット部位の予測を提供する。第二に、本出願人らは、Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡ発現プラスミドの量をタイトレートしてオフターゲット活性を最小限に抑えることを推奨する。

【０４９３】
オフターゲット活性の検出：本出願人らのＣＲＩＳＰＲターゲティングウェブツールを使用して、最も可能性の高いオフターゲット部位ならびにそれらの部位のＳＵＲＶＥＹＯＲまたはシーケンシング分析を実施するプライマーのリストを作成することが可能である。Ｃａｓ９を使用して作成されるアイソジェニッククローンについて、本出願人らは、これらの候補オフターゲット部位のシーケンシングにより任意の望ましくない突然変異を調べることを強く推奨する。予測された候補リストに含まれない部位にオフターゲット改変があり得ることは注記に値し、完全なゲノム配列を実施してオフターゲット部位がないことを完全に確かめるべきである。さらに、同じゲノム内にいくつかのＤＳＢが誘導される多重アッセイでは、低率の転座イベントがあり得、ディープシーケンシングなどの種々の技法を用いて評価され得る。

【０４９４】
本オンラインツールは、１）ｓｇＲＮＡ構築物の調製、２）標的改変効率のアッセイ、および３）潜在的なオフターゲット部位における開裂の評価に必要なあらゆるオリゴおよびプライマーの配列を提供する。ｓｇＲＮＡの発現に使用されるＵ６　ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターは、その転写物の最初の塩基としてグアニン（Ｇ）ヌクレオチドを好むため、２０ｎｔガイド配列がＧから始まらないｓｇＲＮＡの５’に追加のＧが付加されることは注記に値する。

【０４９５】
ｓｇＲＮＡの構築および送達手法：所望の適用に応じて、ｓｇＲＮＡは、１）発現カセットを含有するＰＣＲアンプリコン、または２）ｓｇＲＮＡ発現プラスミドのいずれかとして送達され得る。ＰＣＲベースのｓｇＲＮＡ送達は、Ｕ６プロモーターテンプレートの増幅に使用されるリバースＰＣＲプライマーにカスタムのｓｇＲＮＡ配列を付加する。得られるアンプリコンが、Ｃａｓ９含有プラスミド（ＰＸ１６５）と同時形質移入され得る。この方法は、ｓｇＲＮＡコードプライマーを得て僅か数時間後に機能性試験用の細胞形質移入を実施することができるため、複数の候補ｓｇＲＮＡの迅速スクリーニングに最適である。この単純な方法ではプラスミドベースのクローニングおよび配列検証が不要となるため、大規模なノックアウトライブラリの作成または他のスケールに影響される適用のため多数のｓｇＲＮＡを試験しまたは同時形質移入することに良く適している。プラスミドベースのｓｇＲＮＡ送達に必要な約２０ｂｐオリゴと比較して、ｓｇＲＮＡコードプライマーが１００ｂｐを超える点は留意すべきである。

【０４９６】
ｓｇＲＮＡ用の発現プラスミドの構築もまた単純かつ高速であり、部分的に相補的なオリゴヌクレオチドのペアによる単一のクローニングことを含む。オリゴペアのアニーリング後、得られるガイド配列が、Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡ配列の残り部分を有する不変の足場の両方を有するプラスミド（ＰＸ３３０）に挿入され得る。形質移入プラスミドもまた、インビボ送達用のウイルス産生を可能にするように改変され得る。

【０４９７】
ＰＣＲおよびプラスミドベースの送達に加え、Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡの両方をＲＮＡとして細胞に導入することができる。

【０４９８】
修復テンプレートの設計：従来、標的ＤＮＡ改変は、変化させる部位に隣接する相同性アームを含むプラスミドベースのドナー修復テンプレートを使用する必要があった。両側の相同性アームの長さは様々であってもよいが、典型的には５００ｂｐより長い。この方法を使用して、蛍光タンパク質または抗生物質耐性マーカーなどのレポーター遺伝子の挿入を含む大きい改変を作成することができる。ターゲティングプラスミドの設計および構築は、他の部分に記載されている。

【０４９９】
最近になって、クローニングを含まない定義付けられた遺伝子座の範囲内の短い改変には、ターゲティングプラスミドの代わりに一本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ

）が使用されている。高いＨＤＲ効率を達成するため、ｓｓＯＤＮは標的領域と相同の少なくとも４０ｂｐのフランキング配列を両側に含み、標的遺伝子座に対してセンス方向にも、またはアンチセンス方向にも向くことができる。

【０５００】

機能性試験

ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ：本出願人らは、ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ（またはＰＣＲアンプリコンシーケンシングのいずれかによりインデル突然変異を検出した。本出願人らのオンラインＣＲＩＳＰＲ標的設計ツールは、両方の手法に推奨されるプライマーを提供する。しかしながら、ＳＵＲＶＥＹＯＲまたはシーケンシングプライマーはまた、ゲノムＤＮＡから目的の領域を増幅し、かつ非特異的なアンプリコンを回避するようにＮＣＢＩプライマーＢｌａｓｔを使用して手動で設計されてもよい。ＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーは、ゲル電気泳動による開裂バンドの明確な可視化を可能にするため、Ｃａｓ９標的の両側で３００～４００ｂｐ（６００～８００ｂｐの総アンプリコンに対して）を増幅するように設計されなければならない。過剰なプライマー二量体形成を防ぐため、ＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーは、典型的には融解温度が約６０℃の２５ｎｔ長未満であるように設計されなければならない。本出願人らは、特定のＰＣＲアンプリコンに対する候補プライマーの各ペアを試験し、ならびにＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼ消化プロセスの間に非特異的な開裂が存在しないことについても試験することを推奨する。

【０５０１】

プラスミド媒介性またはｓｓＯＤＮ媒介性ＨＤＲ：ＨＤＲは改変領域のＰＣＲ増幅およびシーケンシングにより検出することができる。この目的上、ＰＣＲプライマーは、残存する修復テンプレート（ＨＤＲ　ＦｗｄおよびＲｅｖ、図１２）の誤検出を回避するため相同性アームが広がる領域の外側にアニールしなければならない。ｓｓＯＤＮ媒介性ＨＤＲはＳＵＲＶＥＹＯＲ　ＰＣＲプライマーを使用することができる。

【０５０２】

シーケンシングによるインデルまたはＨＤＲの検出：本出願人らは、サンガー法または次世代ディープシーケンシング（ＮＧＳ）のいずれかにより標的ゲノム改変を検出した。前者については、ＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーまたはＨＤＲプライマーのいずれかを使用して改変領域からゲノムＤＮＡを増幅することができる。アンプリコンは、形質転換のためｐＵＣ１９などのプラスミドにサブクローニングしなければならない；個々のコロニーをシーケンシングすることによりクローン遺伝子型を明らかにすることができる。

【０５０３】

本出願人らは、より短いアンプリコン用の次世代シーケンシング（ＮＧＳ）プライマーを、典型的には１００～２００ｂｐのサイズ範囲で設計した。ＮＨＥＪ突然変異の検出には、より長いインデルの検出が可能であるように、プライミング領域とＣａｓ９標的部位との間が少なくとも１０～２０ｂｐのプライマーを設計することが重要である。本出願人らは、多重ディープシーケンシング用のバーコード付きアダプターを取り付ける二段階ＰＣＲ法に関する指針を提供する。本出願人らは、偽陽性インデルレベルが全般的に低いことから、Ｉｌｌｕｍｉｎａプラットフォームを推奨する。次に、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ、または単純な配列解析スクリプトなどのリードアラインメントプログラムを用いてオフターゲット分析（先述した）を実施することができる。

【０５０４】

材料および試薬

ｓｇＲＮＡ調製：

超高純度ＤＮアーゼＲＮアーゼ不含蒸留水（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０９７７－０２３）

Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ融合ポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号６００６７９）

重要。標準Ｔａｑポリメラーゼ、これは３’－５’エキソヌクレアーゼ校正活性を欠いており、フィデリティが低く、増幅エラーをもたらし得る。Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩは高

フィデリティポリメラーゼ（Ｐｆｕと同等のフィデリティ）であり、最小限の最適化で高収率のＰＣＲ産物を生じる。他の高フィデリティポリメラーゼに代えてもよい。
【０５０５】
Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ反応緩衝液（５×；Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ポリメラーゼと同梱）
ｄＮＴＰ溶液ミックス（各２５ｍＭ；Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ、カタログ番号Ｎ２０５Ｌ）
ＭｇＣｌ２（２５ｍＭ；ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ｒ０９７１）
ＱＩＡｑｕｉｃｋゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号２８７０４）
ＱＩＡｐｒｅｐ　ｓｐｉｎミニプレップキット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号２７１０６）
超高純度ＴＢＥ緩衝液（１０×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１５５８１－０２８）
ＳｅａＫｅｍ　ＬＥアガロース（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号５０００４）
ＳＹＢＲ　Ｓａｆｅ　ＤＮＡ染色（１０，０００×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｓ３３１０２）
１ｋｂ　Ｐｌｕｓ　ＤＮＡラダー（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０７８７－０１８）
ＴｒａｃｋＩｔ　ＣｙａｎＯｒａｎｇｅローディング緩衝液（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０４８２－０２８）
ＦａｓｔＤｉｇｅｓｔ　ＢｂｓＩ（ＢｐｉＩ）（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ／ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＦＤ１０１４）
Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ　Ｔａｎｇｏ緩衝液（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ／ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＢＹ５）
ＤＬ－ジチオスレイトール（ＤＴＴ；Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ／ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ｒ０８６２）
Ｔ７　ＤＮＡリガーゼ（Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ、カタログ番号Ｌ６０２Ｌ）
重要：より一般的に用いられるＴ４リガーゼを代用しないこと。Ｔ７リガーゼは付着末端で平滑末端と比べて１，０００倍高い活性を有し、かつ市販の高濃度Ｔ４リガーゼと比べて全体的な活性が高い。
Ｔ７　２×迅速ライゲーション緩衝液（Ｔ７　ＤＮＡリガーゼと同梱、Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ、カタログ番号Ｌ６０２Ｌ）
Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｍ０２０１Ｓ）
Ｔ４ＤＮＡリガーゼ反応緩衝液（１０×；Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｂ０２０２Ｓ）
アデノシン５’－三リン酸（１０ｍＭ；Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｐ０７５６Ｓ）
ＰｌａｓｍｉｄＳａｆｅ　ＡＴＰ依存性ＤＮアーゼ（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ、カタログ番号Ｅ３１０１Ｋ）
Ｏｎｅ　Ｓｈｏｔ　Ｓｔｂｌ３化学的コンピテント大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）（Ｅ．ｃｏｌｉ）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｃ７３７３－０３）
ＳＯＣ培地（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｂ９０２０Ｓ）
ＬＢ培地（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｌ３０２２）
ＬＢ寒天培地（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｌ２８９７）
アンピシリン、滅菌ろ過済み（１００ｍｇ　ｍｌ－１；Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ａ５３５４）
【０５０６】
哺乳類細胞培養：
ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｒ７００－

０７）
ダルベッコ最小イーグル培地（ＤＭＥＭ、１×、高グルコース；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０３１３－０３９）
ダルベッコ最小イーグル培地（ＤＭＥＭ、１×、高グルコース、フェノールレッド不含；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号３１０５３－０２８）
ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ、１×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１４１９０－２５０）
ウシ胎仔血清、適格品（ｑｕａｌｉｆｉｅｄ）かつ熱失活済み（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０４３８－０３４）
Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ　Ｉ低血清培地（ＦＢＳ；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１１０５８－０２１）
ペニシリン－ストレプトマイシン（１００×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１５１４０－１６３）
ＴｒｙｐＬＥ（商標）Ｅｘｐｒｅｓｓ（１×、フェノールレッド不含；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１２６０４－０１３）
リポフェクタミン２０００形質移入試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１１６６８０２７）
Ａｍａｘａ　ＳＦ細胞系４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）ＸキットＳ（３２　ＲＣＴ；Ｌｏｎｚａ、カタログ番号Ｖ４ＸＣ－２０３２）
ＨＵＥＳ　９細胞系（ＨＡＲＶＡＲＤ　ＳＴＥＭ　ＣＥＬＬ　ＳＣＩＥＮＣＥ）
Ｇｅｌｔｒｅｘ　ＬＤＥＶ不含低成長因子基底膜マトリックス（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ａ１４１３２０１）
ｍＴｅＳＲ１培地（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号０５８５０）
Ａｃｃｕｔａｓｅ細胞剥離液（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号０７９２０）
ＲＯＣＫ阻害薬（Ｙ－２７６３２；Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号ＳＣＭ０７５）
Ａｍａｘａ　Ｐ３初代細胞４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）ＸキットＳ（３２　ＲＣＴ；Ｌｏｎｚａカタログ番号Ｖ４ＸＰ－３０３２）

【０５０７】

遺伝子型解析：
ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ　ＤＮＡ抽出溶液（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ、カタログ番号ＱＥ０９０５０）
ＳＵＲＶＥＹＯＲ、ＲＦＬＰ分析、またはシーケンシング用のＰＣＲプライマー（プライマー表参照）
Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ融合ポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号６００６７９）
重要。Ｓｕｒｖｅｙｏｒアッセイは一塩基ミスマッチの感度を有するため、高フィデリティポリメラーゼを使用することが特に重要である。他の高フィデリティポリメラーゼに代えてもよい。
Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ反応緩衝液（５×；Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ポリメラーゼと同梱）
ｄＮＴＰ溶液ミックス（各２５ｍＭ；Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ、カタログ番号Ｎ２０５Ｌ）
ＱＩＡｑｕｉｃｋゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号２８７０４）
Ｔａｑ緩衝液（１０×；Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ、カタログ番号Ｂ０００５）
標準ゲル電気泳動用のＳＵＲＶＥＹＯＲ突然変異検出キット（Ｔｒａｎｓｇｅｎｏｍｉｃ、カタログ番号７０６０２５）
超高純度ＴＢＥ緩衝液（１０×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１５５８１－０２８）
ＳｅａＫｅｍ　ＬＥアガロース（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号５０００４）

４～２０％ＴＢＥゲル　１．０ｍｍ、１５ウェル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号ＥＣ６２２５５ＢＯＸ）
Ｎｏｖｅｘ（登録商標）高密度ＴＢＥ試料緩衝液（５×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号ＬＣ６６７８）
ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ核酸ゲル染色（１０，０００×；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｓ－１１４９４）
１ｋｂ　Ｐｌｕｓ　ＤＮＡラダー（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０７８７－０１８）
ＴｒａｃｋＩｔ　ＣｙａｎＯｒａｎｇｅローディング緩衝液（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１０４８２－０２８）
ＦａｓｔＤｉｇｅｓｔ　ＨｉｎｄＩＩＩ（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ／ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＦＤ０５０４）

【０５０８】

機器
フィルター付き滅菌ピペットチップ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）
標準１．５ｍｌ微量遠心管（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ、カタログ番号００３０　１２５．１５０）
Ａｘｙｇｅｎ９６ウェルＰＣＲプレート（ＶＷＲ、カタログ番号ＰＣＲ－９６Ｍ２－ＨＳＣ）
Ａｘｙｇｅｎ　８ストリップＰＣＲチューブ（Ｆｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号１４－２２２－２５０）
Ｆａｌｃｏｎチューブ、ポリプロピレン、１５ｍｌ（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、カタログ番号３５２０９７）
Ｆａｌｃｏｎチューブ、ポリプロピレン、５０ｍｌ（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、カタログ番号３５２０７０）
細胞ストレーナーキャップ付き丸底チューブ、５ｍｌ（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、カタログ番号３５２２３５）
ペトリ皿（６０ｍｍ×１５ｍｍ；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ番号３５１００７）
組織培養プレート（２４ウェル；ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、カタログ番号３５３０４７）
組織培養プレート（９６ウェル、平底；ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、カタログ番号３５３０７５）
組織培養皿（１００ｍｍ；ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、３５３００３）
プログラム可能な温度ステッピング機能付き９６ウェルサーモサイクラー（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｖｅｒｉｔｉ、カタログ番号４３７５７８６）。
卓上微量遠心機５４２４、５８０４（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）
ゲル電気泳動システム（ＰｏｗｅｒＰａｃ　ｂａｓｉｃ　ｐｏｗｅｒ　ｓｕｐｐｌｙ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号１６４－５０５０、およびＳｕｂ－Ｃｅｌｌ　ＧＴシステムゲルトレー、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号１７０－４４０１）
Ｎｏｖｅｘ　ＸＣｅｌｌ　ＳｕｒｅＬｏｃｋ　Ｍｉｎｉ－Ｃｅｌｌ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号ＥＩ０００１）
デジタルゲルイメージングシステム（ＧｅｌＤｏｃ　ＥＺ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号１７０－８２７０、および青色試料トレー、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号１７０－８２７３）
青色光トランスイルミネーターおよびオレンジフィルターゴーグル（ＳａｆｅＩｍａｇｅｒ　２．０；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｇ６６００）
ゲル定量化ソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、ＩｍａｇｅＬａｂ、ＧｅｌＤｏｃ　ＥＺと同梱、または国立衛生研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ）のオープンソースＩｍａｇｅＪ、ウェブサイトｒｓｂｗｅｂ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｉｊ／で利用可能）

紫外分光光度計（ＮａｎｏＤｒｏｐ　２０００ｃ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）

【０５０９】

試薬セットアップ

トリス－ホウ酸ＥＤＴＡ（ＴＢＥ）電気泳動溶液　ＴＢＥ緩衝液を蒸留水に希釈し、アガロースゲルをキャスティングするためおよびゲル電気泳動用緩衝液として使用するための１×ワーキング溶液とする。緩衝液は室温（１８～２２℃）で少なくとも１年間保存しておくことができる。

【０５１０】

・ＡＴＰ、１０ｍＭ　１０ｍＭ　ＡＴＰを５０μｌアリコートに分け、－２０℃で最長１年間保存する；凍結－融解サイクルを繰り返すことは避ける。

【０５１１】

・ＤＴＴ、１０ｍＭ　蒸留水中に１０ｍＭ　ＤＴＴ溶液を調製し、２０μｌアリコートとして－７０℃で最長２年間保存する；ＤＴＴは酸化し易いため、反応毎に新しいアリコートを使用する。

【０５１２】

・Ｄ１０培養培地　ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を培養するため、ＤＭＥＭに１×　ＧｌｕｔａＭＡＸおよび１０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）ウシ胎仔血清を補給することによりＤ１０培養培地を調製する。プロトコルに示すとおり、この培地はまた１×ペニシリン－ストレプトマイシンを補給してもよい。Ｄ１０培地は前もって作製しておき、４℃で最長１ヶ月間保存することができる。

【０５１３】

・ｍＴｅＳＲ１培養培地　ヒト胚性幹細胞の培養のため、５×サプリメント（ｍＴｅＳＲ１基本培地と同梱）、および１００ｕｇ／ｍｌ　Ｎｏｒｍｏｃｉｎを補給してｍＴｅＳＲ１培地を調製する。

【０５１４】

手順

ターゲティング成分の設計およびオンラインツールの使用・タイミング１日

１｜標的ゲノムＤＮＡ配列を入力する。本出願人らは、目的の入力配列を受け取り、好適な標的部位を同定してそれに順位を付け、および意図する標的毎にオフターゲット部位を計算的に予測するオンラインＣａｓ９ターゲティング設計ツールを提供する。あるいは、任意の５’－ＮＧＧの直ちに上流で２０ｂｐ配列を同定することにより、ガイド配列を手動で選択してもよい。

【０５１５】

２｜オンラインツールによって特定されるとおりの必要なオリゴおよびプライマーを注文する。部位を手動で選択する場合、オリゴおよびプライマーを設計しなければならない。

【０５１６】

ｓｇＲＮＡ発現構築物の調製

３｜ｓｇＲＮＡ発現構築物を作成するため、ＰＣＲベースまたはプラスミドベースのいずれのプロトコルも用いることができる。

【０５１７】

（Ａ）ＰＣＲ増幅による・タイミング２時間

（ｉ）本出願人らは希釈Ｕ６　ＰＣＲテンプレートを調製する。本出願人らはＰＸ３３０をＰＣＲテンプレートとして使用することを推奨するが、任意のＵ６含有プラスミドを同様にＰＣＲテンプレートとして使用することができる。本出願人らはテンプレートを１０ｎｇ／ｕｌの濃度となるようにｄｄＨ$_2$Ｏで希釈した。Ｕ６によってドライブされるｓｇＲＮＡを既に含んでいるプラスミドまたはカセットがテンプレートとして使用される場合、ゲル抽出を実施して、産物が意図したｓｇＲＮＡのみを含み、テンプレートからのｓｇＲＮＡキャリーオーバーの痕跡を含まないことを確実にする必要がある点に留意された

い。

【０５１８】

（ｉｉ）本出願人らは希釈ＰＣＲオリゴを調製した。Ｕ６－ＦｗｄおよびＵ６－ｓｇＲＮＡ－Ｒｅｖプライマーは、ｄｄＨ$_2$Ｏ中１０ｕＭの最終濃度に希釈される（１０ｕｌの１００ｕＭプライマーを９０ｕｌ　ｄｄＨ$_2$Ｏに添加する）。

【０５１９】

（ｉｉｉ）Ｕ６－ｓｇＲＮＡ　ＰＣＲ反応。本出願人らは、各Ｕ６－ｓｇＲＮＡ－Ｒｅｖプライマーおよび必要に応じてマスターミックスに対して以下の反応をセットアップした：

【０５２０】

【表３５】

| 成分: | 量 (ul) | 最終濃度 |
|---|---|---|
| Herculase II PCR 緩衝液, 5X | 10 | 1X |
| dNTP, 100mM (各 25mM) | 0.5 | 1 mM |
| U6 テンプレート (PX330) | 1 | 0.2 ng/ul |
| U6-フォワードプライマー | 1 | 0.2 uM |
| U6-sgRNA-リバースプライマー (可変) | 1 | 0.2 uM |
| Herculase II 融合ポリメラーゼ | 0.5 | |
| 蒸留水 | 36 | |
| 合計 | 50 | |

【０５２１】

（ｉｖ）本出願人らは、ステップ（ｉｉｉ）の反応物に対し、以下のサイクル条件を使用してＰＣＲ反応を実施した：

【０５２２】

【表３６】

| サイクル数 | 変性 | アニーリング | 伸長 |
|---|---|---|---|
| 1 | 95°C, 2 分 | | |
| 2-31 | 95°C, 20 秒 | 60°C, 20 秒 | 72°C, 20 秒 |
| 32 | | | 72°C, 3 分 |

【０５２３】

（ｖ）反応の完了後、本出願人らは産物をゲル上で泳動させて、シングルバンドの増幅の成功を確かめた。１×ＳＹＢＲ　Ｓａｆｅ色素を含む１×ＴＢＥ緩衝液に２％（ｗｔ／ｖｏｌ）アガロースゲルをキャスティングする。５ｕｌのＰＣＲ産物をゲル中１５Ｖｃｍ－１で２０～３０分間泳動させる。成功したアンプリコンは、１つのシングル３７０ｂｐ産物を生じるはずであり、テンプレートは見えないはずである。ＰＣＲアンプリコンをゲル抽出する必要はないはずである。

【０５２４】

（ｖｉ）本出願人らは、製造者の指示に従いＱＩＡｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用してＰＣＲ産物を精製した。３５ｕｌの緩衝液ＥＢまたは水中にＤＮＡを溶出させる。精製したＰＣＲ産物は４℃または－２０℃で保存しておくことができる。

【０５２５】

（Ｂ）Ｃａｓ９含有バイシストロニック発現ベクターへのｓｇＲＮＡのクローニング・タイミング３日

（ｉ）ｓｇＲＮＡオリゴインサートを調製する。本出願人らは、各ｓｇＲＮＡ設計について、１００ｕＭの最終濃度となるようにオリゴの上部鎖および下部鎖を再懸濁した。オリゴを以下のとおりリン酸化およびアニーリングする：

【０５２６】

【表３７】

| | |
|---|---|
| オリゴ 1 (100 uM) | 1 ul |
| オリゴ 2 (100 uM) | 1 ul |
| T4 ライゲーション緩衝液, 10X | 1 ul |
| T4 PNK | 1 ul |
| $ddH_2O$ | 6 ul |
| 合計 | 10 ul |

【０５２７】

（ｉｉ）以下のパラメータを使用してサーモサイクラーでアニーリングする：

３７℃で３０分

９５℃で５分

毎分５℃で２５℃まで下降させる。

【０５２８】

（ｉｉｉ）本出願人らは、１ｕｌのオリゴを１９９ｕｌの室温ｄｄＨ$_2$Ｏに添加することにより、リン酸化およびアニーリングしたオリゴを１：２００希釈した。

【０５２９】

（ｉｖ）ｓｇＲＮＡオリゴをＰＸ３３０にクローニングする。本出願人らは、各ｓｇＲＮＡについてＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ反応をセットアップする。本出願人らは、インサートのない、ＰＸ３３０のみの陰性対照を設定することを推奨する。

【０５３０】

【表３８】

| | |
|---|---|
| PX330 (100 ng) | x ul |
| ステップ(iii)の希釈オリゴ二重鎖 | 2 ul |
| Tango 緩衝液, 10X | 2 ul |
| DTT, 10mM | 1 ul |
| ATP, 10mM | 1 ul |
| FastDigest BbsI | 1 ul |
| T7 リガーゼ | 0.5 ul |
| $ddH_2O$ | x ul |
| 合計 | 20 ul |

【０５３１】

（ｖ）Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ反応物を合計１時間インキュベートする：

【０５３２】

【表３９】

| サイクル数 | 条件 |
|---|---|
| 1-6 | 37°C で 5 分, 21°C で 5 分 |

【０５３３】
（ｖｉ）本出願人らはＰｌａｓｍｉｄＳａｆｅエキソヌクレアーゼでＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ反応物を処理することにより、任意の残留する線状ＤＮＡを消化させた。このステップは任意選択であるものの、強く推奨される。

【０５３４】
【表４０】

| | |
|---|---|
| ステップ 4 の Golden Gate 反応物 | 11 ul |
| 10X PlasmidSafe 緩衝液 | 1.5 ul |
| ATP, 10 mM | 1.5 ul |
| PlasmidSafe エキソヌクレアーゼ | 1 ul |
| 合計 | 15 ul |

【０５３５】
（ｖｉｉ）本出願人らはＰｌａｓｍｉｄＳａｆｅ反応物を３７℃で３０分間インキュベートし、続いて７０℃で３０分間不活性化した。休題：完了後、反応物を凍結させて後に続行してもよい。環状ＤＮＡは少なくとも１週間安定しているはずである。

【０５３６】
（ｖｉｉｉ）形質転換。本出願人らはＰｌａｓｍｉｄＳａｆｅ処理したプラスミドを、細胞と共に提供されるプロトコルに従いコンピテントな大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株に形質転換した。本出願人らは迅速な形質転換のためＳｔｂｌ３を推奨する。簡潔に言えば、本出願人らは、ステップ（ｖｉｉ）からの５ｕｌの産物を２０ｕｌの化学的にコンピテントな氷冷Ｓｔｂｌ３細胞に添加した。次にこれを氷上で１０分間インキュベートし、４２℃で３０秒間熱ショックを与え、直ちに氷上に２分間戻し、１００ｕｌのＳＯＣ培地を添加し、これを１００ｕｇ／ｍｌアンピシリンを含有するＬＢプレートにプレーティングして３７℃で一晩インキュベートする。

【０５３７】
（ｉｘ）２日目：本出願人らはコロニーの成長に関してプレートを調べた。典型的には、陰性対照プレート（ＢｂｓＩ消化ＰＸ３３０のみのライゲーション、アニーリングされたｓｇＲＮＡオリゴなし）にはコロニーはなく、ＰＸ３３０－ｓｇＲＮＡクローニングプレートには数十個ないし数百個のコロニーがある。

【０５３８】
（ｘ）本出願人らは各プレートから２～３個のコロニーを取り、ｓｇＲＮＡが正しく挿入されていることを確かめた。本出願人らは、滅菌ピペットチップを使用して単一のコロニーを１００ｕｇ／ｍｌアンピシリン含有ＬＢ培地の３ｍｌ培養液に接種した。３７℃で一晩インキュベートし、振盪する。

【０５３９】
（ｘｉ）３日目：本出願人らはＱｉＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎミニプレップキットを製造者の指示に従い使用して、一晩培養物からプラスミドＤＮＡを単離した。

【０５４０】
（ｘｉｉ）ＣＲＩＳＰＲプラスミドを配列検証する。本出願人らはＵ６プロモーターからＵ６－Ｆｗｄプライマーを使用してシーケンシングすることにより各コロニーの配列を検証した。任意選択：以下のプライマー表に掲載するプライマーを使用してＣａｓ９遺伝

子を配列決定する。

【０５４１】

【表４１】

| プライマー | 配列 (5'から3') | 目的 |
|---|---|---|
| U6-フォワード | GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC | U6-sgRNAを増幅する |
| U6-リバース | AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCGGTGTTTC | U6-sgRNAを増幅する; Nは |

【０５４２】

【表４２】

| | | |
|---|---|---|
| | GTCCTTTCCACAAG | 標的の逆相補体である |
| sgRNA-トップ | CACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNN | sgRNAをPX330にクローニングする |
| sgRNA-ボトム | AAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNC | sgRNAをPX330にクローニングする |
| U6-*EMX1*-リバース | AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCCCTAGTCATTGGAGGTGACCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAG | U6-EMX1 sgRNAを増幅する |
| *EMX1*-トップ | CACCGTCACCTCCAATGACTAGGG | EMX1 sgRNAをPX330にクローニングする |
| *EMX1*-ボトム | AAACCCCTAGTCATTGGAGGTGAC | EMX1 sgRNAをPX330にクローニングする |
| ssODN-センス | CAGAAGAAGAAGGGCTCCCATCACATCAACCGGTGGCGCATTGCCACGAAGCAGGCCAATGGGGAGGACATCGATGTCACCTCCAATGACAAGCTTGCTAGCGGTGGGCAACCACAAACCCACGAGGGCAGAGTGCTGCTTGCTGCTGGCCAGGCCCCTGCGTGGGCCCAAGCTGGACTCTGGCCACTCCCT | EMX1 HDR (センス; 挿入には下線を引く) |
| ssODN-アンチセンス | AGGGAGTGGCCAGAGTCCAGCTTGGGCCCACGCAGGGGCCTGGCCAGCAGCAAGCAGCACTCTGCCCTCGTGGGTTTGTGGTTGCCCACCGCTAGCAAGCTTGTCATTGGAGGTGACATCGATGTCCTCCCCATTGGCCTGCTTCGTGGCAATGCGCCACCGGTTGATGTGATGGGAGCCCTTCTTCTTCTG | EMX1 HDR (アンチセンス; 挿入には下線を引く) |
| EMX1-SURV-フォワード | CCATCCCCTTCTGTGAATGT | EMX1 SURVEYORアッセイPCR、シーケンシング |
| EMX1-SURV-リバース | GGAGATTGGAGACACGGAGA | EMX1 SURVEYORアッセイPCR、シーケンシング |
| EMX1-HDR-フォワード | GGCTCCCTGGGTTCAAAGTA | EMX1 RFLP分析PCR、シーケンシング |
| EMX1-HDR-リバース | AGAGGGGTCTGGATGTCGTAA | EMX1 RFLP分析PCR、シーケンシング |
| pUC19-フォワード | CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC | pUC19多重クローニング部位フォワードプライマー、サンガーシーケンシング用 |

【０５４３】

本出願人らはシーケンシングの結果をＰＸ３３０クローニングベクター配列と照合し、Ｕ６プロモーターとｓｇＲＮＡ足場の残り部分との間に２０ｂｐガイド配列が挿入されたことを確かめた。ＧｅｎＢａｎｋベクターマップフォーマット（＊．ｇｂ　ｆｉｌｅ）で

のＰＸ３３０マップの詳細および配列を、ウェブサイトｃｒｉｓｐｒ．ｇｅｎｏｍｅ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．ｏｒｇで見ることができる。

【０５４４】

（任意選択）ｓｓＯＤＮテンプレートの設計・タイミング３日　事前計画

３｜ｓｓＯＤＮを設計および注文する。センスまたはアンチセンスのいずれかのｓｓＯＤＮを供給業者から直接購入することができる。本出願人らは、両側に少なくとも４０ｂｐおよび最適なＨＤＲ効率のためには９０ｂｐの相同性アームを設計することを推奨する。本出願人らの経験上、改変効率はアンチセンスオリゴの方がやや高い。

【０５４５】

４｜本出願人らはｓｓＯＤＮウルトラマー（ｕｌｔｒａｍｅｒ）を１０ｕＭの最終濃度となるように再懸濁して希釈した。センスｓｓＯＤＮとアンチセンス　ｓｓＯＤＮとを組み合わせない、またはアニーリングしないこと。－２０℃で保存する。

【０５４６】

５｜ＨＤＲ適用に関する注記として、本出願人らはｓｇＲＮＡをＰＸ３３０プラスミドにクローニングすることを推奨する。

【０５４７】

ｓｇＲＮＡの機能検証：細胞培養および形質移入・タイミング３～４日

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は多くの哺乳類細胞系で使用されている。細胞系毎に条件が異なり得る。以下のプロトコルは、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞の形質移入条件を詳説する。ｓｓＯＤＮ媒介性ＨＤＲ形質移入に関する注記として、ｓｓＯＤＮの最適な送達のためＡｍａｘａ　ＳＦ細胞系Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒキットが使用される。これは次節に記載する。

【０５４８】

７｜ＨＥＫ２９３ＦＴの維持。細胞は製造者の推奨に従い維持される。簡潔に言えば、本出願人らは、Ｄ１０培地（１０％ウシ胎仔血清を補給したＧｌｕｔａＭａｘ　ＤＭＥＭ）中、３７℃および５％ＣＯ２で細胞を培養した。

【０５４９】

８｜継代のため、本出願人らは培地を取り出し、細胞を押し退けないようＤＰＢＳを容器の側面に穏やかに加えることにより１回リンスした。本出願人らはＴ７５フラスコに２ｍｌのＴｒｙｐＬＥを添加し、３７℃で５分間インキュベートした。１０ｍｌの温Ｄ１０培地を添加して失活させ、５０ｍｌ　Ｆａｌｃｏｎチューブに移した。本出願人らは細胞を穏やかに粉砕することにより解離させ、必要に応じて新しいフラスコに播種し直した。本出願人らは、典型的には２～３日毎に１：４または１：８の分割比で細胞を継代し、細胞を７０％を超えるコンフルエンシーに至らせることが絶対にないようにする。細胞系は継代数が１５に達したところで再出発する。

【０５５０】

９｜形質移入用細胞の調製。本出願人らは、形質移入の１６～２４時間前に、十分に解離した細胞を２４ウェルプレートの抗生物質不含Ｄ１０培地にウェル当たり$1.3\times10^5$細胞の播種密度および５００ｕｌの播種容積でプレーティングした。必要に応じて製造者のマニュアルに従いスケールアップまたはスケールダウンする。推奨される密度より多い細胞をプレーティングすることは、そうすることによって形質移入効率が低下し得るため勧められない。

【０５５１】

１０｜形質移入当日、細胞は７０～９０％コンフルエンシーで最適である。細胞は、リポフェクタミン２０００またはＡｍａｘａ　ＳＦ細胞系Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒキットで製造者のプロトコルに従い形質移入し得る。

【０５５２】

（Ａ）ＰＸ３３０にクローニングされるｓｇＲＮＡについては、本出願人らは５００ｎｇの配列検証したＣＲＩＳＰＲプラスミドを形質移入した；２つ以上のプラスミドを形質移入する場合、等モル比および合計５００ｎｇ以下で混合する。

【０５５３】
（Ｂ）ＰＣＲによって増幅するｓｇＲＮＡについては、本出願人らは以下を混合した：
【０５５４】
【表４３】

| | |
|---|---|
| PX165 (Cas9 のみ) | 200 ng |
| sgRNA アンプリコン(各) | 40 ng |
| pUC19 | 総 DNA が 500 ng になるまで補充 |

【０５５５】
本出願人らは、信頼のおける定量化のため技術的トリプリケートで形質移入することおよび形質移入対照（例えばＧＦＰプラスミド）を入れて形質移入効率をモニタすることを推奨する。加えて、下流機能アッセイの陰性対照としてＰＸ３３０クローニングプラスミドおよび／またはｓｇＲＮＡアンプリコンを単独で形質移入してもよい。
【０５５６】
１１｜本出願人らはリポフェクタミン複合体を細胞に添加し、ここでＨＥＫ２９３ＦＴ細胞はプレートから容易に剥がれ易く、形質移入効率の低下がもたらされ得るため、穏やかに添加した。
【０５５７】
１２｜本出願人らは、蛍光顕微鏡を使用して対照（例えばＧＦＰ）形質移入における蛍光細胞の割合を推定することにより、形質移入後２４時間の細胞の効率を調べた。典型的には７０％を超える細胞が形質移入される。
【０５５８】
１３｜本出願人らは、培養培地にさらに５００ｕｌの温Ｄ１０培地を補給した。細胞が容易に剥がれ得るため、Ｄ１０はウェルの側面に極めてゆっくりと加え、低温の培地は使用しないこと。
【０５５９】
１４｜細胞は形質移入後合計４８～７２時間インキュベートしてからインデル分析のため回収する。４８時間以降はインデル効率の著しい増加はない。
【０５６０】
（任意選択）ＨＲ用のＣＲＩＳＰＲプラスミドとｓｓＯＤＮまたはターゲティングプラスミドとの同時形質移入・タイミング３～４日
１５｜ターゲティングプラスミドを線状化する。ターゲティングベクターは、可能な場合には、相同性アームの一方の近傍またはいずれかの相同性アームの遠位端におけるベクター骨格中の制限部位で１回切断することにより線状化する。
【０５６１】
１６｜本出願人らは、少量の線状化プラスミドを切断されていないプラスミドと共に０．８～１％アガロースゲル上で泳動させて、線状化の成功を確認した。線状化プラスミドはスーパーコイルプラスミドより上に泳動するはずである。
【０５６２】
１７｜本出願人らはＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットで線状化プラスミドを精製した。
【０５６３】
１８｜形質移入用の細胞を調製する。本出願人らはＴ７５またはＴ２２５フラスコでＨＥＫ２９３ＦＴを培養した。形質移入当日までに十分な細胞数が計画される。Ａｍａｘａストリップキュベットフォーマットには、形質移入当たり$2\times10^{6}$細胞が使用される。
【０５６４】
１９｜形質移入用のプレートを調製する。本出願人らは１２ウェルプレートの各ウェルに１ｍｌの温Ｄ１０培地を添加した。プレートはインキュベーターに置かれ、培地が温か

いまま保たれる。

【０５６５】

２０｜ヌクレオフェクション。本出願人らは、以下のステップに適合させて、Ａｍａｘａ　ＳＦ細胞系Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　４Ｄキットの製造者の指示に従いＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を形質移入した。

【０５６６】

ａ．ｓｓＯＤＮとＣＲＩＳＰＲとの同時形質移入については、ＰＣＲチューブに以下のＤＮＡを予め混合する：

【０５６７】

【表４４】

| | |
|---|---|
| pCRISPR プラスミド (Cas9 + sgRNA) | 500 ng |
| ssODN テンプレート (10uM) | 1 ul |

【０５６８】

ｂ．ＨＤＲターゲティングプラスミドとＣＲＩＳＰＲとの同時形質移入については、ＰＣＲチューブに以下のＤＮＡを予め混合する：

【０５６９】

【表４５】

| | |
|---|---|
| CRISPR プラスミド (Cas9 + sgRNA) | 500 ng |
| 線状化したターゲティングプラスミド | 500 ng |

【０５７０】

ｓｓＯＤＮまたはターゲティングプラスミドを単独で形質移入することを推奨する。

【０５７１】

２１｜単一細胞に解離する。本出願人らは培地を取り出し、細胞を押し退けないよう注意しながらＤＰＢＳで１回穏やかにリンスした。２ｍｌのＴｒｙｐＬＥをＴ７５フラスコに添加し、３７℃で５分間インキュベートする。１０ｍｌの温Ｄ１０培地を添加して失活させ、５０ｍｌ　Ｆａｌｃｏｎチューブにおいて穏やかに粉砕する。細胞は穏やかに粉砕して単一細胞に解離することが推奨される。大きい凝集塊は形質移入効率を低下させ得る。本出願人らは懸濁液から１０ｕｌアリコートを取り、カウントのため９０ｕｌのＤ１０培地に希釈した。本出願人らは細胞をカウントし、形質移入に必要な細胞数および懸濁液の容積を計算した。本出願人らは、典型的にはＡｍａｘａ　Ｎｕｃｌｅｏｃｕｖｅｔｔｅストリップを使用して条件当たり２×１０$^{5}$細胞を形質移入したとともに、後続のピペッティングステップでの容積損失を調整するため所要数より２０％多い細胞を計算することを推奨する。必要な容積を新しいＦａｌｃｏｎチューブに移す。

【０５７２】

２３｜本出願人らはこの新しいチューブを２００×ｇで５分間スピンダウンした。

【０５７３】

本出願人らは、ＳＦ溶液とＳ１サプリメントとをＡｍａｘａが推奨するとおり混合して形質移入溶液を調製した。Ａｍａｘａストリップキュベットについては、形質移入当たり合計２０ｕｌの補給ＳＦ溶液が必要である。同様に、本出願人らは、所要量より２０％多い容積を計算することを推奨する。

【０５７４】

２５｜本出願人らは、ステップ２３のペレット化した細胞から培地を完全に取り除き、適切な容積（２×１０$^{5}$細胞当たり２０ｕｌ）のＳ１補給ＳＦ溶液に穏やかに再懸濁した。細胞をＳＦ溶液中に長時間置いたままにしないこと。

【０５７５】

２６｜２０ｕｌの再懸濁した細胞をステップ２０の各ＤＮＡプレミックスにピペッティ

ングする。穏やかにピペッティングして混合し、Ｎｕｃｌｅｏｃｕｖｅｔｔｅストリップチャンバに移す。これを形質移入条件毎に繰り返す。

【０５７６】

Ａｍａｘａが推奨するＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　４Ｄプログラム　ＣＭ－１３０を使用して細胞をエレクトロポレートする。

【０５７７】

２８｜本出願人らは、１００ｕｌの温Ｄ１０培地を各Ｎｕｃｌｅｏｃｕｖｅｔｔｅストリップチャンバに穏やかにかつゆっくりとピペッティングし、全容積をステップ１９の予め温めたプレートに移す。重要。この段階で細胞は極めて脆弱であり、苛酷なピペッティングは細胞死を引き起こし得る。２４時間インキュベートする。この時点で、陽性形質移入対照における蛍光細胞の割合から形質移入効率を推定することができる。ヌクレオフェクションは、典型的には７０～８０％より高い形質移入効率をもたらす。本出願人らは、各ウェルに１ｍｌの温Ｄ１０培地を、細胞を押し退けないようにしてゆっくりと添加した。細胞を合計７２時間インキュベートする。

【０５７８】

ヒト胚性幹細胞（ＨＵＥＳ　９）培養および形質移入・タイミング３～４日

ｈＥＳＣ（ＨＵＥＳ９）株の維持。本出願人らはＨＵＥＳ９細胞系をｍＴｅＳＲ１培地による無フィーダー条件に常法で維持する。本出願人らは、基本培地と同梱の５×サプリメントおよび１００ｕｇ／ｍｌ　Ｎｏｒｍｏｃｉｎを添加することによりｍＴｅＳＲ１培地を調製した。本出願人らは、１０ｕＭ　Ｒｏｃｋ阻害薬をさらに補給したｍＴｅＳＲ１培地の１０ｍｌアリコートを調製した。組織培養プレートをコーティングする。冷ＧｅｌＴｒｅｘを冷ＤＭＥＭに１：１００希釈し、１００ｍｍ組織培養プレートの表面全体をコーティングする。

【０５７９】

プレートをインキュベーターに３７℃で少なくとも３０分間置く。細胞のバイアルを１５ｍｌ　Ｆａｌｃｏｎチューブにおいて３７℃で解凍し、５ｍｌのｍＴｅＳＲ１培地を添加し、および２００×ｇで５分間ペレット化する。ＧｅｌＴｒｅｘコーティングを吸い取り、Ｒｏｃｋ阻害薬を含有する１０ｍｌ　ｍＴｅＳＲ１培地に約$1\times10^{6}$細胞を播種する。形質移入後２４時間で通常のｍＴｅＳＲ１培地に交換し、毎日リフィードする。細胞を継代する。細胞に新鮮なｍＴｅＳＲ１培地を毎日リフィードし、７０％のコンフルエンシーに達するまで継代する。ｍＴｅＳＲ１培地を吸い取り、細胞をＤＰＢＳで１回洗浄する。２ｍｌのＡｃｃｕｔａｓｅを添加して３７℃で３～５分間インキュベートすることにより細胞を解離する。１０ｍｌ　ｍＴｅＳＲ１培地を添加して細胞を剥がし、１５ｍｌ　Ｆａｌｃｏｎチューブに移して穏やかに再懸濁する。ＧｅｌＴｒｅｘをコーティングしたプレートの１０ｕＭ　Ｒｏｃｋ阻害薬含有ｍＴｅＳＲ１培地に改めてプレーティングする。プレーティング後２４時間で通常のｍＴｅＳＲ１培地に交換する。

【０５８０】

形質移入。本出願人らは、解凍後少なくとも１週間細胞を培養した後にＡｍａｘａ　Ｐ３初代細胞４－Ｄ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒキット（Ｌｏｎｚａ）を使用して形質移入することを推奨する。対数期増殖細胞に新鮮培地を２時間リフィードした後形質移入する。ａｃｃｕｔａｓｅで単一細胞または１０細胞以下の小さいクラスターに解離し、穏やかに再懸濁する。ヌクレオフェクションに必要な細胞の数をカウントし、２００×ｇで５分間スピンダウンする。培地を完全に取り除き、推奨される容積のＳ１補給Ｐ３ヌクレオフェクション溶液に再懸濁する。１×Ｒｏｃｋ阻害薬の存在下で、コーティングされたプレートにエレクトロポレートした細胞を穏やかにプレーティングする。

【０５８１】

形質移入の成功を確かめ、通常のｍＴｅＳＲ１培地を毎日、ヌクレオフェクション後２４時間目から始めてリフィードする。典型的には、本出願人らはＡｍａｘａヌクレオフェクションで７０％より高い形質移入効率を観察する。ＤＮＡを回収する。形質移入後４８～７２時間でａｃｃｕｔａｓｅを使用して細胞を解離し、５倍容積のｍＴｅＳＲ１を添加

することにより失活させる。細胞を２００×ｇで５分間スピンダウンする。ペレット化した細胞はＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ溶液によるＤＮＡ抽出用に直接処理することができる。細胞をａｃｃｕｔａｓｅを用いずに機械的に解離することは推奨されない。ａｃｃｕｔａｓｅを失活させずにまたは推奨速度より高速で細胞をスピンダウンすることは推奨されない；それを行うと細胞の溶解が引き起こされ得る。

【０５８２】

ＦＡＣＳによるクローン細胞系の単離。タイミング・２～３時間ハンズオン；２～３週間拡大

形質移入後２４時間でＦＡＣＳによるかまたは段階希釈によりクローン単離を実施し得る。

【０５８３】

５４｜ＦＡＣＳ緩衝液を調製する。有色の蛍光を使用して選別する必要のない細胞は、１×ペニシリン／ストレプトマイシン（ｓｔｒｅｐｔｉｎｏｍｙｃｉｎ）を補給した通常のＤ１０培地で選別し得る。有色の蛍光選別もまた必要である場合、フェノール不含ＤＭＥＭまたはＤＰＢＳが通常のＤＭＥＭに代用される。１×ペニシリン／ストレプトマイシン（ｓｔｒｅｐｔｉｎｏｍｙｃｉｎ）を補給し、０．２２ｕｍ　Ｓｔｅｒｉｆｌｉｐフィルターでろ過する。

【０５８４】

５５｜９６ウェルプレートを調製する。本出願人らは、各ウェルにつき１×ペニシリン／ストレプトマイシン（ｓｔｒｅｐｔｉｎｏｍｙｃｉｎ）を補給した１００ｕｌのＤ１０培地を添加し、所望の数のクローンに必要なとおりのプレート数を調製した。

【０５８５】

５６｜ＦＡＣＳ用の細胞を調製する。本出願人らは培地を完全に吸い取り、２４ウェルプレートのウェル当たり１００ｕｌ　ＴｒｙｐＬＥを添加することにより、細胞を解離した。５分間インキュベートし、４００ｕｌの温Ｄ１０培地を添加した。

【０５８６】

５７｜再懸濁した細胞を１５ｍｌ　Ｆａｌｃｏｎチューブに移し、２０回穏やかに粉砕する。確実に単一細胞に解離したことを顕微鏡下で確かめることが推奨される。

【０５８７】

５８｜細胞を２００×ｇで５分間スピンダウンする。

【０５８８】

５９｜本出願人らは培地を吸引し、細胞を２００ｕｌのＦＡＣＳ培地に再懸濁した。

【０５８９】

６０｜細胞を３５ｕｍメッシュフィルターでろ過し、ラベルを付したＦＡＣＳチューブに入れる。本出願人らは、ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ細胞ストレーナーキャップ付き１２×７５ｍｍチューブを使用することを推奨する。選別時まで細胞を氷上に置く。

【０５９０】

６１｜本出願人らは単一細胞を、ステップ５５で調製した９６ウェルプレートに選別した。本出願人らは、各プレート上の一つの単一の指定されたウェルに１００細胞を陽性対照として選別することを推奨する。

【０５９１】

注。残りの細胞をとっておき、集団レベルでの遺伝子タイピングに使用して全体的な改変効率を評価し得る。

【０５９２】

６２｜本出願人らは細胞をインキュベーターに戻して２～３週間拡大させた。選別後５日で１００ｕｌの温Ｄ１０培地を添加する。必要に応じて３～５日おきに１００ｕｌの培地を交換する。

【０５９３】

６３｜選別後１週間でコロニーの「クローンのような」外観、すなわち中心点から放射状に広がる丸いコロニーについて調べる。空のウェル、またはダブレットまたはマルチプ

レットが播種された可能性のあるウェルに印を付ける。
【０５９４】
６４｜細胞が６０％を上回ってコンフルエントになったとき、本出願人らは、継代用に一組のレプリカ平板を調製した。レプリカ平板の各ウェルに１００ｕｌのＤ１０培地を添加する。本出願人らは上下に激しく２０回ピペッティングすることにより細胞を直接解離した。調製したレプリカ平板に再懸濁容積の２０％をプレーティングしてクローン株を維持した。その後培地を２～３日おきに交換し、それに従い継代する。
【０５９５】
６５｜残りの８０％の細胞はＤＮＡ単離および遺伝子タイピングに使用する。
【０５９６】
任意選択：希釈によるクローン細胞系の単離。タイミング・２～３時間ハンズオン；２～３週間拡大
６６｜本出願人らは上記に記載したとおり２４ウェルプレートから細胞を解離した。確実に単一細胞に解離する。細胞ストレーナーを使用して細胞の凝集を防ぐことができる。
【０５９７】
６７｜条件毎に細胞の数をカウントする。各条件を１００ｕｌ当たり０．５細胞の最終濃度となるようにＤ１０培地に段階稀釈する。各９６ウェルプレートについて、本出願人らは、１２ｍｌのＤ１０中６０細胞の最終カウントとなるように希釈することを推奨する。適切なクローン希釈のため細胞数を正確にカウントすることが推奨される。正確を期すため細胞を段階希釈の中間段階で再度カウントしてもよい。
【０５９８】
６８｜マルチチャンネルピペットを使用して１００ｕｌの希釈細胞を９６ウェルプレートの各ウェルにピペッティングした。
【０５９９】
注。残りの細胞をとっておき、集団レベルでの遺伝子タイピングに使用して全体的な改変効率を評価し得る。
【０６００】
６９｜本出願人らは、プレーティング後約１週間でコロニーの「クローンのような」外観、すなわち中心点から放射状に広がる丸いコロニーについて調べた。ダブレットまたはマルチプレットが播種された可能性のあるウェルに印を付ける。
【０６０１】
７０｜本出願人らは細胞をインキュベーターに戻して２～３週間拡大させた。前節に詳説したとおり必要に応じて細胞にリフィードする。
【０６０２】
ＣＲＩＳＰＲ開裂効率のＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイ。タイミング・５～６時間
形質移入細胞の開裂効率をアッセイする前に、本出願人らは、以下に記載するプロトコルを使用するＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼ消化のステップにより陰性（形質移入されていない）対照試料でそれぞれの新規ＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーを試験することを推奨する。時折、シングルバンドのクリーンなＳＵＲＶＥＹＯＲ　ＰＣＲ産物であっても非特異的ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼ開裂バンドを生じ、正確なインデル分析を妨げる可能性がある。
【０６０３】
７１｜ＤＮＡ用の細胞を回収する。細胞を解離し、２００×ｇで５分間スピンダウンする。注。形質移入細胞系をとっておく必要に応じてこの段階でレプリカ平板を作製する。
【０６０４】
７２｜上清を完全に吸引する。
【０６０５】
７３｜本出願人らはＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ　ＤＮＡ抽出溶液を製造者の指示に従い使用した。本出願人らは典型的には２４ウェルプレートの各ウェルに５０ｕｌの溶液を使用し、および９６ウェルプレートについては１０ｕｌを使用した。

【０６０６】
７４｜本出願人らは抽出ＤＮＡをｄｄＨ２Ｏで１００～２００ｎｇ／ｕｌの最終濃度となるように標準化した。休題：抽出ＤＮＡは－２０℃で数ヶ月間保存しておくことができる。
【０６０７】
７５｜ＳＵＲＶＥＹＯＲ　ＰＣＲをセットアップする。本出願人らのオンライン／コンピュータアルゴリズムツールによって提供されるＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーを使用して以下をマスターミックスする：
【０６０８】
【表４６】

| 成分: | 量 (ul) | 最終濃度 |
|---|---|---|
| Herculase II PCR 緩衝液, 5X | 10 | 1X |
| dNTP, 100mM (各 25mM) | 1 | 1 mM |
| SURVEYOR フォワードプライマー (10uM) | 1 | 0.2 uM |
| SURVEYOR リバースプライマー (10uM) | 1 | 0.2 uM |
| Herculase II 融合ポリメラーゼ | 1 | |
| $MgCl_2$ (25mM) | 2 | 1 mM |
| 蒸留水 | 33 | |
| 合計 | 49 (各反応につき) | |

【０６０９】
７６｜本出願人らは、各反応について１００～２００ｎｇのステップ７４からの標準化ゲノムＤＮＡテンプレートを添加した。
【０６１０】
７７｜３０回以下の増幅サイクルに対し、以下のサイクル条件を使用してＰＣＲ反応を実施した：
【０６１１】
【表４７】

| サイクル数 | 変性 | アニーリング | 伸長 |
|---|---|---|---|
| 1 | 95°C, 2 分 | | |
| 2-31 | 95°C, 20 秒 | 60°C, 20 秒 | 72°C, 30 秒 |
| 32 | | | 72°C, 3 分 |

【０６１２】
７８｜本出願人らは２～５ｕｌのＰＣＲ産物を１％ゲル上で泳動させてシングルバンド産物を確認した。これらのＰＣＲ条件は多くのＳＵＲＶＥＹＯＲプライマー対で機能するように設計されているが、一部のプライマーは、テンプレート濃度、$MgCl_2$濃度、および／またはアニーリング温度を調整することによるさらなる最適化が必要になり得る。
【０６１３】
７９｜本出願人らはＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用してＰＣＲ反応物を精製し、溶離液を２０ｎｇ／ｕｌに標準化した。休題：精製したＰＣＲ産物は－２０℃で保存しておくことができる。

【０６１４】
８０｜ＤＮＡヘテロ二重鎖形成。アニーリング反応を以下のとおりセットアップした：
【０６１５】
【表４８】

| | |
|---|---|
| Taq PCR 緩衝液, 10X | 2 ul |
| 標準化 DNA (20 ng/ul) | 18 ul |
| 総容積 | 20 ul |

【０６１６】
８１｜以下の条件を用いて反応物をアニーリングする：
【０６１７】
【表４９】

| サイクル数 | 条件 |
|---|---|
| 1 | 95°C, 10 分 |
| 2 | 95°C-85°C, -2°C/秒 |
| 3 | 85°C, 1 分 |
| 4 | 85°C-75°C, -0.3°C/秒 |
| 5 | 75°C, 1 分 |
| 6 | 75°C-65°C, -0.3°C/秒 |
| 7 | 65°C, 1 分 |
| 8 | 65°C-55°C, -0.3°C/秒 |
| 9 | 55°C, 1 分 |
| 10 | 55°C-45°C, -0.3°C/秒 |
| 11 | 45°C, 1 分 |
| 12 | 45°C-35°C, -0.3°C/秒 |
| 13 | 35°C, 1 分 |
| 14 | 35°C-25°C, -0.3°C/秒 |
| 15 | 25°C, 1 分 |

【０６１８】
８２｜ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼＳ消化。本出願人らはマスターミックスを調製し、氷上で以下の成分を添加して、２５ｕｌの総最終容積についてステップ８１のヘテロ二本鎖をアニーリングした：
【０６１９】

【表５０】

| 成分 | 量 (ul) | 最終濃度 |
|---|---|---|
| $MgCl_2$ 溶液, 0.15M | 2.5 | 15mM |
| $ddH_2O$ | 0.5 | |
| SURVEYOR ヌクレアーゼ S | 1 | 1X |
| SURVEYOR エンハンサーS | 1 | 1X |
| 合計 | 5 | |

【０６２０】
８３｜十分にボルテックスし、スピンダウンする。反応物を４２℃で１時間インキュベートする。
【０６２１】
８４｜任意選択：ＳＵＲＶＥＹＯＲキットの停止液２ｕｌを添加してもよい。休題。消化産物は、後の分析のため－２０℃で保存しておくことができる。
【０６２２】
８５｜ＳＵＲＶＥＹＯＲ反応を可視化する。２％アガロースゲル上でＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼ消化産物を可視化し得る。分解能を良くするため、産物を４～２０％勾配ポリアクリルアミドＴＢＥゲル上で泳動させてもよい。本出願人らは推奨されるローディング緩衝液で１０ｕｌの産物をロードし、製造者の指示に従いゲルを泳動させた。典型的には、本出願人らはブロモフェノールブルー色素が移動してゲルの底に達するまで泳動させる。同じゲル上にＤＮＡラダーおよび陰性対照を含める。
【０６２３】
８６｜本出願人らは、ＴＢＥ中に希釈した１×ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ色素でゲルを染色した。ゲルを１５分間穏やかに揺り動かした。
【０６２４】
８７｜本出願人らは、バンドを過度に露光することなく定量的イメージングシステムを使用してゲルをイメージングした。陰性対照は、ＰＣＲ産物のサイズに対応する１つのバンドのみを有するはずであるが、時折、他のサイズの非特異的な開裂バンドを有し得る。これらは、標的の開裂バンドとサイズが異なる場合には分析を妨げない。本出願人らのオンライン／コンピュータアルゴリズムツールによって提供される標的開裂バンドのサイズの合計は、ＰＣＲ産物のサイズと等しいはずである。
【０６２５】
８８｜開裂強度を推定する。本出願人らはＩｍａｇｅＪまたは他のゲル定量化ソフトウェアを使用して各バンドの面積強度を定量化した。
【０６２６】
８９｜各レーンについて、本出願人らは、以下の式を使用して開裂されたＰＣＲ産物の割合（$f_{cut}$）を計算した：$f_{cut}$＝（ｂ＋ｃ）／（ａ＋ｂ＋ｃ）（式中、ａは消化されなかったＰＣＲ産物の面積強度であり、ｂおよびｃは各開裂産物の面積強度である）。９０｜開裂効率は、二重鎖形成の二項確率分布に基づき、以下の式を使用して推定し得る：
９１｜
【数１】

$$\text{インデル}(\%) = 100 \times \left(1 - \sqrt{(1 - f_{cut})}\right)$$

【０６２７】

ＣＲＩＳＰＲ開裂効率を評価するためのサンガーシーケンシング。タイミング・３日
最初のステップは、ＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイのステップ７１～７９と同じである。注：フォワードおよびリバースプライマーに適切な制限部位が付加される場合、サンガーシーケンシングにＳＵＲＶＥＹＯＲプライマーを用い得る。推奨されるｐＵＣ１９骨格へのクローニングに関しては、フォワードプライマーにＥｃｏＲＩおよびリバースプライマーにＨｉｎｄＩＩＩを用い得る。

【０６２８】

９２｜アンプリコン消化。消化反応を以下のとおりセットアップする：

【０６２９】

【表５１】

| 成分 | 量 (ul) |
|---|---|
| Fast Digest 緩衝液, 10X | 3 |
| FastDigest EcoRI | 1 |
| FastDigest HindIII | 1 |
| 標準化 DNA (20 ng/ul) | 10 |
| $ddH_2O$ | 15 |
| 総容積 | 30 |

【０６３０】

９３｜ｐＵＣ１９骨格消化。消化反応を以下のとおりセットアップする：

【０６３１】

【表５２】

| 成分 | 量 (ul) |
|---|---|
| Fast Digest 緩衝液, 10X | 3 |
| FastDigest EcoRI | 1 |
| FastDigest HindIII | 1 |
| FastAP アルカリホスファターゼ | 1 |
| pUC19 ベクター (200 ng/ul) | 5 |
| $ddH_2O$ | 20 |
| 総容積 | 30 |

【０６３２】

９４｜本出願人らは、ＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用して消化反応物を精製した。休題：精製したＰＣＲ産物は－２０℃で保存しておくことができる。

【０６３３】

９５｜本出願人らは、消化したｐＵＣ１９骨格およびサンガーアンプリコンを１：３のベクター：インサート比で以下のとおりライゲートした：

【０６３４】

【表５３】

| 成分 | 量 (ul) |
|---|---|
| 消化したpUC19 | x (50 ng) |
| 消化したインサート | x (1:3 ベクター:インサートモル比) |
| T7リガーゼ | 1 |
| 2X 迅速ライゲーション緩衝液 | 10 |
| $ddH_2O$ | x |
| 総容積 | 20 |

【０６３５】
９６｜形質転換。本出願人らは、細胞と共に供給されるプロトコルに従いＰｌａｓｍｉｄＳａｆｅ処理したプラスミドをコンピテント大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株に形質転換した。本出願人らは迅速な形質転換のためＳｔｂｌ３を推奨する。簡潔に言えば、５ｕｌのステップ９５の産物を２０ｕｌの氷冷化学コンピテントＳｔｂｌ３細胞に添加し、氷上で１０分間インキュベートし、４２℃で３０秒間熱ショックを与え、直ちに氷に２分間戻し、１００ｕｌのＳＯＣ培地を添加し、１００ｕｇ／ｍｌアンピシリンを含有するＬＢプレートにプレーティングする。これを３７℃で一晩インキュベートする。
【０６３６】
９７｜２日目：本出願人らはプレートのコロニー成長を調べた。典型的には、陰性対照プレート（ＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ消化ｐＵＣ１９のみのライゲーション、サンガーアンプリコンインサート無し）にはコロニーがなく、ｐＵＣ１９－サンガーアンプリコンクローニングプレートには数十個ないし数百個のコロニーがある。
【０６３７】
９８｜３日目：本出願人らは、ＱＩＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎミニプレップキットを製造者の指示に従い使用して、一晩培養物からプラスミドＤＮＡを単離した。
【０６３８】
９９｜サンガーシーケンシング。本出願人らは、ｐＵＣ１９骨格からｐＵＣ１９－フォワードプライマーを使用してシーケンシングすることにより各コロニーの配列を確かめた。本出願人らはシーケンシング結果を予想ゲノムＤＮＡ配列と照合し、Ｃａｓ９誘発性のＮＨＥＪ突然変異の存在を調べた。％編集効率＝（改変クローン数）／（総クローン数）。正確な改変効率を得るには、妥当な数のクローン（＞２４）を選ぶことが重要である。
【０６３９】
微小欠失のための遺伝子タイピング。タイミング・２～３日ハンズオン；２～３週間拡大
１００｜上記に記載したとおり、欠失させる領域を標的にするｓｇＲＮＡのペアを細胞に形質移入した。
【０６４０】
１０１｜形質移入後２４時間で、クローン株を上記に記載したとおりＦＡＣＳまたは段階希釈によって単離する。
【０６４１】
１０２｜細胞を２～３週間拡大させる。
【０６４２】
１０３｜本出願人らは上記に記載したとおり１０ｕｌ　ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ溶液を使用してクローン株からＤＮＡを回収し、ゲノムＤＮＡを５０～１００ｎｇ／ｕｌの最終濃度となるようにｄｄＨ$_2$Ｏで標準化した。
【０６４３】
１０４｜改変領域をＰＣＲ増幅する。ＰＣＲ反応を以下のとおりセットアップする：

【０６４４】
【表５４】

| 成分: | 量 (ul) | 最終濃度 |
|---|---|---|
| Herculase II PCR 緩衝液, 5X | 10 | 1X |
| dNTP, 100mM (各 25mM) | 1 | 1 mM |
| 外側フォワードプライマー (10uM) | 1 | 0.2 uM |
| 外側リバースプライマー (10uM) | 1 | 0.2 uM |
| Herculase II 融合ポリメラーゼ | 1 | |
| MgCl2 (25mM) | 2 | 1 mM |
| $ddH_2O$ | 32 | |
| 合計 | 48 (各反応につき) | |

【０６４５】
注：欠失サイズが１ｋｂより大きい場合、内側フォワードプライマーおよび内側リバースプライマーを含む並行する一組のＰＣＲ反応をセットアップし、野生型アレルの存在についてスクリーニングする。
【０６４６】
１０５｜逆位についてスクリーニングするため、ＰＣＲ反応を以下のとおりセットアップする：
【０６４７】
【表５５】

| 成分: | 量 (ul) | 最終濃度 |
|---|---|---|
| Herculase II PCR 緩衝液, 5X | 10 | 1X |
| dNTP, 100mM (各 25mM) | 1 | 1 mM |
| 外側フォワードまたは外側リバースプライマー (10uM) | 1 | 0.2 uM |
| 内側フォワードまたは内側リバースプライマー (10uM) | 1 | 0.2 uM |
| Herculase II 融合ポリメラーゼ | 1 | |
| $MgCl_2$ (25mM) | 2 | 1 mM |
| $ddH_2O$ | 32 | |
| 合計 | 48 (各反応につき) | |

【０６４８】
注：プライマーは、外側フォワード＋内側フォワード、または外側リバース＋内側リバースのいずれかとしてペアにされる。
【０６４９】
１０６｜本出願人らは、各反応について１００～２００ｎｇのステップ１０３の標準化ゲノムＤＮＡテンプレートを添加した。
【０６５０】
１０７｜以下のサイクル条件を使用してＰＣＲ反応を実施した：
【０６５１】

【表５６】

| サイクル数 | 変性 | アニーリング | 伸長 |
|---|---|---|---|
| 1 | 95°C, 2 分 | | |
| 2-31 | 95°C, 20 秒 | 60°C, 20 秒 | 72°C, 30 秒 |
| 32 | | | 72°C, 3 分 |

【０６５２】

１０８｜本出願人らは２～５ｕｌのＰＣＲ産物を１～２％ゲル上で泳動させて産物を確認した。これらのＰＣＲ条件は多くのプライマーで機能するように設計されるが、一部のプライマーは、テンプレート濃度、$MgCl_2$濃度、および／またはアニーリング温度を調整することによるさらなる最適化が必要となり得る。

【０６５３】

ＨＤＲによる標的改変のための遺伝子タイピング。タイミング・２～３日、２～３時間ハンズオン

１０９｜本出願人らは上記に記載したとおりＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ溶液を使用してＤＮＡを回収し、ゲノムＤＮＡを１００～２００ｎｇ／ｕｌの最終濃度となるようにＴＥで標準化した。

【０６５４】

１１０｜改変領域をＰＣＲ増幅する。ＰＣＲ反応を以下のとおりセットアップする：

【０６５５】

【表５７】

| 成分: | 量 (ul) | 最終濃度 |
|---|---|---|
| Herculase II PCR 緩衝液, 5X | 10 | 1X |
| dNTP, 100 mM (各 25 mM) | 1 | 1 mM |
| HDR フォワードプライマー (10 uM) | 1 | 0.2 uM |
| HDR リバースプライマー (10 uM) | 1 | 0.2 uM |
| Herculase II 融合ポリメラーゼ | 1 | |
| $MgCl_2$ (25mM) | 2 | 1 mM |
| $ddH_2O$ | 33 | |
| 合計 | 49 (各反応につき) | |

【０６５６】

１１１｜本出願人らは各反応について１００～２００ｎｇのステップ１０９のゲノムＤＮＡテンプレートを添加し、以下のプログラムを実行した。

【０６５７】

【表５８】

| サイクル数 | 変性 | アニーリング | 伸長 |
|---|---|---|---|
| 1 | 95°C, 2 分 | | |
| 2-31 | 95°C, 20 秒 | 60°C, 20 秒 | 72°C, *30-60 秒／kb* |
| 32 | | | 72°C, 3 分 |

【０６５８】
１１２｜本出願人らは５ｕｌのＰＣＲ産物を０．８～１％ゲル上で泳動させてシングルバンド産物を確認した。プライマーは、テンプレート濃度、ＭｇＣｌ$_2$濃度、および／またはアニーリング温度を調整することによるさらなる最適化が必要となり得る。
【０６５９】
１１３｜本出願人らはＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用してＰＣＲ反応物を精製した。
【０６６０】
１１４｜ＨＤＲの例では、ＥＭＸ１遺伝子にＨｉｎｄＩＩＩ制限部位が挿入される。これらはＰＣＲアンプリコンの制限酵素消化により検出される：
【０６６１】
【表５９】

| 成分 | 量 (ul) |
|---|---|
| 精製 PCR アンプリコン (200-300ng) | x |
| F.D. 緩衝液、緑色 | 1 |
| HindIII | 0.5 |
| ddH2O | x |
| 合計 | 10 |

【０６６２】
ｉ．ＤＮＡを３７℃で１０分間消化する：
【０６６３】
ｉｉ．本出願人らは、ローディング色素を含む１０ｕｌの消化産物を、４～２０％勾配ポリアクリルアミドＴＢＥゲル上でキシレンシアノールバンドが移動してゲルの底に達するまで泳動させた。
【０６６４】
ｉｉｉ．本出願人らは１５分間揺り動かしながら１×ＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ色素でゲルを染色した。
【０６６５】
ｉｖ．上記でＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイの節に記載したとおり開裂産物をイメージングして定量化する。ＨＤＲ効率は以下の式により推定される：（ｂ＋ｃ）／（ａ＋ｂ＋ｃ）（式中、ａは消化されなかったＨＤＲ　ＰＣＲ産物の面積強度であり、ｂおよびｃはＨｉｎｄＩＩＩ切断断片の面積強度である）。
【０６６６】
１１５｜あるいは、ステップ１１３の精製ＰＣＲアンプリコンをクローニングし、サンガーシーケンシングまたはＮＧＳを用いて遺伝子型を決定してもよい。
【０６６７】
ディープシーケンシングおよびオフターゲット分析・タイミング１～２日

オンラインＣＲＩＳＰＲ標的設計ツールは、同定された標的部位のそれぞれについて候補ゲノムオフターゲット部位を作成する。これらの部位でのオフターゲット分析は、ＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ、サンガーシーケンシング、または次世代ディープシーケンシングにより実施することができる。これらの部位の多くで改変率が低いまたは検出不能である可能性を考えると、本出願人らは、高感度および高精度のためのＩｌｌｕｍｉｎａ　Ｍｉｓｅｑプラットフォームによるディープシーケンシングを推奨する。プロトコルはシーケンシングプラットフォームによって異なり得る；ここで本出願人らは、シーケンシングアダプターをつなぎ合わせるための融合ＰＣＲ方法について簡単に記載する。

【０６６８】

１１６｜ディープシーケンシングプライマーを設計する。次世代シーケンシング（ＮＧＳ）プライマーは、典型的には１００～２００ｂｐサイズ範囲の、より短いアンプリコン向けに設計される。プライマーはＮＣＢＩプライマーＢｌａｓｔを使用して手動で設計されてもよく、またはオンラインＣＲＩＳＰＲ標的設計ツール（ｇｅｎｏｍｅ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．ｏｒｇ／ｔｏｏｌｓにあるウェブサイト）で生成されてもよい。

【０６６９】

１１７｜Ｃａｓ９標的細胞からゲノムＤＮＡを回収する。ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔゲノムＤＮＡをｄｄＨ２Ｏで１００～２００ｎｇ／ｕｌに標準化する。

【０６７０】

１１８｜初期ライブラリ調製ＰＣＲ。ステップ１１６のＮＧＳプライマーを使用して初期ライブラリ調製ＰＣＲを調製する。

【０６７１】

【表６０】

| 成分: | 量 (ul) | 最終濃度 |
|---|---|---|
| Herculase II PCR 緩衝液, 5X | 10 | 1X |
| dNTP, 100mM (各 25mM) | 1 | 1 mM |
| NGS フォワードプライマー (10uM) | 1 | 0.2 uM |
| NGS リバースプライマー (10uM) | 1 | 0.2 uM |
| Herculase II 融合ポリメラーゼ | 1 | |
| MgCl2 (25mM) | 2 | 1 mM |
| ddH2O | 33 | |
| 合計 | 49 (各反応につき) | |

【０６７２】

１１９｜各反応につき１００～２００ｎｇの標準化したゲノムＤＮＡテンプレートを加える。

【０６７３】

１２０｜２０回以下の増幅サイクルについて、以下のサイクル条件を使用してＰＣＲ反応を実施する：

【０６７４】

【表６１】

| サイクル数 | 変性 | アニーリング | 伸長 |
|---|---|---|---|
| 1 | 95°C, 2 分 | | |
| 2-21 | 95°C, 20 秒 | 60°C, 20 秒 | 72°C, 15 秒 |
| 22 | | | 72°C, 3 分 |

【０６７５】
１２１｜２～５ｕｌのＰＣＲ産物を１％ゲル上で泳動させてシングルバンド産物を確認する。あらゆるゲノムＤＮＡ　ＰＣＲと同様に、ＮＧＳプライマーは、テンプレート濃度、$MgCl_2$濃度、および／またはアニーリング温度を調整することによるさらなる最適化が必要となり得る。
【０６７６】
１２２｜ＰＣＲ反応物をＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用して精製し、溶離液を２０ｎｇ／ｕｌに標準化する。休題：精製したＰＣＲ産物は－２０℃で保存しておくことができる。
【０６７７】
１２３｜Ｎｅｘｔｅｒａ　ＸＴ　ＤＮＡ試料調製キット。製造者のプロトコルに従い、各試料に対するユニークバーコードでＭｉｓｅｑシーケンシング準備ライブラリを作成する。
【０６７８】
１２４｜シーケンシングデータを分析する。ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｇｅｎｅｉｏｕｓ、または単純な配列解析スクリプトなどのリードアラインメントプログラムにより、オフターゲット分析を実施し得る。
【０６７９】
タイミング
ステップ１～２　ｓｇＲＮＡオリゴおよびｓｓＯＤＮの設計および合成：１～５日、供給業者によって変動
ステップ３～５　ＣＲＩＳＰＲプラスミドまたはＰＣＲ発現カセットの構築：２時間～３日
ステップ６～５３　細胞系への形質移入：３日（１時間のハンズオン時間）
ステップ５４～７０　任意選択のクローン株誘導：１～３週間、細胞型によって変動
ステップ７１～９１　ＳＵＲＶＥＹＯＲによるＮＨＥＪの機能検証：５～６時間
ステップ９２～１２４　サンガー法または次世代ディープシーケンシングによる遺伝子タイピング：２～３日（３～４時間のハンズオン時間）
【０６８０】

【表６２】

**本明細書の実施例に関わる状況への対処**

| 状況 | 解決法 |
|---|---|
| sgRNA の増幅がない | U6-テンプレート濃度をタイトレートする |
| SURVEYOR または HDR PCR が汚いまたは増幅なし | MgCl2 をタイトレートする; テンプレート濃度を標準化およびタイトレートする; アニーリング温度勾配; プライマーを再設計する |
| 微小欠失 PCR における アレルのむらのある増幅 | 別の PCR をセットアップして野生型および欠失アレルを検出する; 同程度のサイズのアンプリコンでプライマーを再設計する |
| 陰性対照プレート上の コロニー | *Bbs*I を増加させる; Golden Gate 反応サイクル数を増加させる, Antarctic ホスフェート処理で PX330 を別個に切断する |
| sgRNA 配列がない、または 誤った配列 | さらなるコロニーをスクリーニングする |
| リポフェクタミントランスフェクション効率が低い | 細胞の健康状態および密度を確認する; DNA をタイトレートする; GFP トランスフェクション対照を加える |
| ヌクレオフェクショントランスフェクション効率が低い | 細胞の健康状態および密度を確認する; DNA をタイトレートする; 単一細胞に懸濁する |
| FACS 後の凝集塊または 細胞なし | FACS 前に細胞を選別する; 単一細胞に解離する; 適切な密度に再懸濁する |
| 段階希釈における凝集塊または細胞なし | 細胞を再カウントする; 単一細胞に解離してストレーナーで選別する; 段階希釈を確かめる |
| 陰性試料で SURVEYOR バックグラウンドが高い | 別の位置からプライミングするようにプライマーを再設計する |
| ゲル上の SURVEYOR 結果が汚い | PCR 産物を精製する; 入力 DNA を減らす; 42°C インキュベーションを 30 分間に短縮する |
| SURVEYOR 開裂がない | PCR 産物を精製して標準化する; TaqB 緩衝液で再アニーリングする; sgRNA を再設計する; 配列について px330 骨格上の Cas9 を確認する |
| 試料が TBE アクリルアミドゲルに沈まない | 15mM の最終濃度となるように MgCl2 を補足するかまたはグリセロールを含むローディング緩衝液を加える |

【０６８１】

考察

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓは容易に多重化し得るため、いくつかの遺伝子の同時改変が促進され、かつ高効率で染色体微小欠失が媒介される。本出願人らは２つのｓｇＲＮＡを使用することにより、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞において最大６８％の効率でのヒトＧＲＩＮ２ＢおよびＤＹＲＫ１Ａ遺伝子座の同時標的化を実証した。同様に、ｓｇＲＮＡのペアを使用することによりエクソンの切り出しなどの微小欠失を媒介することができ、これはクローンレベルでＰＣＲにより遺伝子型決定され得る。エクソン接合部の正確な位置は異なり得ることに留意されたい。本出願人らはまた、ｓｓＯＤＮおよびターゲティングベクターを使用したＨＥＫ　２９３ＦＴ細胞およびＨＵＥＳ９細胞におけるＣａｓ９の野生型およびニッカーゼ突然変異体の両方によるＨＤＲの媒介も実証した（図１２）。本出願人らはＣａｓ９ニッカーゼを使用したＨＵＥＳ９細胞でのＨＤＲを検出できていないことに留意されたく、これはＨＵＥＳ９細胞における修復活性の低い効率または潜在的な違いに起因し得る。これらの値は典型的であるが、所与のｓｇＲＮＡの開裂効率にはいくらかのばらつきがあり、まれにある種のｓｇＲＮＡは、未だ解明されていない理由により機能しないこともある。本出願人らは、各遺伝子座につき２つのｓｇＲＮＡを設計し、かつ意図される

細胞型におけるそれらの効率を試験することを推奨する。

【０６８２】

実施例２６：ＮＬＳ

Ｃａｓ９転写モジュレーター：本出願人らは、Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ　ＣＲＩＳＰＲ系を、ＤＮＡ開裂の域を越える機能が遂行され得る汎用ＤＮＡ結合システムに転換しようと試みた。例えば、１つまたは複数の機能ドメインを触媒的に不活性なＣａｓ９と融合することにより、本出願人らは新規機能、例えば転写活性化／抑制、メチル化／脱メチル化、またはクロマチン改変を付与している。この目標を達成するため、本出願人らは、ヌクレアーゼ活性に必須の２つの残基Ｄ１０およびＨ８４０をアラニンに変えることにより、触媒的に不活性なＣａｓ９突然変異体を作製した。これらの２つの残基を突然変異させることにより、Ｃａｓ９のヌクレアーゼ活性を消失させ、一方で標的ＤＮＡとの結合能は維持する。本出願人らが自らの仮説を検証するため着目することに決めた機能ドメインは、転写活性化因子ＶＰ６４ならびに転写リプレッサーＳＩＤおよびＫＲＡＢである。

【０６８３】

Ｃａｓ９核局在：本出願人らは、最も有効なＣａｓ９転写モジュレーターが、転写に対してその最も大きい影響を及ぼし得るところである核に強力に局在し得るという仮説を立てた。さらに、細胞質内に残る任意のＣａｓ９が望ましくない効果を有する可能性がある。本出願人らは、野生型Ｃａｓ９が核に局在せず、複数の核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含まないことを決定した（ＣＲＩＳＰＲ系が１つ以上のＮＬＳを有する必要はないが、有利には少なくとも１つ以上のＮＬＳを有する）。複数のＮＬＳ配列が必要であったため、Ｃａｓ９を核に入れるのが困難であることは妥当であったとともに、Ｃａｓ９と融合する任意のさらなるドメインが核局在を破壊する可能性があった。従って、本出願人らは、異なるＮＬＳ配列（ｐＸＲＰ０２－ｐＬｅｎｔｉ２－ＥＦ１ａ－ＮＬＳ－ｈＳｐＣｓｎ１（１０Ａ，８４０Ａ）－ＮＬＳ－ＶＰ６４－ＥＧＦＰ、ｐＸＲＰ０４－ｐＬｅｎｔｉ２－ＥＦ１ａ－ＮＬＳ－ｈＳｐＣｓｎ１（１０Ａ，８４０Ａ）－ＮＬＳ－ＶＰ６４－２Ａ－ＥＧＦＰ－ＮＬＳ、ｐＸＲＰ０６－ｐＬｅｎｔｉ２－ＥＦ１ａ－ＮＬＳ－ＥＧＦＰ－ＶＰ６４－ＮＬＳ－ｈＳｐＣｓｎ１（１０Ａ，８４０Ａ）－ＮＬＳ、ｐＸＲＰ０８－ｐＬｅｎｔｉ２－ＥＦ１ａ－ＮＬＳ－ＶＰ６４－ＮＬＳ－ｈＳｐＣｓｎ１（１０Ａ，８４０Ａ）－ＮＬＳ－ＶＰ６４－ＥＧＦＰ－ＮＬＳ）を有する４つのＣａｓ９－ＶＰ６４－ＧＦＰ融合構築物を作製した。これらの構築物をヒトＥＦ１ａプロモーターの発現下にあるレンチ骨格にクローニングした。よりロバストなタンパク質発現のため、ＷＰＲＥエレメントもまた加えた。各構築物を、リポフェクタミン２０００（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｅ　２０００）を使用してＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に形質移入し、形質移入後２４時間でイメージングした。融合タンパク質が融合タンパク質のＮ末端およびＣ末端の両方にＮＬＳ配列を有するとき、最良の核局在が得られる。観察された最も高い核局在は、４つのＮＬＳエレメントを有する構築物で起こった。

【０６８４】

Ｃａｓ９に対するＮＬＳエレメントの影響をさらに確実に理解するため、本出願人らは同じαインポーチンＮＬＳ配列を、０～３個のタンデムリピートを見てＮ末端またはＣ末端のいずれかに付加することにより、１６個のＣａｓ９－ＧＦＰ融合物を作製した。各構築物を、リポフェクタミン２０００（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｅ　２０００）を使用してＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に形質移入し、形質移入後２４時間でイメージングした。顕著なことに、ＮＬＳエレメントの数は核局在の程度と直接相関しない。Ｃ末端にＮＬＳを付加する方が、Ｎ末端への付加と比べて核局在により大きい影響を及ぼす。

【０６８５】

Ｃａｓ９転写活性化因子：本出願人らは、Ｓｏｘ２遺伝子座を標的にしてＲＴ－ｑＰＣＲで転写活性化を定量化することにより、Ｃａｓ９－ＶＰ６４タンパク質の機能試験を行った。Ｓｏｘ２のプロモーターに跨るように８個のＤＮＡ標的部位を選択した。各構築物を、リポフェクタミン２０００（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｅ　２０００）を使用してＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に形質移入し、形質移入後７２時間で細胞から全ＲＮＡを抽出した。１ｕ

ｇのＲＮＡを４０ｕｌ反応物でｃＤＮＡに逆転写した（ｑＳｃｒｉｐｔ　Ｓｕｐｅｒｍｉｘ）。単一の２０ｕｌ　ＴａｑＭａｎアッセイｑＰＣＲ反応に２ｕｌの反応産物を加えた。各実験は生物学的および技術的トリプリケートで実施した。ＲＴ対照反応およびテンプレート対照反応はいずれも増幅を示さなかった。強力な核局在を示さない構築物ｐＸＲＰ０２およびｐＸＲＰ０４は、活性化が起こらない。実に強力な核局在を示した構築物、ｐＸＲＰ０８については、中程度の活性化が観察された。ガイドＲＮＡＳｏｘ２．４およびＳｏｘ２．５の場合に統計的に有意な活性化が観察された。

【０６８６】

実施例２７：インビボマウスデータ

材料および試薬

Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ融合ポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号６００６７９）

１０×　ＮＥ緩衝液　４（ＮＥＢ、カタログ番号Ｂ７００４Ｓ）

ＢｓａＩ　ＨＦ（ＮＥＢ、カタログ番号Ｒ３５３５Ｓ）

Ｔ７　ＤＮＡリガーゼ（Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ、カタログ番号Ｌ６０２Ｌ）

Ｆａｓｔ　Ｄｉｇｅｓｔ緩衝液、１０×（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ｂ６４）

ＦａｓｔＤｉｇｅｓｔ　ＮｏｔＩ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＦＤ０５９４）

ＦａｓｔＡＰアルカリホスファターゼ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＥＦ０６５１）

リポフェクタミン２０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１１６６８－０１９）

トリプシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１５４０００５４）

鉗子＃４（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｚ１６８７７７－１ＥＡ）

鉗子＃５（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｆ６５２１－１ＥＡ）

１０×　ハンクス平衡塩類溶液（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｈ４６４１－５００ＭＬ）

ペニシリン／ストレプトマイシン溶液（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｐ４３３３）

Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号２１１０３０４９）

Ｂ２７サプリメント（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１７５０４０４４）

Ｌ－グルタミン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号２５０３００８１）

グルタミン酸塩（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号ＲＥＳ５０６３Ｇ－Ａ７）

β－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｍ６２５０－１００ＭＬ）

ＨＡウサギ抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、カタログ番号３７２４Ｓ）

ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）細胞イメージングキット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｒ３７６０１）

３０Ｇ　Ｗｏｒｌｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔシリンジ（Ｗｏｒｌｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、カタログ番号ＮＡＮＯＦＩＬ）

定位固定装置（Ｋｏｐｆ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）

ＵｌｔｒａＭｉｃｒｏＰｕｍｐ３（Ｗｏｒｌｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、カタログ番号ＵＭＰ３－４）

スクロース（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｓ７９０３）

塩化カルシウム（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｃ１０１６）

酢酸マグネシウム（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｍ０６３１）

トリス－ＨＣｌ（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｔ５９４１）

ＥＤＴＡ（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｅ６７５８）

ＮＰ－４０（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号ＮＰ４０）
フェニルメタンスルホニルフルオリド（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号７８８３０）
塩化マグネシウム（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｍ８２６６）
塩化カリウム（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｐ９３３３）
β－グリセロリン酸（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｇ９４２２）
グリセロール（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｇ９０１２）
Ｖｙｂｒａｎｔ（登録商標）ＤｙｅＣｙｃｌｅ（商標）Ｒｕｂｙ染色（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｓ４９４２）
ＦＡＣＳ　Ａｒｉａ　Ｆｌｕ－ａｃｔ－細胞選別機（Ｋｏｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　ＭＩＴ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、米国）
ＤＮＡｅａｓｙ血液および組織キット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号６９５０４）

【０６８７】

手順

インビボで脳において使用されるｇＲＮＡ多重体の構築

本出願人らは、マウスＴＥＴおよびＤＮＭＴファミリーメンバーを標的にする単一のｇＲＮＡを設計し、ＰＣＲ増幅した（本明細書に記載されるとおり）。標的化効率をＮ２ａ細胞系で評価した（図１５）。インビボでいくつかの遺伝子の同時改変を達成するため、効率的なｇＲＮＡをＡＡＶパッケージングベクターに多重化した（図１６）。系の効率のさらなる分析を促進するため、本出願人らは、ヒトシナプシンＩプロモーターの制御下にあるＧＦＰ－ＫＡＳＨドメイン融合タンパク質からなる発現カセットを系に加えた（図１６）。この改変により、ニューロン集団における系の効率のさらなる分析が可能になる（さらに詳細な手順は「核の選別およびインビボ結果」の節にある）。

【０６８８】

系の４つ全てのパーツを、Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ融合ポリメラーゼを使用し、以下のプライマーを使用してＰＣＲ増幅した：

【化２６】

第1のU6フォワード:

gagggtctcgtccttgcggccgctagcgagggcctatttcccatgattc

第1のgRNAリバース:

ctcggtctcggtAAAAAAgcaccgactcggtgccacttttttcaagttgataacggactagc
cttattttaacttgctaTTTCtagctctaaaacNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGTGTTTC
GTCCTTTCCAC

第2のU6フォワード:

gagggtctcTTTaccggtgagggcctatttcccatgattcc

第2のgRNAリバース:

ctcggtctcctcAAAAAAgcaccgactcggtgccacttttttcaagttgataacggacta
gc cttattttaacttgctaTTTCtagctctaaaacNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGTGTTTC
GTCCTTTCCAC

第3のU6フォワード:

gagggtctcTTTgagctcgagggcctatttcccatgattc

第3のgRNAリバース:

ctcggtctcgcgtAAAAAAgcaccgactcggtgccacttttttcaagttgataacggact
ag ccttattttaacttgctaTTTCtagctctaaaacNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGTGTTT
CGTCCTTTCCA

hSyn_GFP-kashフォワード: gagggtctcTTacgcgtgtgtctagac

hSyn_GFP-kashリバース:

ctcggtctcAaggaCAGGGAAGGGAGCAGTGGTTCACGCCTGTAATCCCAGCAATTTGG
GA GGCCAAGGTGGGTAGATCACCTGAGATTAGGAGTTGC

（ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮは、標的ゲノム配列の逆相補体である。）

【０６８９】

本出願人らは、Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ戦略を用いて単一ステップ反応で系の全てのパーツを組み立てた（１：１分子比）：

【０６９０】

【表６３】

| | |
|---|---|
| 第１のU6_gRNA | 18 ng |
| 第２のU6_gRNA | 18 ng |
| 第３のU6_gRNA | 18 ng |
| Syn_GFP-kash | 100 ng |
| 10x NE緩衝液４ | 1.0 μl |
| 10x BSA | 1.0 μl |
| 10 mM ATP | 1.0 μl |
| BsaI HF | 0.75 μl |
| T7リガーゼ | 0.25 μl |
| $ddH_2O$ | 10 μl |

| サイクル数 | 条件 |
|---|---|
| 1-50 | 37°Cで５分, 21°Cで５分 |

【０６９１】
Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ反応産物を、Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ融合ポリメラーゼおよび以下のプライマーを使用してＰＣＲ増幅した：

【化２７】

フォワード 5’ cctgtccttgcggccgcgctagcgagggcc

リバース 5’ cacgcggccgcaaggacagggaagggagcag

【０６９２】
ＰＣＲ産物を、ＮｏｔＩ制限部位を使用してＡＡＶ骨格のＩＴＲ配列間にクローニングした：

ＰＣＲ産物消化：

【０６９３】

【表６４】

| | |
|---|---|
| Fast Digest緩衝液, 10X | 3 μl |
| FastDigest NotI | 1 μl |
| DNA | 1 μg |
| $ddH_2O$ | 最大30 μl |

【０６９４】
ＡＡＶ骨格消化：

【０６９５】

【表６５】

| | |
|---|---|
| Fast Digest 緩衝液, 10X | 3 μl |
| FastDigest NotI | 1 μl |
| FastAP アルカリホスファターゼ | 1 μl |
| AAV 骨格 | 1 μg |
| $ddH_2O$ | 最大 30 μl |

【０６９６】

３７℃で２０分間インキュベートした後、ＱＩＡＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用して試料を精製した。標準化した試料を１：３のベクター：インサート比で以下のとおりライゲートした：

【０６９７】

【表６６】

| | |
|---|---|
| 消化した pUC19 | 50 ng |
| 消化したインサート | 1:3 ベクター:インサートモル比 |
| T7 リガーゼ | 1 μl |
| 2X 迅速ライゲーション緩衝液 | 5 μl |
| $ddH_2O$ | 最大 10 μl |

【０６９８】

細菌をライゲーション反応産物で形質転換した後、本出願人らは、得られたクローンをサンガーシーケンシングで確認した。

【０６９９】

Ｃａｓ９構築物との同時形質移入後に陽性ＤＮＡクローンをＮ２ａ細胞で試験した（図１７および図１８）。

【０７００】

ＡＡＶ送達用新規Ｃａｓ９構築物の設計

ＡＡＶ送達系は、そのユニークな特徴にも関わらず、パッキングに限界がある－インビボでの発現カセットの送達を成功させるには、４．７ｋｂ未満のサイズでなければならない。ＳｐＣａｓ９発現カセットのサイズを小さくして送達を促進するため、本出願人らはいくつかの変更を試験した：異なるプロモーター、より短いポリＡシグナルおよび最後により小さいバージョンの黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）由来Ｃａｓ９（ＳａＣａｓ９）（図１９および図２０）。試験した全てのプロモーターが、マウスＭｅｃｐ２（Ｇｒａｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）、ラットＭａｐ１ｂおよびトランケート型ラットＭａｐ１ｂ（Ｌｉｕ　ａｎｄ　Ｆｉｓｃｈｅｒ，１９９６）を含め、以前試験され、ニューロンにおいて活性であることが発表されたものである。代替的な合成ポリＡ配列は、同様に機能性であることが以前示されたものである（Ｌｅｖｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９；Ｇｒａｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）。クローニングした全ての構築物を、リポフェクタミン２０００による形質移入後にＮ２ａ細胞で発現させ、ウエスタンブロッティング法で試験した（図２１）。

【０７０１】

初代ニューロンでＡＡＶ多重系を試験する

開発した系のニューロンにおける機能性を確認するため、本出願人らはインビトロで初代ニューロン培養物を使用する。Ｂａｎｋｅｒ　ａｎｄ　Ｇｏｓｌｉｎ（Ｂａｎｋｅｒ　ａｎｄ　Ｇｏｓｌｉｎ，１９８８）により既発表のプロトコルに従いマウス皮質ニューロ

ンを調製した。
【０７０２】
神経細胞は１６日目の胚から得られる。安楽死させた妊娠中の雌から胚を摘出し、断頭し、頭部を氷冷ＨＢＳＳに置く。次に頭蓋から鉗子（＃４および＃５）で脳を摘出し、別の交換した氷冷ＨＢＳＳに移す。氷冷ＨＢＳＳで満たしたペトリ皿において実体顕微鏡および＃５鉗子の助けを借りてさらなるステップを実施する。半球を互いに分離し、脳幹から髄膜を取り除く。次に海馬を極めて慎重に解剖し、氷冷ＨＢＳＳで満たした１５ｍｌの円錐管に入れる。海馬解剖後に残る皮質を、脳幹の残りの部分および嗅球を取り除いた後に類似のプロトコルを用いたさらなる細胞単離に使用することができる。単離された海馬は１０ｍｌ氷冷ＨＢＳＳで３回洗浄し、ＨＢＳＳ中トリプシン（海馬当たり１０μｌ　２．５％トリプシンを添加した４ｍｌ　ＨＢＳＳ）と共に３７℃で１５分間インキュベートして解離する。トリプシン処理後、海馬を３７℃に予熱したＨＢＳＳで３回極めて慎重に洗浄して痕跡量のトリプシンを取り除き、温ＨＢＳＳ中に解離する。本出願人らは、通常、１ｍｌ　ＨＢＳＳ中の１０～１２個の胚から１ｍｌピペットチップを使用して細胞を解離し、解離した細胞を４ｍｌに至るまで希釈する。細胞を２５０細胞／ｍｍ２の密度でプレーティングし、３７℃および５％ＣＯ２で最長３週間培養する。
【０７０３】
ＨＢＳＳ
４３５ｍｌ　Ｈ２Ｏ
５０ｍｌ　１０×ハンクス平衡塩類溶液
１６．５ｍｌ　０．３Ｍ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．３
５ｍｌ　ペニシリン－ストレプトマイシン溶液
ろ過（０．２μｍ）および保存４℃
【０７０４】
ニューロンプレーティング培地（１００ｍｌ）
９７ｍｌ　Ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ
２ｍｌ　Ｂ２７サプリメント
１ｍｌ　ペニシリン－ストレプトマイシン溶液
２５０μｌ　グルタミン
１２５μｌ　グルタミン酸
【０７０５】
ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞のろ過培地からの濃縮ＡＡＶ１／２ウイルスまたはＡＡＶ１ウイルスを、培養下で４～７日間ニューロンに形質導入し、送達された遺伝子を発現させるため形質導入後少なくとも１週間培養下に保つ。
【０７０６】
系のＡＡＶドライブ発現
本出願人らは、ＡＡＶ送達後のニューロン培養物におけるＳｐＣａｓ９およびＳａＣａｓ９の発現を、ウエスタンブロット法を用いて確認した（図２４）。形質導入後１週間でニューロンをβ－メルカプトエタノール含有ＮｕＰａｇｅ　ＳＤＳローディング緩衝液に回収し、タンパク質を９５℃で５分間変性させた。試料をＳＤＳ　ＰＡＧＥゲル上で分離し、ＷＢタンパク質検出用のＰＶＤＦ膜に移した。ＨＡ抗体でＣａｓ９タンパク質を検出した。
【０７０７】
ｇＲＮＡ多重ＡＡＶからのＳｙｎ－ＧＦＰ－ｋａｓｈの発現が蛍光顕微鏡法で確認された（図３２）。
【０７０８】
毒性
ＣＲＩＳＰＲ系を含むＡＡＶの毒性を評価するため、本出願人らはウイルス形質導入後１週間のニューロンの全体的な形態を調べた（図２７）。加えて、本出願人らは、設計した系の潜在的毒性を、培養下の生細胞と死細胞との区別を可能にするＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ

（登録商標）細胞イメージングキットで調べた。これは、細胞内エステラーゼ活性の存在（非蛍光カルセインＡＭから強度に緑色の蛍光カルセインへの酵素変換により決定されるとおりの）に基づく。他方で、キットの赤色の細胞不透過性成分は、破損した膜を有する細胞に限り侵入し、ＤＮＡに結合して死細胞で蛍光を生じる。両方のフルオロフォアとも、生細胞では蛍光顕微鏡法で容易に可視化され得る。初代皮質ニューロンにおけるＣａｓ９タンパク質および多重ｇＲＮＡ構築物のＡＡＶドライブ発現は十分な忍容性を有し、非毒性であった（図２５および図２６）ことから、設計されたＡＡＶ系がインビボ試験に好適であることを示している。

【０７０９】

ウイルス産生

ＭｃＣｌｕｒｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１に記載される方法により濃縮ウイルスを作製した。ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞において上清ウイルス産生が生じた。

【０７１０】

脳手術

ウイルスベクター注入のため、１０～１５週齢雄性Ｃ５７ＢＬ／６Ｎマウスをケタミン／キシラジンカクテル（１００ｍｇ／ｋｇのケタミン用量および１０ｍｇ／ｋｇのキシラジン用量）で腹腔内注射により麻酔した。先制鎮痛薬（１ｍｇ／ｋｇ）としてブプレネックス（Ｂｕｐｒｅｎｅｘ）の腹腔内（ｉｎｔｒａｐｅｒｉｔｏｎｉａｌ）投与を使用した。動物を、耳内位置決めスタッドおよびトゥースバーを使用してＫｏｐｆ定位固定装置に固定化し、固定された頭蓋を維持した。手持形ドリルを使用して、ブレグマの－３．０ｍｍ後方および３．５ｍｍ側方に、海馬のＣＡ１野における注入用の穴（１～２ｍｍ）を開けた。３０Ｇ　Ｗｏｒｌｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔシリンジを２．５ｍｍの深さで使用して、総容積１ｕｌのＡＡＶウイルス粒子の溶液を注入した。注入は「Ｗｏｒｌｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　ＵｌｔｒａＭｉｃｒｏＰｕｍｐ３」注入ポンプにより０．５ｕｌ／分の流量でモニタして組織損傷を防いだ。注入が完了した時点で注射針をゆっくりと、０．５ｍｍ／分の速度で取り出す。注入後、６－０　Ｅｔｈｉｌｏｎ縫合糸で皮膚を閉じた。動物を術後に１ｍＬの乳酸加リンゲル液（皮下）で水分補給させ、歩行可能な回復に達するまで温度制御された（３７℃）環境に収容した。術後３週間で深麻酔により動物を安楽死させ、続いて核選別のため組織を摘出するか、または免疫化学のため４％パラホルムアルデヒドを灌流させた。

【０７１１】

核の選別およびインビボ結果

本出願人らは、標識した細胞核の蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）ならびにＤＮＡ、ＲＮＡおよび核タンパク質の下流処理のためｇＲＮＡ標的神経細胞核をＧＦＰで特異的に遺伝的にタグ標識する方法を設計した。そのために、本出願人らの多重ターゲティングベクターが、ＧＦＰとマウス核膜タンパク質ドメインＫＡＳＨ（Ｓｔａｒｒ　ＤＡ，２０１１，Ｃｕｒｒｅｎｔ　ｂｉｏｌｏｇｙ）との間の融合タンパク質および目的の特異的遺伝子座を標的にする３つのｇＲＮＡの両方を発現するように設計された（図１６）。ＧＦＰ－ＫＡＳＨはヒトシナプシンプロモーターの制御下で発現してニューロンを特異的に標識した。融合タンパク質ＧＦＰ－ＫＡＳＨのアミノ酸は以下であった：

【化２８】

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICT
TGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGN
YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIK
VNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMV
LLEFVTAAGITLGMDELYKSGLRSREEEEETDSRMPHLDSPGSSQPRRSFLSRVIRAAL
PLQLLLLLLLLLACLLPASEDDYSCTQANNFARSFYPMLRYTNGPPPT

【０７１２】
脳へのＡＡＶ１／２媒介性送達後１週間でＧＦＰ－ＫＡＳＨのロバストな発現が観察された。標識された核のＦＡＣＳおよび下流処理のため、術後３週間で海馬を解剖し、勾配遠心ステップを用いて細胞核精製用に処理した。そのために、３２０ｍＭ　スクロース、５ｍＭ　ＣａＣｌ、３ｍＭ　Ｍｇ（Ａｃ）２、１０ｍＭ　トリス　ｐＨ７．８、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％ＮＰ４０、０．１ｍＭ　フェニルメタンスルホニルフルオリド（ＰＭＳＦ）、１ｍＭ　β－メルカプトエタノール中で２ｍｌ　Ｄｏｕｎｃｅホモジナイザー（Ｓｉｇｍａ）を使用して組織をホモジナイズした。ホモジナイズ処理物を、２５％～２９％のＯｐｔｉｐｒｅｐ（登録商標）勾配で製造者のプロトコルに従い３０分間３．５００ｒｐｍ、４℃で遠心した。核ペレットを、３４０ｍＭ　スクロース、２ｍＭ　ＭｇＣｌ２、２５ｍＭ　ＫＣｌ、６５ｍＭ　グリセロリン酸、５％グリセロール、０．１ｍＭ　ＰＭＳＦ、１ｍＭ　β－メルカプトエタノール中に再懸濁し、Ｖｙｂｒａｎｔ（登録商標）ＤｙｅＣｙｃｌｅ（商標）Ｒｕｂｙ染色（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を添加して細胞核を標識した（ＤＮＡに近赤外放射を提供する）。標識し精製した核を、Ａｒｉａ　Ｆｌｕ－ａｃｔ細胞選別機およびＢＤＦＡＣＳ　Ｄｉｖａソフトウェアを使用してＦＡＣＳにより選別した。選別されたＧＦＰ＋核およびＧＦＰ－核を最終的に使用することにより、標的ゲノム領域のＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイ分析のためＤＮＡｅａｓｙ血液および組織キット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してゲノムＤＮＡを精製した。同じ手法を、下流処理のための標的細胞からの核ＲＮＡまたはタンパク質の精製に容易に用いることができる。本出願人らがこの手法で用いているのが２ベクター系（図１６）であることに起因して、脳のごく一部の細胞（多重ターゲティングベクターおよびＣａｓ９コードベクターの両方を同時感染させた細胞）においてのみ効率的なＣａｓ９媒介性ＤＮＡ開裂が起こることが予想された。ここに記載する方法は、本出願人らが目的の３つのｇＲＮＡを発現する細胞集団からＤＮＡ、ＲＮＡおよび核タンパク質を特異的に精製することを可能にし、従ってＣａｓ９媒介性ＤＮＡ開裂を起こすはずである。この方法を用いることにより、本出願人らは、ごく一部の細胞においてのみ起こるインビボでの効率的なＤＮＡ開裂を可視化することができた。

【０７１３】
本質的に、本出願人らがここで示したものは、標的インビボ開裂である。さらに本出願人らは多重的手法を使用し、ここではいくつかの異なる配列が同時に、但し独立してターゲティングされる。提供される系は、脳の病的状態（遺伝子ノックアウト、例えばパーキンソン病）の研究に応用することができ、また脳におけるゲノム編集ツールのさらなる開発分野も切り開くことができる。ヌクレアーゼ活性を遺伝子転写調節因子または後成的調節因子に置き換えることにより、病的状態のみならず、学習および記憶形成のような生理学的過程における遺伝子調節および脳の後成的変化の役割に関するあらゆる種類の科学的問題に答えることが可能になる。最後に、提供される技術は、霊長類のようなより複雑な哺乳類系において応用することができ、これにより現在の技術の限界を乗り越えることが可能となる。

【０７１４】
実施例２８：モデルデータ

いくつかの疾患モデルが特に研究されている。それらには、デノボ自閉症リスク遺伝子ＣＨＤ８、ＫＡＴＮＡＬ２、およびＳＣＮ２Ａ；および症候性自閉症（アンジェルマン症候群）遺伝子ＵＢＥ３Ａが含まれる。これらの遺伝子および得られる自閉症モデルは当然ながら好ましいが、本発明を任意の遺伝子に適用することができ、従って任意のモデルが可能であることを示している。

【０７１５】
本出願人らは、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）においてＣａｓ９ヌクレアーゼを使用してこれらの細胞系を作製した。これらの株は、ｈＥＳＣにＣｂｈ－Ｃａｓ９－２Ａ－ＥＧＦＰおよびｐＵ６－ｓｇＲＮＡを一過性に形質移入することにより作成された。ほとんどの場合に、自閉症患者の全エクソンシーケンシング研究から患者ナンセンス（ノックアウト

）突然変異が最近になって記載されている同じエクソンを標的にして、各遺伝子につき２つのｓｇＲＮＡが設計される。本計画のため特にＣａｓ９－２Ａ－ＥＧＦＰおよびｐＵ６プラスミドを作成した。

【０７１６】

実施例２９：ＡＡＶ産生系またはプロトコル

本明細書には、ハイスループットスクリーニング用途のために開発された、かつそれで特に上手く機能するＡＡＶ産生系またはプロトコルが提供され、しかしながらこれは、本発明においても同様により広い適用性を有する。内因性遺伝子発現の操作は、発現速度が、調節エレメント、ｍＲＮＡプロセシング、および転写物の安定性を含めた多くの要因に依存するため、種々の難題を突きつける。この難題を解消するため、本出願人らは、送達用のアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベースのベクターを開発した。ＡＡＶはｓｓＤＮＡベースのゲノムを有し、従って組換えを起こしにくい。

【０７１７】

ＡＡＶ１／２（血清型ＡＡＶ１／２、すなわち、ハイブリッドまたはモザイクＡＡＶ１／ＡＡＶ２カプシドＡＡＶ）ヘパリン精製濃縮ウイルスプロトコル

培地：Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ

５００ｍｌボトルＤＭＥＭ高グルコース＋Ｇｌｕｔａｍａｘ（ＧＩＢＣＯ）

５０ｍｌ　Ｈｙｃｌｏｎｅ　ＦＢＳ（熱失活）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ）

５．５ｍｌ　ＨＥＰＥＳ溶液（１Ｍ、ＧＩＢＣＯ）

細胞：低継代ＨＥＫ２９３ＦＴ（ウイルス産生時の継代数＜１０、ウイルス産生には継代数２～４の新しい細胞を解凍し、３～５代成長させる）

【０７１８】

形質移入試薬：ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）「Ｍａｘ」

５０ｍｌ滅菌超高純度Ｈ２Ｏに５０ｍｇ　ＰＥＩ「Ｍａｘ」を溶解する

ｐＨを７．１に調整する

０．２２ｕｍフリップトップフィルターでろ過する

チューブを密閉し、パラフィルムで包む

アリコートを－２０℃で凍結する（保存のため、また直ちに使用してもよい）

【０７１９】

細胞培養

Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ中で低継代ＨＥＫ２９３ＦＴを培養する

毎日１：２～１：２．５で継代する

有利には細胞を８５％より高いコンフルエンシーに至らせない

【０７２０】

Ｔ７５について

－フラスコ当たり１０ｍｌ　ＨＢＳＳ（－Ｍｇ２＋、－Ｃａ２＋、ＧＩＢＣＯ）＋１ｍｌ　ＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（ＧＩＢＣＯ）を３７℃に温める（ウォーターバス）

培地を完全に吸引する

－１０ｍｌの温ＨＢＳＳを穏やかに添加する（培地を完全に洗い流すため）

－フラスコ当たり１ｍｌのＴｒｙｐＬＥを添加する

－フラスコをインキュベーター（３７℃）に１分間置く

－フラスコを揺り動かして細胞を剥がす

－９ｍｌのＤ１０＋ＨＥＰＥＳ培地（３７℃）を添加する

－上下に５回ピペッティングして単一細胞懸濁液を作成する

－１：２～１：２．５（Ｔ７５には１２ｍｌの培地）の比で分割する（細胞の成長が遅い場合、廃棄して新しいバッチを解凍する、それらは最適成長でない）

－十分な（大量の細胞の取り扱いが容易になるだけの）細胞が存在するようになったら直ちにＴ２２５に移す

【０７２１】

ＡＡＶ産生（構築物当たり５×１５ｃｍディッシュスケール）：

１０００万細胞を１５ｃｍディッシュ中２１．５ｍｌ培地にプレーティングする
３７℃で１８～２２時間インキュベートする
８０％コンフルエンスでの形質移入が理想的である
【０７２２】
プレート当たり
２２ｍｌ培地（Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ）を予熱する
【０７２３】
ＤＮＡ混合物を含むチューブを調製する（内毒素不含ｍａｘｉｐｒｅｐ　ＤＮＡを使用する）：
５．２ｕｇ　目的のベクターのプラスミド
４．３５ｕｇ　ＡＡＶ血清型１プラスミド
４．３５ｕｇ　ＡＡＶ血清型２プラスミド
１０．４ｕｇ　ｐＤＦ６プラスミド（アデノウイルスヘルパー遺伝子）・ボルテックスして混合する
４３４ｕＬ　ＤＭＥＭを添加する（無血清！）
１３０ｕｌ　ＰＥＩ溶液を添加する
５～１０秒間ボルテックスする
ＤＮＡ／ＤＭＥＭ／ＰＥＩ混合物を予熱した培地に添加する
短時間ボルテックスして混合する
１５ｃｍディッシュ中の培地をＤＮＡ／ＤＭＥＭ／ＰＥＩ混合物に交換する
３７℃インキュベーターに戻す
４８時間インキュベートした後回収する（培地が過度に酸性にならないようにすること）
【０７２４】
ウイルス回収：
１．１５ｃｍディッシュから培地を慎重に吸引する（有利には細胞を押し退けない）
２．各プレートに２５ｍｌ　ＲＴ　ＤＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を添加し、細胞スクレーパーで細胞を穏やかに剥がし取る。５０ｍｌチューブに懸濁液を収集する。
３．８００×ｇで１０分間細胞をペレット化する。
４．上清を廃棄する。
【０７２５】
休題：必要に応じて細胞ペレットを－８０℃で凍結する
５．ペレットを１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス　ｐＨ８．０中に再懸濁し、組織培養プレート当たり１０ｍｌを使用する。
６．ｄＨ２Ｏ中に１０％デオキシコール酸ナトリウムの新鮮な溶液を調製する。これを０．５％の最終濃度で組織培養プレート当たり１．２５ｍｌ添加する。ベンゾナーゼ（ｂｅｎｚｏｎａｓｅ）ヌクレアーゼを５０単位／ｍｌの最終濃度となるように添加する。チューブを徹底的に混合する。
７．３７℃で１時間（ウォーターバス）インキュベートする。
８．３０００×ｇで１５分間遠心することにより細胞残屑を除去する。新鮮な５０ｍｌチューブに移し、ヘパリンカラムの詰まりを防ぐため、全ての細胞残屑が除去されたことを確実にする。
【０７２６】
ＡＡＶ１／２のヘパリンカラム精製：
１．蠕動ポンプを使用して、溶液が毎分１ｍｌでカラムを通って流れるようにＨｉＴｒａｐヘパリンカラムをセットアップする。ヘパリンカラム内に気泡が取り込まれないよう確実にすることが重要である。
【０７２７】
２．蠕動ポンプを使用して、１０ｍｌ　１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０でカラムを平衡化する。
【０７２８】

３．ウイルスの結合：５０ｍｌウイルス溶液をカラムに加え、中を通って流れさせる。
【０７２９】
４．洗浄ステップ１：カラムを２０ｍｌ　１００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０で（蠕動ポンプを使用）。
５．洗浄ステップ２：３ｍｌまたは５ｍｌシリンジを使用して、１ｍｌ　２００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０、続いて１ｍｌ　３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０でカラムの洗浄を続ける。
フロースルーは廃棄する。
（上記のウイルス溶液を５０分間流す間、種々の緩衝液でシリンジを調製する）
６．溶出　５ｍｌシリンジおよび軽い圧力（＜１ｍｌ／分の流量）を使用して、以下を加えることによりカラムからウイルスを溶出させる：
１．５ｍｌ　４００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０
３．０ｍｌ　４５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０
１．５ｍｌ　５００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　トリス、ｐＨ８．０
これらを１５ｍｌ遠心管に収集する。
【０７３０】
ＡＡＶ１／２の濃縮：
１．濃縮ステップ１：１００，０００分子量カットオフのＡｍｉｃｏｎ　ｕｌｔｒａ　１５ｍｌ遠心フィルターユニットを使用して、溶出したウイルスを濃縮する。カラム溶出物を濃縮機にロードし、２０００×ｇで２分間遠心する（室温で。濃縮された容積を確認する－約５００μｌとなるはずである。必要であれば、正しい容積に達するまで１分間隔で遠心する。
２．緩衝液交換：１ｍｌの滅菌ＤＰＢＳをフィルターユニットに添加し、正しい容積（５００ｕｌ）に達するまで１分間隔で遠心する。
３．濃縮ステップ２：５００ｕｌの濃縮物をＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　０．５ｍｌ　１００Ｋフィルターユニットに添加する。６０００ｇで２分間遠心する。濃縮された容積を確認する－約１００μｌとなるはずである。必要であれば、正しい容積に達するまで１分間隔で遠心する。
４．回収：フィルターインサートを反転させ、新鮮な収集チューブに挿入する。１０００ｇで２分間遠心する。
アリコートに分け、－８０℃で凍結する
典型的には注入部位当たり１ｕｌが必要であり、従って少量のアリコート（例えば５ｕｌ）が推奨される（ウイルスの凍結融解を回避する）。
ｑＰＣＲを使用してＤＮアーゼＩ耐性ＧＣ粒子力価を決定する（別個のプロトコルを参照）
【０７３１】
材料
Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ、０．５ｍｌ、１００Ｋ；ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ；ＵＦＣ５１００２４
Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ、１５ｍｌ、１００Ｋ；ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ；ＵＦＣ９１００２４
Ｂｅｎｚｏｎａｓｅヌクレアーゼ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｅ１０１４
ＨｉＴｒａｐヘパリンカートリッジ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；５４８３６
デオキシコール酸ナトリウム；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｄ５６７０
【０７３２】
ＡＡＶ１上清産生プロトコル
培地：Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ
５００ｍｌボトルＤＭＥＭ高グルコース＋Ｇｌｕｔａｍａｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）
５０ｍｌ　Ｈｙｃｌｏｎｅ　ＦＢＳ（熱失活）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ）
５．５ｍｌ　ＨＥＰＥＳ溶液（１Ｍ、ＧＩＢＣＯ）

細胞：低継代ＨＥＫ２９３ＦＴ（ウイルス産生時の継代数＜１０）
ウイルス産生には継代数２～４の新しい細胞を解凍し、２～５代成長させる
形質移入試薬：ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）「Ｍａｘ」
５０ｍｌ滅菌超高純度Ｈ２Ｏに５０ｍｇ　ＰＥＩ「Ｍａｘ」を溶解する
ｐＨを７．１に調整する
０．２２ｕｍフリップトップフィルターでろ過する
チューブを密閉し、パラフィルムで包む
アリコートを－２０℃で凍結する（保存のため、また直ちに使用してもよい）
細胞培養
Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ中で低継代ＨＥＫ２９３ＦＴを培養し、毎日１：２～１：２．５で継代する
有利には細胞を８５％より高いコンフルエンシーに至らせる
Ｔ７５について
－フラスコ当たり１０ｍｌ　ＨＢＳＳ（－Ｍｇ２＋、－Ｃａ２＋、ＧＩＢＣＯ）＋１ｍｌ　ＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（ＧＩＢＣＯ）を３７℃に温める（ウォーターバス）
－培地を完全に吸引する
－１０ｍｌの温ＨＢＳＳを穏やかに添加する（培地を完全に洗い流すため）
－フラスコ当たり１ｍｌのＴｒｙｐＬＥを添加する
－フラスコをインキュベーター（３７℃）に１分間置く
－フラスコを揺り動かして細胞を剥がす
－９ｍｌのＤ１０＋ＨＥＰＥＳ培地（３７℃）を添加する
－上下に5回ピペッティングして単一細胞懸濁液を作成する
－１：２～１：２．５（Ｔ７５には１２ｍｌの培地）の比で分割する（細胞の成長が遅い場合、廃棄して新しいバッチを解凍する、それらは最適成長でない）
－十分な（大量の細胞の取り扱いが容易になるだけの）細胞が存在するようになったら直ちにＴ２２５に移す
ＡＡＶ産生（単一１５ｃｍディッシュスケール）
１０００万細胞を１５ｃｍディッシュ中２１．５ｍｌ培地にプレーティングする
３７℃で１８～２２時間インキュベートする
プレート毎に８０％コンフルエンスでの形質移入が理想的である
２２ｍｌ培地（Ｄ１０＋ＨＥＰＥＳ）を予熱する
ＤＮＡ混合物を含むチューブを調製する（内毒素不含ｍａｘｉｐｒｅｐ　ＤＮＡを使用する）：
５．２ｕｇ　目的ベクターのプラスミド
８．７ｕｇ　ＡＡＶ血清型１プラスミド
１０．４ｕｇ　ＤＦ６プラスミド（アデノウイルスヘルパー遺伝子）
ボルテックスして混合する
４３４ｕＬ　ＤＭＥＭを添加する（無血清！）１３０ｕｌ　ＰＥＩ溶液を添加する
５～１０秒間ボルテックスする
ＤＮＡ／ＤＭＥＭ／ＰＥＩ混合物を予熱した培地に添加する
短時間ボルテックスして混合する
１５ｃｍディッシュ中の培地をＤＮＡ／ＤＭＥＭ／ＰＥＩ混合物に交換する
３７℃インキュベーターに戻す
４８時間インキュベートした後回収する（有利には、培地が過度に酸性にならないよう監視する）

【０７３３】

ウイルス回収：
１５ｃｍディッシュから上清を取り出す
０．４５ｕｍフィルター（低タンパク質結合）でろ過し、アリコートに分け、－８０℃で凍結する

形質導入（２４ウェルフォーマット、５ＤＩＶでの初代ニューロン培養）
形質導入されるニューロンの各ウェル内の完全ｎｅｕｒｏｂａｓａｌ培地を新鮮なｎｅｕｒｏｂａｓａｌに交換する（通常、ウェルにつき５００ｕｌ中４００ｕｌが交換される）
３７℃のウォーターバスでＡＡＶ上清を解凍する
インキュベーターで３０分間平衡化させる
各ウェルに２５０ｕｌ　ＡＡＶ上清を添加する
３７℃で２４時間インキュベートする
培地／上清を取り出し、新鮮な完全ｎｅｕｒｏｂａｓａｌに交換する
４８時間後に発現が目に見え始め、感染後約６～７日で飽和する
ＧＯＩ（目的の遺伝子）を含むｐＡＡＶプラスミド用の構築物は、両方のＩＴＲＳを含めて４．８ｋｂを超えてはならない。

【０７３４】

ヒトコドン最適化配列（すなわちヒトでの発現に最適化されている）配列の例：ＳａＣａｓ９を以下に提供する：

【化２９】

ACCGGTGCCACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGC
TTCGCCGAAGAAAAAGCGCAAGGTCGAAGCGTCCATGAAAAGGAACTACATTCT
GGGGCTGGACATCGGGATTACAAGCGTGGGGTATGGGATTATTGACTATGAAAC
AAGGGACGTGATCGACGCAGGCGTCAGACTGTTCAAGGAGGCCAACGTGGAAAA
CAATGAGGGACGGAGAAGCAAGAGGGGAGCCAGGCGCCTGAAACGACGGAGAA
GGCACAGAATCCAGAGGGTGAAGAAACTGCTGTTCGATTACAACCTGCTGACCG
ACCATTCTGAGCTGAGTGGAATTAATCCTTATGAAGCCAGGGTGAAAGGCCTGA
GTCAGAAGCTGTCAGAGGAAGAGTTTTCCGCAGCTCTGCTGCACCTGGCTAAGC
GCCGAGGAGTGCATAACGTCAATGAGGTGGAAGAGGACACCGGCAACGAGCTG
TCTACAAAGGAACAGATCTCACGCAATAGCAAAGCTCTGGAAGAGAAGTATGTC
GCAGAGCTGCAGCTGGAACGGCTGAAGAAAGATGGCGAGGTGAGAGGGTCAATT
AATAGGTTCAAGACAAGCGACTACGTCAAAGAAGCCAAGCAGCTGCTGAAAGTG
CAGAAGGCTTACCACCAGCTGGATCAGAGCTTCATCGATACTTATATCGACCTGC
TGGAGACTCGGAGAACCTACTATGAGGGACCAGGAGAAGGGAGCCCCTTCGGAT
GGAAAGACATCAAGGAATGGTACGAGATGCTGATGGGACATTGCACCTATTTTCC
AGAAGAGCTGAGAAGCGTCAAGTACGCTTATAACGCAGATCTGTACAACGCCCT
GAATGACCTGAACAACCTGGTCATCACCAGGGATGAAAACGAGAAACTGGAATA
CTATGAGAAGTTCCAGATCATCGAAAACGTGTTTAAGCAGAAGAAAAAGCCTAC
ACTGAAACAGATTGCTAAGGAGATCCTGGTCAACGAAGAGGACATCAAGGGCTA
CCGGGTGACAAGCACTGGAAAACCAGAGTTCACCAATCTGAAAGTGTATCACGA
TATTAAGGACATCACAGCACGGAAAGAAATCATTGAGAACGCCGAACTGCTGGA
TCAGATTGCTAAGATCCTGACTATCTACCAGAGCTCCGAGGACATCCAGGAAGAG
CTGACTAACCTGAACAGCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAACAGATTAGTAAT
CTGAAGGGGTACACCGGAACACACAACCTGTCCCTGAAAGCTATCAATCTGATTC
TGGATGAGCTGTGGCATACAAACGACAATCAGATTGCAATCTTTAACCGGCTGAA
GCTGGTCCCAAAAAAGGTGGACCTGAGTCAGCAGAAAGAGATCCCAACCACACT
GGTGGACGATTTCATTCTGTCACCCGTGGTCAAGCGGAGCTTCATCCAGAGCATCAA
AGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTGCCCAATGATATCATTATCGAGCT
GGCTAGGGAGAAGAACAGCAAGGACGCACAGAAGATGATCAATGAGATGCAGAAA

【化３０】

CGAAACCGGCAGACCAATGAACGCATTGAAGAGATTATCCGAACTACCGGGAAAGA
GAACGCAAAGTACCTGATTGAAAAAATCAAGCTGCACGATATGCAGGAGGGAAAGT
GTCTGTATTCTCTGGAGGCCATCCCCCTGGAGGACCTGCTGAACAATCCATTCAACT
ACGAGGTCGATCATATTATCCCCAGAAGCGTGTCCTTCGACAATTCCTTTAACAACA
AGGTGCTGGTCAAGCAGGAAGAGAACTCTAAAAAGGGCAATAGGACTCCTTTCCAG
TACCTGTCTAGTTCAGATTCCAAGATCTCTTACGAAACCTTTAAAAAGCACATTCTG
AATCTGGCCAAAGGAAAGGGCCGCATCAGCAAGACCAAAAAGGAGTACCTGCTGG
AAGAGCGGGACATCAACAGATTCTCCGTCCAGAAGGATTTTATTAACCGGAATCTG
GTGGACACAAGATACGCTACTCGCGGCCTGATGAATCTGCTGCGATCCTATTTCCGG
GTGAACAATCTGGATGTGAAAGTCAAGTCCATCAACGGCGGGTTCACATCTTTTCTG
AGGCGCAAATGGAAGTTTAAAAAGGAGCGCAACAAAGGGTACAAGCACCATGCCG
AAGATGCTCTGATTATCGCAAATGCCGACTTCATCTTTAAGGAGTGGAAAAAGCTGG
ACAAAGCCAAGAAAGTGATGGAGAACCAGATGTTCGAAGAGAAGCAGGCCGAATC
TATGCCCGAAATCGAGACAGAACAGGAGTACAAGGAGATTTTCATCACTCCTCACC
AGATCAAGCATATCAAGGATTTCAAGGACTACAAGTACTCTCACCGGGTGGATAAA
AAGCCCAACAGAGAGCTGATCAATGACACCCTGTATAGTACAAGAAAAGACGATAA
GGGGAATACCCTGATTGTGAACAATCTGAACGGACTGTACGACAAAGATAATGACA
AGCTGAAAAAGCTGATCAACAAAAGTCCCGAGAAGCTGCTGATGTACCACCATGAT
CCTCAGACATATCAGAAACTGAAGCTGATTATGGAGCAGTACGGCGACGAGAAGAA
CCCACTGTATAAGTACTATGAAGAGACTGGGAACTACCTGACCAAGTATAGCAAAA
AGGATAATGGCCCCGTGATCAAGAAGATCAAGTACTATGGGAACAAGCTGAATGCC
CATCTGGACATCACAGACGATTACCCTAACAGTCGCAACAAGGTGGTCAAGCTGTC
ACTGAAGCCATACAGATTCGATGTCTATCTGGACAACGGCGTGTATAAATTTGTGAC
TGTCAAGAATCTGGATGTCATCAAAAAGGAGAACTACTATGAAGTGAATAGCAAGT
GCTACGAAGAGGCTAAAAAGCTGAAAAAGATTAGCAACCAGGCAGAGTTCATCGCC
TCCTTTTACAACAACGACCTGATTAAGATCAATGGCGAACTGTATAGGGTCATCGGG
GTGAACAATGATCTGCTGAACCGCATTGAAGTGAATATGATTGACATCACTTACCGA
GAGTATCTGGAAAACATGAATGATAAGCGCCCCCCTCGAATTATCAAAACAATTGC
CTCTAAGACTCAGAGTATCAAAAAGTACTCAACCGACATTCTGGGAAACCTGTATGA
GGTGAAGAGCAAAAAGCACCCTCAGATTATCAAAAAGGGCTAAGAATTC

【０７３５】

実施例３０：Ｃａｓ９ニッカーゼおよび２つのガイドＲＮＡを使用したオフターゲット開裂の最小化

Ｃａｓ９は、ＲＮＡにガイドされるＤＮＡヌクレアーゼであり、２０ｂｐ　ＲＮＡガイドの助けによりゲノムにおける特定の位置にターゲティングされ得る。しかしながら、ガイド配列はガイド配列とＤＮＡ標的配列との間のいくらかのミスマッチを許容し得る。ガイドＲＮＡによってＣａｓ９が、ガイド配列と数塩基の違いを有するオフターゲット配列をターゲティングするき、オフターゲット開裂が起こる可能性があるため、この柔軟性は

望ましくない。全ての実験的応用（遺伝子ターゲティング、作物エンジニアリング、治療適用等）について、Ｃａｓ９媒介性遺伝子ターゲティングの特異性を向上させ、かつＣａｓ９によるオフターゲット改変の可能性を低下させることが重要である。

【０７３６】

本出願人らは、Ｃａｓ９ニッカーゼ突然変異体を２つのガイドＲＮＡと組み合わせて使用して、オフターゲット改変なしにゲノム中の標的二本鎖切断を促進する方法を開発した。Ｃａｓ９ニッカーゼ突然変異体は、Ｃａｓ９ヌクレアーゼから、その開裂活性を無効にすることにより作成され、従ってＤＮＡ二重鎖の両鎖が開裂される代わりに一方の鎖のみが開裂される。Ｃａｓ９ニッカーゼは、Ｃａｓ９ヌクレアーゼの１つ以上のドメイン、例えばＲｕｖｃ１またはＨＮＨに突然変異を誘発することにより作成されてもよい。これらの突然変異には、限定はされないが、Ｃａｓ９触媒ドメインの突然変異が含まれてもよく、例えばＳｐＣａｓ９では、これらの突然変異はＤ１０位またはＨ８４０位にあり得る。これらの突然変異には、限定はされないが、ＳｐＣａｓ９におけるＤ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３ＡまたはＤ９８６Ａが含まれ得るが、ニッカーゼは、他のＣＲＩＳＰＲ酵素またはＣａｓ９オルソログにおける対応する位置に突然変異を誘発することにより作成されてもよい。本発明の最も好ましい実施形態において、Ｃａｓ９ニッカーゼ突然変異体は、Ｄ１０Ａ突然変異を有するＳｐＣａｓ９ニッカーゼである。

【０７３７】

これの機能の仕方は、Ｃａｓ９ニッカーゼと組み合わせた各ガイドＲＮＡが二重鎖ＤＮＡ標的の標的一本鎖切断を誘導し得ることである。各ガイドＲＮＡが１つの鎖にニックを入れるため、正味の結果は二本鎖切断となる。この方法でオフターゲット突然変異がなくなる理由は、両方のガイド配列に高度な類似性を有するオフターゲット部位を有する可能性が極めて低いためである（各ガイドにつき２０ｂｐ＋２ｂｐ（ＰＡＭ）＝２２ｂｐの特異性、および２つのガイドは、任意のオフターゲット部位が４４ｂｐ近くの相同配列を有しなければならないことを意味する）。個々のガイドがオフターゲットを有し得る可能性はなおあるが、それらのオフターゲットはニッキングされるに過ぎず、それが突然変異誘発性のＮＨＥＪプロセスによって修復される可能性は低い。従ってＤＮＡ二本鎖ニッキングの多重化は、オフターゲットの突然変異誘発効果なしに標的ＤＮＡ二本鎖切断を導入する強力な方法を提供する。

【０７３８】

本出願人らは、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞と、Ｃａｓ９（Ｄ１０Ａ）ニッカーゼならびに１つ以上のガイド用のＤＮＡ発現カセットをコードするプラスミドとの同時形質移入を含む実験を実施した。本出願人らは、リポフェクタミン２０００を使用して細胞を形質移入し、形質移入後４８時間または７２時間で形質移入細胞を回収した。二重ニッキングにより誘導されるＮＨＥＪを、本明細書において先述したとおりＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイを使用して検出した（図３３、図３４および図３５）。

【０７３９】

本出願人らはさらに、２つのガイドＲＮＡと組み合わせたときのＣａｓ９ニッカーゼ突然変異体による効率的な開裂に関係するパラメータを特定しており、それらのパラメータには、限定はされないが、５’オーバーハングの長さが含まれる。少なくとも２６塩基対の５’オーバーハングについて効率的な開裂が報告される。本発明の好ましい実施形態において、５’オーバーハングは少なくとも３０塩基対およびより好ましくは少なくとも３４塩基対である。最大２００塩基対のオーバーハングが開裂に許容され得るが、１００塩基対未満の５’オーバーハングが好ましく、および５０塩基対未満の５’オーバーハングが最も好ましい（図３６および図３７）。

【０７４０】

実施例３１：タンデム単一ガイドＲＮＡ（ｔｓｇＲＮＡ）

細菌ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、本出願人らが示したＲＮＡにガイドされるエンドヌクレアーゼであり、真核ゲノムの標的化される改変を予測的に、正確に、および効率的に誘導し得る。哺乳動物細胞中のこの系を再構成するために要求される最小成分は、Ｃａｓ９

エンドヌクレアーゼおよび目的標的配列に相補的な２０ｂｐ特異性配列を担持するガイドＲＮＡの送達からなる。これまで、複数のゲノム編集を達成するために複数の個々のガイドＲＮＡの送達が要求された。複数のガイドの同時形質移入は組織培養物において比較的簡単な一方、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系についての多くのインビボおよび治療適用は、依然として多重編集を可能とし得る単一ベクター系から利益を受ける。

【０７４１】

本出願人らは、元のキメラガイドＲＮＡアーキテクチャの異なる部分を突然変異誘発してキメラガイドＲＮＡのどの部分が変更または改善に適しているのかを決定した。これらの試験から、本出願人らは、２つの遠位ヘアピンが主としてキメラＲＮＡの安定化において機能すると考えられることを見出した。ダイレクトリピートおよびｔｒａｃｒＲＮＡ二重鎖領域、ならびにその二重鎖およびｔｒａｃｒＲＮＡの第１のヘアピン間の非構造化領域の変更により、開裂活性が停止した。しかしながら、Ｇ－Ｃペアの導入を介する２つのｔｒａｃｒＲＮＡテールヘアピンの安定化の増加（図３８Ａのアーキテクチャ　およびＢ）によっては、標的化されるインデルを誘導するＣａｓ９の能力は減少しなかった。

【０７４２】

天然細菌ＣＲＩＳＰＲ系において、Ｃａｓ９は、ｔｒａｃｒＲＮＡとのアセンブリ時にＤＲフランキングスペーサーの連続反復転写物を区別される単位にプロセシングする。本出願人らは、複数のプレアセンブルｓｇＲＮＡが区別される機能単位に同様にプロセシングされ得ることを結論付けた。タンデムｓｇＲＮＡ（ｔｓｇＲＮＡ）を作出するため、８ｎｔリンカーを第１のｓｇＲＮＡのｔｒａｃｒＲＮＡ末端および続きのｓｇＲＮＡのスペーサー間に導入した（図３８Ｂ）。本出願人らは、ｔｓｇＲＮＡを２つのアッセイにおいて試験した：野生型Ｃａｓ９（図３８Ｃ）による微小欠失誘導およびニッカーゼＣａｓ９ｎによるインデル形成（図３８Ｄ）。本出願人らは、アーキテクチャＡまたはＢ足場のいずれかにより作出された両方のｔｓｇＲＮＡが、両方のガイドＲＮＡの個々の送達と同等のレベルにおいて標的化される改変を達成し得たことを見出した。

【０７４３】

タンデムｓｇＲＮＡは、２ラウンドＰＣＲにおいて以下のとおり合成される：

ラウンド１：テンプレートとしてのＵ６プロモーター、Ｕ６－Ｆｗｄプライマー（ｓｇＲＮＡ送達についての上記ＰＣＲ発現カセット実験など）、および５’から３’（逆相補方向）でスペーサー－２、ｓｇＲＮＡ改変足場、スペーサー－１、Ｕ６プライミング領域を含有する改変リバースプライマーを使用する増幅。

ラウンド２：テンプレートとしてのラウンド１からの産物を使用し、上記のＵ６－Ｆｗｄプライマー、およびリバースプライマー５’から３’（逆相補方向）：改変足場、スペーサー－２を使用する増幅（図３８）。

【０７４４】

２ラウンドのＰＣＲ後、全長ｔｓｇＲＮＡ産物を精製し、細胞中の試験のためにＣａｓ９と同時形質移入した。

【０７４５】

実施例３２：タンデム単一ガイドＲＮＡＲＮＡ（ｔｓｇＲＮＡ）

単一ベクター上の２つ以上の単一ガイドＲＮＡを同時送達する能力は、レンチウイルススクリーニング方法論について特に扱い易い。組み換わるレンチウイルスの傾向は、複数のユニークプロモーターの利用の要求により単一ベクターからの複数の短鎖ＲＮＡの発現をドライブする能力を制限してきた。タンデムアプローチにより、単一プロモーターが少なくとも２つのガイドＲＮＡの発現をドライブすることが可能となり得る。１つのガイドＲＮＡがゲノム標的の組合せを標的化することを可能とすることに加え、２つのガイドＲＮＡを互いに直接隣接して置くことにより、単一ステップ高スループット様式のクローニングが促進される（図３９Ａ）。隣接足場間の相同性をさらに減少させてウイルス組換えを減らし、タンデムアレイ内のガイド安定性を増加させるため、本出願人らは、二次構造を保存する多様な足場配列を作出し、検証している（図３９Ｂ）。最後に、特定のスペーサー－足場組合せに対して標的化されるプローブを使用するノザンブロット分析を介して

、本出願人らは、タンデムガイドＲＮＡが実際に単一ｓｇＲＮＡ単位にプロセシングされること、およびプロセシングの効率が野生型＋８５足場に対して改変足場について増加することを観察した（図３９Ｃ）。タンデムガイドのアセンブリは、スペーサー１－足場－スペーサー２（図３９Ａ）を含有するウルトラマーのアニーリング、２ステップＰＣＲにより、またはより長いアレイの構築に最も適しているＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅアセンブリにより達成することができる。

【０７４６】

実施例３３：ゲノムエンジニアリングにおける適用のためのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の特徴付けおよび最適化

Ｃａｓ９特異性の近年の研究は、２０ｎｔガイド配列内の各々の塩基が特異性全体に寄与するが、ガイドＲＮＡおよびその相補的ＤＮＡ間の複数のミスマッチが量的、位置的、および塩基同一性感受性的に許容され得ることを示している。結果として、Ｃａｓ９は、標的２０ｎｔガイド配列との不完全な相同性を共有するゲノム遺伝子座を開裂し得、オフターゲットＤＳＢおよびＮＨＥＪ修復をもたらす。オフターゲット開裂部位における後続のインデル形成は、原因遺伝子変異を試験するための同質細胞系の生成を含む高レベルの精度を要求するゲノム編集適用、ならびにインビボおよびエクスビボゲノム編集ベース療法のためのＣａｓ９の利用性を限定する顕著なレベルの望ましくない突然変異をもたらし得る。

【０７４７】

Ｃａｓ９媒介ゲノム編集の特異性を改善するため、本出願人らは、Ｃａｓ９のＤ１０Ａ突然変異ニッカーゼバージョン（Ｃａｓ９ｎ）を、標的部位の逆鎖を標的化するオフセットｓｇＲＮＡのペアと組み合わせる新規戦略を開発した。Ｃａｓ９ニッカーゼのペアによる標的部位における両方のＤＮＡ鎖のニッキングは、部位特異的ＤＳＢをもたらす一方、個々のニックはエラープローンＮＨＥＪとは異なり高フィデリティ塩基除去修復経路（ＢＥＲ）により大部分が修復される。この戦略は、各々のＣａｓ９ｎ－ｓｇＲＮＡ複合体によるオフターゲット突然変異誘発を最小化する一方、野生型Ｃａｓ９と同等のオンターゲットＮＨＥＪを最大化し、ダイマー亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）および転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）と類似し、ＤＮＡ開裂は、２つの独立する特異性コードモジュールの相乗的相互作用に依存する。ＺＦＮおよびＴＡＬＥＮは、それぞれが１つのＤＮＡ鎖をニッキングする２つのＦｏｋＩモノマーの近接性誘導ダイマー化を介してＤＳＢを生成する。同様に、本出願人らは、Ｃａｓ９ｎを、所望の遺伝子座の逆鎖を標的化する２つのｓｇＲＮＡとペア形成した。この「二重ニッキング」戦略は、２つのｓｇＲＮＡによる同時標的化を要求することによりＣａｓ９の特異性の標的化を効率的に強化する。

【０７４８】

最後に、複数のｓｇＲＮＡの同時送達を促進するため、本出願人らは、単一プロモーター下でｓｇＲＮＡのペアを発現させるための系を開発した。本出願人らは、第１に機能について重要なｓｇＲＮＡの構造的成分を試験し、第２に、この知識を使用してタンデムｓｇＲＮＡ転写を促進する配列多様な新たなｓｇＲＮＡ足場の設計を提供する。

【０７４９】

材料および方法

Ｕ６プロモーターにドライブされるｓｇＲＮＡおよびタンデムｓｇＲＮＡのＰＣＲ増幅

Ｃａｓ９による標的化のためのスペーサー選択および後続のＰＣＲアンプリコンの生成を、Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．に記載のとおり実施した。手短に述べると、Ｕ６プライミング部位、スペーサー配列、およびガイドＲＮＡ足場からなるオリゴウルトラマーを、細胞形質移入のためのＵ６にドライブされるＰＣＲカセットの増幅のためにＩＤＴにより合成した。両方の場合において、ＱｉａＱｕｉｃｋ（Ｑｉａｇｅｎ）またはＥｃｏｎｏＳｐｉｎ（Ｅｐｏｃｈ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）スピンカラムのいずれかを使用してＰＣＲ反応をクリーンアップしてから形質移入した。タンデムｓｇＲＮＡを２ラウンドＰＣＲにおいて以下のとおり合成する：ラウンド１：テンプレートとしてのＵ６プロモーター、Ｕ

６－Ｆｗｄプライマー（ｓｇＲＮＡ送達についての上記ＰＣＲ発現カセット実験など）、および５’から３’（逆相補方向）でスペーサー－２、ｓｇＲＮＡ改変足場、スペーサー－１、Ｕ６プライミング領域を含有する改変リバースプライマーを使用する増幅。ラウンド２：テンプレートとしてのラウンド１からの産物を使用し、上記のＵ６－Ｆｗｄプライマー、およびリバースプライマー５’から３’（逆相補方向）：改変足場、スペーサー－２を使用して増幅する。２ラウンドのＰＣＲ後、全長ｔｓｇＲＮＡ産物を精製し、細胞中の試験のためにＣａｓ９と同時形質移入した。両方の場合において、ＱｉａＱｕｉｃｋ（Ｑｉａｇｅｎ）またはＥｃｏｎｏＳｐｉｎ（Ｅｐｏｃｈ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）スピンカラムのいずれかを使用してＰＣＲ反応をクリーンアップしてから形質移入した。使用されるｓｇＲＮＡおよびそれらのゲノム標的のリストは、表Ｅに見出すことができる。

【０７５０】

細胞培養および形質移入

ヒト胎児腎臓（ＨＥＫ）細胞系２９３ＦＴ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を、１０％ウシ胎仔血清（ＨｙＣｌｏｎｅ）、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１００Ｕ／ｍＬペニシリン、および１００μｇ／ｍＬストレプトマイシンを補足したダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）に３７℃で５％ＣＯ２インキュベーションによって維持した。細胞を規則的間隔において継代し、２４ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）に１２０，０００個の細胞／ウェルの密度で播種し、２４時間後に形質移入する。細胞は、８０～９０％のコンフルエンシーでＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して製造者の推奨プロトコルに従い形質移入した。２４ウェルプレートのウェルにつき合計４００ｎｇのＣａｓ９プラスミドおよび１００ｎｇのＵ６ｓｇＲＮＡ　ＰＣＲ産物が形質移入された。２つ以上の単一ガイドを含む二重ニッキング実験または形質移入については、１００ｎｇの各々のｓｇＲＮＡが形質移入された。タンデムｓｇＲＮＡの場合において、ウェルにつき２００ｎｇの精製Ｕ６－ｔｓｇＲＮＡ　ＰＣＲ産物が形質移入された。

【０７５１】

ヒト胚性幹細胞系ＨＵＥＳ６２（ハーバード幹細胞研究所（Ｈａｒｖａｒｄ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）コア）を、１００ｕｇ／ｍｌ　Ｎｏｒｍｏｃｉｎ（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）を補足したｍＴｅｓＲ培地（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中のＧｅｌＴｒｅｘ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）上にフィーダー不含条件で維持した。ＨＵＥＳ６２細胞を、Ａｍａｘａ　Ｐ３初代細胞４－Ｄ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒキット（Ｌｏｎｚａ）で製造者のプロトコルに従い形質移入した。

【０７５２】

ゲノム改変のためのＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼアッセイ

２９３ＦＴおよびＨＵＥＳ６２細胞に、上記に記載したとおりのＤＮＡを形質移入した。細胞を形質移入後７２時間にわたり３７℃でインキュベートした後、ゲノムＤＮＡを抽出した。ゲノムＤＮＡはＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ　ＤＮＡ抽出溶液（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）を使用して、製造者のプロトコルに従い抽出した。簡潔に言えば、ペレット化した細胞をＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ溶液に再懸濁し、６５℃で１５分間、６８℃で１５分間、および９８℃で１０分間インキュベートした。

【０７５３】

各遺伝子についてＣＲＩＳＰＲ標的部位に隣接するゲノム領域をＰＣＲ増幅し（プライマーは表Ｇに列記する）、産物をＱｉａＱｕｉｃｋスピンカラム（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、製造者のプロトコルに従い精製した。合計４００ｎｇの精製ＰＣＲ産物を２μｌの１０×Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼＰＣＲ緩衝液（Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ）および超純水と混合して最終容積を２０μｌとし、リアニーリングプロセスに供してヘテロ二本鎖の形成を可能にした：９５℃で１０分、－２℃／秒で９５℃～８５℃のランピング、－０．２５℃／秒で８５℃～２５℃、および２５℃で１分間保持。リアニーリング後、産物をＳＵＲＶＥＹＯＲヌクレアーゼおよびＳＵＲＶＥＹＯＲエンハンサーＳ（Ｔｒａｎｓｇｅｎｏ

ｍｉｃｓ）で製造者の推奨するプロトコルに従い処理し、４～２０％Ｎｏｖｅｘ　ＴＢＥポリアクリルアミドゲル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で分析した。ゲルをＳＹＢＲ　Ｇｏｌｄ　ＤＮＡ染料（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で３０分間染色し、Ｇｅｌ　Ｄｏｃゲルイメージングシステム（Ｂｉｏ－ｒａｄ）でイメージングした。定量化は相対バンド強度に基づいた。インデル率を、式１００×（１－（１－（ｂ＋ｃ）／（ａ＋ｂ＋ｃ））$^{1/2}$）（式中、ａは未消化ＰＣＲ産物の積分強度であり、ｂおよびｃは各開裂産物の積分強度である）によって決定した。

【０７５４】

ディープシーケンシングによるターゲティング特異性の評価

ＨＥＫ　２９３ＦＴ細胞をプレーティングして上記に記載したとおり形質移入し、７２時間後にゲノムＤＮＡを抽出した。各遺伝子についてＣＲＩＳＰＲ標的部位に隣接するゲノム領域をフュージョンＰＣＲ方法によって増幅し（プライマーは表Ｈに列記する）、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｐ５アダプターならびにユニークな試料特異的バーコードを標的に付加した。ＰＣＲ産物を、ＥｃｏｎｏＳｐｉｎ　９６ウェルフィルタープレート（Ｅｐｏｃｈ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して製造者の推奨プロトコルに従い精製した。

【０７５５】

バーコードを付加して精製したＤＮＡ試料をＱｕｂｉｔ　２．０蛍光光度計（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によって定量化し、等モル比でプールした。次にシーケンシングライブラリをＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ　Ｐｅｒｓｏｎａｌシーケンサー（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）でシーケンシングした。

【０７５６】

シーケンシングデータ解析、インデル検出、および相同組換え検出

ＭｉＳｅｑリードを、少なくとも３０の平均Ｐｈｒｅｄクオリティ（Ｑスコア）、ならびにバーコードとの完全な配列マッチを要件とすることによりフィルタリングした。オンターゲットおよびオフターゲット遺伝子座からのリードを、Ｐｙｔｈｏｎ　ｄｉｆｆｌｉｂモジュールで実行されるとおり、標的部位の上流および下流の３０ヌクレオチドを含む遺伝子座配列（合計８０ｂｐ）に対してＲａｔｃｌｉｆｆ－Ｏｂｅｒｓｈｅｌｐストリング比較を実施することにより解析した。得られた編集操作をパースし、挿入または欠失操作が見付かった場合にリードをインデルとしてカウントした。それらのアラインメントの一部がＭｉＳｅｑリードそれ自体の範囲外にある場合またはコールされなかった塩基が５塩基より多かった場合、解析した標的領域は破棄した。

【０７５７】

各試料の陰性対照が、インデルを推定切断イベントとして含めるか、それとも除外するかの判断基準を提供した。相同組換えの定量化のため、初めにリードをインデル検出ワークフローにあるとおり処理し、次に相同組換えテンプレートＣＣＡＧＧＣＴＴＧＧの存在を調べた。

【０７５８】

Ｃａｓ９自己標的化インデル誘導についてのフローサイトメトリー分析

Ｃａｓ９自体を標的化するガイドＲＮＡの存在下でＳｐＣａｓ９－ｔ２ａ－ＧＦＰをコードするＣａｓ９プラスミドＰＸ４７５を使用して細胞を上記のとおり形質移入した。形質移入３日後、細胞をＰＢＳにより１回洗浄し、トリプシン処理し、粉砕して単一細胞懸濁液にし、５％ＦＢＳおよび２ｍＭ　ＥＤＴＡを補足したＰＢＳ緩衝液中で再懸濁させた。続いて、Ａｃｃｕｒｉ　Ｃ６フローサイトメーターを使用して蛍光強度を計測した。

【０７５９】

ｓｇＲＮＡプロセシングのノザンブロット分析　細胞を上記のとおり形質移入し、３７Ｃにおいて７２時間インキュベートした。続いて、ＲＮＡをｍｉｒＶａｎａ　ｍｉＲＮＡ単離キットプロトコル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）により細胞から抽出して小分子ＲＮＡを濃縮した。精製小分子ＲＮＡを変性ゲル上で分解し、ＢｒｉｇｈｔＳｔａｒ　Ｐｏｓｉｔｉｖｅｌｙ－Ｃｈａｒｇｅｄ　Ｎｙｌｏｎ　Ｍｅｍｂｒａｎｅ（Ａｍｂｉｏｎ）に移し、特異的ｓｇＲＮＡスペーサー配列に対して標的化される放射性またはビオ

チン化オリゴヌクレオチドを使用して一晩プロービングした。可視化は、プローブのモダリティに応じてＴｙｐｈｏｏｎイメージャーまたはＬｉ－Ｃｏｒ　ＣＬｘ装置の使用を介して実施した。

【０７６０】

結果

Ｃａｓ９ニッカーゼは、近接する二重ガイドＲＮＡにより効率的なＮＨＥＪを生成する

Ｃａｓ９ヌクレアーゼの標的化特異性および活性は、ｓｇＲＮＡ内の２０ｎｔガイド配列および標的ＤＮＡ間の塩基対形成相互作用に依存性である。したがって、本出願人らは、ガイド配列を伸ばすと、ガイド：標的塩基対形成が増加し、Ｃａｓ９標的化特異性が増加し得ることを理由付けた。しかしながら、このことは、Ｃａｓ９標的化特異性を改善し得なかった。それというのも、大多数の伸びたガイド配列はプロセシングされて２０ｎｔ長に戻るためである。したがって、本出願人らは、２つの別個のＣａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体によるＤＮＡの両方の鎖の同時ニッキングに基づくガイド配列およびＤＮＡ標的間の全体塩基対形成長さを増加させるための代替戦略を開発した。Ｃａｓ９ｎによる一本鎖ニックは、ＢＥＲ経路により優先的に修復され、これが典型的には極端に低いレベルの突然変異誘発をもたらす。本出願人らは、ＤＮＡを標的化するために塩基対形成されるｓｇＲＮＡ塩基の倍の数を要求する標的遺伝子座の逆鎖を標的化するｓｇＲＮＡのペアにより指向される２つのニッキング酵素が、ＤＳＢを依然として媒介し得る一方、単一ｓｇＲＮＡ－Ｃａｓ９二重鎖によりニッキングされた遺伝子座は、完全に修復されることを理由付けた（図４０Ａに概略）。ｓｇＲＮＡおよびｓｇＲＮＡに相補的なＤＮＡの鎖をニッキングするＣａｓ９　Ｄ１０Ａニッカーゼ（Ｃａｓ９ｎ）をヒト胎児腎臓（ＨＥＫ２９３ＦＴ）細胞中に同時形質移入することにより、本出願人らは、ガイドペアとの組合せのＣａｓ９ｎが効率的にインデル形成を誘導し得る一方、単一ガイド単独を用いるＣａｓ９ｎが標的遺伝子座の検出可能な改変をもたらさないことをＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイにより観察した（図４０Ｂ）。

【０７６１】

二重ニッキング戦略が、同一の遺伝子座を同時に標的化するために２つのＣａｓ９ｎ－ｓｇＲＮＡ複合体を要求することを所与として、ＤＮＡの逆鎖を標的化するｓｇＲＮＡのいずれのペアをＤＳＢ生成に使用することができるかの決定において立体障害が懸念される可能性が高い。インデル形成に適するペア形成ガイドＲＮＡのパラメータを完全に特徴付けするため、本出願人らは、５’および３’－オーバーハング産物の両方を作出する－２００から２００ｂｐの一連のオフセット距離により離隔する３つの異なるヒト遺伝子を標的化するｓｇＲＮＡペア形成を体系的に設計し、ＮＨＥＪについてそれぞれを試験した（表Ｄに列記されるペア）。重要なことに、３つ全ての遺伝子にわたり、本出願人らは、－４から２０ｂｐのｓｇＲＮＡペアオフセットについての実質的なインデル頻度（最大４０％）を観察した（図４１Ａ）。特に、ペア形成ガイドＲＮＡによる二重ニッキングにより形成されるインデルは、典型的にはＰＡＭから４～６ｂｐ上流の標的配列中の小さい欠失をもたらす単一ガイドについて通常観察されるものより大きく、より変動するタイプの突然変異（図４１Ｂに示されるディープシーケンシングにより観察された代表的なインデル）をもたらし得る。最大１００ｂｐだけのｓｇＲＮＡオフセットは、オンターゲット改変を媒介することが観察されることがあり、これは、広範囲の候補標的化のための間隔を示唆する。重要なことに、野生型Ｃａｓ９を用いる全ての単一ｓｇＲＮＡ形質移入は、効率的なインデル形成を媒介したが、Ｃａｓ９ｎを用いる形質移入は媒介せず（表Ｄにまとめる）、二重ニッカーゼ誘導ゲノム改変の主要な決定要素であるガイドペア間の相対的な間隔と一致した。優れていることに、二重ニッカーゼインデル頻度は、一般に、同一遺伝子座を標的化する野生型Ｃａｓ９ヌクレアーゼにより媒介されるものと同等であった。まとめると、これらの結果は、二重ニッキングが正確に標的化されるＤＳＢの効率的媒介のための一般化可能および予測可能な解決手段として機能し得ることを示す。

【０７６２】

二重ニッキングにより、高効率の相同組換えが可能となる

二本鎖ＤＮＡ切断の誘導が標的化されるゲノム遺伝子座における突然変異誘発インデルを導入し、遺伝子ノックアウトを媒介し得る一方、これは、相同性組換え修復（ＨＤＲ）を促進して標的部位の高度に正確な編集または遺伝子置換を可能とする機序でもあり得る。生成されている豊富なＳＮＰデータならびにゲノムまたはエキソームワイドシーケンシングの試みを介する疾患組織中の小さいまたは単一塩基対突然変異との関連およびその認識の増加を所与として、下流機能試験または疾患モデリングのために小さいゲノム領域を確実に、および効率的に変更する能力が、非常に有用であることが証明される。

【０７６３】

既に、本出願人らは、Ｃａｓ９ｎが、単一ｓｇＲＮＡと使用してＤＮＡをニッキングする場合、ＨＤＲを開始し得ることを示している。しかしながら、ＨＤＲは、ＤＳＢではなくニッキングにより媒介される場合、かなり低い頻度において生じ、これは細胞タイプ間でさらに変動し得る。二重ニッキング戦略を使用してＨＤＲの効率を試験するため、本出願人らは、－３から１７ｂｐだけのｓｇＲＮＡオフセットの２つのペア（それぞれ、３１および５２ｂｐの５’オーバーハングを生成する）によりヒトＥＭＸ１遺伝子座を標的化し、ＨＤＲ修復テンプレートとしてのＨｉｎｄＩＩＩ制限部位を担持する一本鎖オリゴヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）を導入して制限断片長多型（ＲＦＬＰ）をゲノム遺伝子座中に導入した（図４２Ａ）。後続のＲＦＬＰは、両方のｓｇＲＮＡペアが、単一ガイドＣａｓ９ｎ形質移入のものより顕著に高く、野生型Ｃａｓ９のものと同等の頻度においてＨＲテンプレートを良好に導入し得ることを実証した（図４２Ｂ）。

【０７６４】

幹細胞（ＥＳＣ）または患者由来の誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）生物学における関心の高まりおよび発展は、新たな疾患パラダイムを生成し、新たな治療物を開発するための重要な機会、ならびにゲノム改変のさらにより正確で効率的な手段を開発する必要性の増加を同時に表す。二本鎖切断はＥＳＣおよびｉＰＳＣ中のＨＤＲを効率的に促進することが示されている一方、それらのより低いオフターゲット活性に起因してそれらの感受性適用におけるＨＤＲのためのニッキングアプローチの使用における依然として多大な関心が存在する。しかしながら、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を使用するヒト胚性幹細胞中のＨＤＲを誘導するための単一ニックアプローチは、成功が制限を受けている。ＥＳ細胞中のＨＤＲ効率を改善するため、本出願人らは、続いて、ＨＵＥＳ６２細胞系中の二重ニッキング誘導ＨＤＲを試み、ＨＤＲテンプレートの顕著に増加した速度の取り込みを観察した（図４２Ｃ）。

【０７６５】

二重ニッキングによるインデル生成のための最適なｓｇＲＮＡ間隔の定義と同様に、本出願人らは、次に、ＨＤＲの増強のための理想的なパラメータを決定することを求めた。本出願人らは、鎖侵入および後続の変換を最も効率的に促進するため、ｓｇＲＮＡペア形成ＲＮＡの少なくとも１つをインテグレーションの部位に近接して標的化すべきことを結論づけた。本出願人らは、標的化される開裂部位の少なくとも１つが組換えの部位に近接する種々のｓｇＲＮＡペアを試験した（図４３）。本出願人らは、インテグレーションの部位の２２ｂｐ内の少なくとも１つの標的を有する５’オーバーハングを生成すると予測されるｓｇＲＮＡペアが、野生型Ｃａｓ９ヌクレアーゼ媒介ＨＤＲと同等の頻度において提供ＨＤＲテンプレートを取り込み得ることを観察した。対照的に、負のオフセットにより離れたＤＮＡの同一鎖を標的化する、またはインテグレーションの部位に近接するｓｇＲＮＡを有さないｓｇＲＮＡペアは、検出可能なレベルにおいてＨＤＲを促進し得なかった。

【０７６６】

二重ニッキングは、高度に特異的なゲノム編集を媒介する

二重ニッキングが、野生型Ｃａｓ９により誘導されるものと同等のレベルにおいてＮＨＥＪおよびＨＤＲの両方の高効率誘導を媒介することを示したため、本出願人らは、次に、オフターゲット活性の定量を介してこのアプローチがＣａｓ９に対して改善された特異性をもたらすか否かを決定することを求めた。本出願人らは、２３ｂｐオフセットだけ離

れた２つのｓｇＲＮＡとＣａｓ９ｎを同時送達してヒトＥＭＸ１遺伝子座を標的化した（図４４Ａ）。予測のとおり、この構成のペア形成ｓｇＲＮＡは、ｓｇＲＮＡ単独と形質移入された野生型Ｃａｓ９のものと同等のオンターゲットインデルレベルをもたらした（図４４Ｂ、左側のパネル）。特筆すべきことに、本出願人らはＳＵＲＶＥＹＯＲアッセイにより、野生型Ｃａｓ９が１０％の改変を示した二重ニッキングの場合、ｓｇＲＮＡ１オフターゲット部位（ＯＴ－４）の１つにおいていかなる改変も検出しなかった（図４３、右側のパネル）。続いて、本出願人らは、ディープシーケンシングを使用して５つの異なるｓｇＲＮＡ１オフターゲット遺伝子座における改変を評価し、野生型Ｃａｓ９＋ｓｇＲＮＡ１単独による全ての部位における顕著な突然変異誘発を観察した（図４３）。対照的に、Ｃａｓ９ｎによるオフターゲット開裂は、ほとんど検出可能でなく、シーケンシングエラーから区別することが困難であった。特異性比（オンターゲットインデル割合とオフターゲットインデル割合との比）に正規化すると、２つのｓｇＲＮＡを用いるＣａｓ９ｎは、野生型Ｃａｓ９に対して１００倍超上回る特異性を達成し得た（図４３）。

【０７６７】

まとめると、ニッカーゼＣａｓ９ｎを近接するガイドＲＮＡのペアと使用する戦略は、ＮＨＥＪ誘導およびＨＤＲ促進において野生型ヌクレアーゼと同程度で効率的である一方、かなり高い標的化特異性を達成する。さらに、ロバストな活性と適合性である二重ガイド間の比較的広範囲のオフセット距離により、二重ニッキングが魅力的かつより容易に実行される方法となる。

【０７６８】

ｓｇＲＮＡアーキテクチャの体系的突然変異誘発は、さらなる最適化のための領域を同定する

ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼ系の重要なエレメントの１つは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）であり、これは、部分配列相同性を共有し、ｃｒＲＮＡのリピート領域と塩基対形成し、最終的なＣａｓ９－ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体のアセンブリに要求される。ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡからのエレメントが単一の人工連結ｓｇＲＮＡを形成するように適合されている一方（以後、野生型ｓｐ８５足場と称される）（Ｊｉｎｅｋ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，ＨＳＵ）、ｓｇＲＮＡ足場改変の効果および突然変異誘発に対する許容性は、一般に包括的に研究されてこなかった。

【０７６９】

ｓｇＲＮＡ足場は、機能的および構造的に、いくつかの成分に分類することができる。ｃｒＲＮＡ部分は、ガイド配列およびダイレクトリピート領域を含む。ｔｒａｃｒＲＮＡは、ダイレクトリピートと部分的に塩基対形成してステムループ（ステムループ１）を形成する１４ｎｔアンチリピートから開始し、２つの追加のステムループ（ステムループ２および３）への１８ｂｐリンカーをさらに含有する。重要なことに、ダイレクトリピートおよびｔｒａｃｒＲＮＡアンチリピートステムループ１内にいくつかの対形成していない塩基が存在し、これは、近位および遠位ダイレクトリピート領域を離隔するバルジを作出する（図４５Ａ）。本出願人らは、ｓｇＲＮＡアーキテクチャの最適化が、Ｃａｓ９のゲノム編集活性を改善し得ることを仮定し、続いてｓｇＲＮＡ足場の体系的調査を実施してより各々の成分のより良好な機能的理解を得た。

【０７７０】

第１に、本出願人らは、Ｃａｓ９による結合および認識に重要である可能性が高いｓｇＲＮＡの領域を同定した。特筆すべきことに、完全に塩基対形成する配列によるステムループ１バルジの置き換えにより、Ｃａｓ９媒介インデル活性が完全に停止した一方、他の非塩基対形成ヌクレオチドの置換およびこうしたバルジ構造の残留により、依然として適度の活性の維持が可能となった。ステムループ１内で、近位ダイレクトリピート中の突然変異は、均一に許容されなかった一方、近位ダイレクトリピート二重鎖の短縮または混合ピリミジンおよびプリンに対するポリＴトラクトの突然変異により、Ｃａｓ９活性は停止し、ピリミジン単独に対するポリＴトラクト突然変異は十分許容された（図４５Ｂ）。最終的に、１８ｂｐリンカー配列のトランケーション、シャフリング、またはランダム化は

、同様に、活性の完全な損失をもたらした。しかしながら、このより長いリンカーが、ＲＮＡ折り畳みにより予測されない追加の二次構造を形成することが可能であり、その構造的役割を解明するためにはさらにより詳細なマッピング突然変異誘発実験が必要とされる。

【０７７１】

ステムループ２および３が開裂効率を顕著に改善するとしても、ステムループ２および３がＣａｓ９活性に重要でないことを示す従来の研究と一致して、遠位ヘアピンの変更は大部分が十分に許容される。例えば、ステムループ２および３の両方の大部分は、活性に悪影響を与えることなくＧ－Ｃ塩基対により置き換え、または長さを伸長させることができる（図４５Ｂ）。まとめると、これらの知見は、近位ダイレクトリピート、バルジ、およびリンカーが、Ｃａｓ９認識および結合に関与し得る一方、２つの遠位ヘアピンはｓｇＲＮＡ折り畳みおよび安定性により重要である可能性が高いことを示唆する。実際、遠位ダイレクトリピート領域の突然変異を伴う両方の遠位ヘアピンの同時の安定化は、十分に許容され、元の足場と同等のインデル活性を生じさせる（図４６）。

【０７７２】

Ｕ６にドライブされるタンデムガイドＲＮＡは、２つの機能ｓｇＲＮＡを送達し得る

小分子ＲＮＡによるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のプログラム可能な性質により、多重標的化を要求する適用について、純粋なタンパク質モジュールベースツール、例えば、ＺＦＮおよびＴＡＬＥＮより本質的に扱い易くなる。実際、本出願人らおよび他の研究者らは、種々の適用においてこれが複数のｓｇＲＮＡの同時送達により容易に達成することができることを既に示している。このアプローチは、インビトロ研究については十分に機能する一方、インビボまたは治療適用は、単一ベクター系、例えば、ＡＡＶの使用から利益を受ける。このような系の主要な限定の１つは、送達することができる遺伝子情報の量であり（ＡＡＶについて約４．８ｋｂ）、これを超えるとＡＡＶ粒子アセンブリの効率は急速に降下する。さらに、独立して転写されるｓｇＲＮＡのプールされた送達を使用する代替アプローチは、天然の確率論であり、特に標的飽和が望まれず、達成可能であり得ない適用において単一ベクター系より再現性が低い。多くの内因性細菌ＣＲＩＳＰＲ系は、個々の成熟ｃｒＲＮＡにプロセシングされる前に単一転写物として転写されるプロトスペーサーにより離れたダイレクトリピートの単一プロモーターにドライブされるアレイとして天然に生じる。しかしながら、キメラｓｇＲＮＡ系が天然ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ二重鎖よりかなり効率的に機能することを所与として、本出願人らは、単一プロモーターが天然細菌ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座と同様にタンデムに置かれた複数のｓｇＲＮＡの発現をドライブし得る系を開発することを求めた。

【０７７３】

本出願人らは、構造的に安定なｓｇＲＮＡ足場が、複数単位が同一転写物中で一緒に転写される場合に独立する機能的に活性な単位に折り畳まれる可能性がより高いことを仮定した。これを試験するため、本出願人らは、タンデム隣接ｓｇＲＮＡ間に８ｎｔリンカーを挿入することにより開始し（図４７Ａ）；各々の不変ｓｇＲＮＡ足場（非ガイド領域）について、元のｓｐ８５　ｓｇＲＮＡまたは足場と安定化遠位ヘアピンとのペアのいずれかを使用した（４５５８および４５６１）。特筆すべきことに、本出願人らは、ｔｓｇＲＮＡがＣａｓ９ニッカーゼによりインデルを誘導することが既に示されている近接ゲノム遺伝子座を標的化する場合、安定化足場４５５８および４５６１が同時形質移入された個々のｓｇＲＮＡにより誘導されるものと類似の頻度においてインデルを誘導し得ることを観察した（図４７Ｂ）。さらに、野生型Ｃａｓ９ヌクレアーゼとペア形成される場合、ｔｓｇＲＮＡは、多重化された個々のｓｇＲＮＡと同等のレベルにおいてヒトＥＭＸ１遺伝子座中のゲノム微小欠失を同様に誘導し得た（図４７Ｃ）。

【０７７４】

タンデムｓｇＲＮＡ足場アーキテクチャの最適化

タンデムで転写されるｓｇＲＮＡが２つのゲノム遺伝子座を同時に標的化し得ることを示したため、本出願人らは、次に、隣接ガイド－足場を連結するための最適なリンカーを

決定することを求めた。本出願人らは、２つのｓｇＲＮＡを用いるゲノム微小欠失アッセイにおいて変動長さのリンカー配列を使用してｔｓｇＲＮＡを設計した。内因性の個々のプロトスペーサーが３６ｎｔ長ダイレクトリピート配列により離隔していることを所与として、ダイレクトリピートの半分または全長ダイレクトリピートのいずれかをコードするリンカーも試験した。興味深いことに、本出願人らは、第２のガイド配列からｓｇＲＮＡの遠位末端を離隔するリンカーが存在しない場合であっても、リンカー配列長さおよびゲノム改変の効率の間に強力な相関が存在しないことを観察した（図４８）。しかしながら、ダイレクトリピート配列の包含は、活性に悪影響を与える一方、開裂効率について１２ｎｔリンカー長さに対する適度の優先性が存在することが考えられたが、これらの観察を確認するためにはさらなる研究が必要である。

【０７７５】

タンデムｓｇＲＮＡの個々のサブユニットへのプロセシングが生じ、位置依存性である

同一プロモーター下で複数のｓｇＲＮＡを転写するための明らかな疑問は、同時転写されるタンデムｓｇＲＮＡが個々のガイド足場単位にプロセシングされるか否かということである。これに回答するため、本出願人らは、同一ガイドを第１または第２の位置のいずれかで担持するタンデムｓｇＲＮＡを設計した（図４９Ａ）。形質移入された細胞の後続のノザンブロット分析は、２００＋ｎｔ（プロセシングされない可能性が高いタンデムＲＮＡ転写物）、約１４０ｎｔ転写物（第２の足場中でポリＵトラクトによりシグナリングされる未成熟転写終結と一致）、および約１００ｎｔの完全にプロセシングされるｓｇＲＮＡに対応する３つの区別されるＲＮＡ種を示した（図４９Ｂ）。

【０７７６】

標的スペーサーがｔｓｇＲＮＡ中の第１の位置に存在する場合、本出願人らは、個々にＵ６により転写されるｓｇＲＮＡと同一サイズの豊富な完全にプロセシングされるｓｇＲＮＡを観察した。しかしながら、第２の位置中に置かれた場合、微量の完全にプロセシングされるｓｇＲＮＡが存在したにすぎなかった。これと一致して、本出願人らは、微小欠失アッセイにおけるスペーサー順序の逆転が、ゲノム改変の効率を顕著に変更し得ることを観察した（データ示さず）。さらに、異なるゲノム遺伝子座を標的化するｓｇＲＮＡの他のペアを試験した場合、本出願人らは、同一のガイド配列が、第２の位置ではなく第１の位置に置かれた場合に典型的にはより良好な活性を有することを観察した（図４９Ｃ）。これらの観察は、ほとんどのスペーサーが単一ガイド転写物と適合性である一方、タンデムｓｇＲＮＡに関して第２のスペーサーの配列が第２のｓｇＲＮＡの活性に影響する可能性がより高いことがあることを示唆する。

【０７７７】

配列多様足場のペア形成は、より良好な第２のスペーサー活性をもたらす

第２のスペーサーの活性を最適化するため、本出願人らは、蛍光サイトメトリーによりその活性を評価するためのアッセイを考案した。Ｃａｓ９－２Ａ－ＧＦＰを発現するプラスミド中のＣａｓ９自体に対する第２のガイドを標的化することにより、本出願人らは、形質移入された細胞の蛍光分画および強度を計測することによりインデル活性を評価することができる（図５０Ａ）。本出願人らは、Ｃａｓ９を標的化する単一ｓｇＲＮＡにより細胞を形質移入すること、またはＣａｓ９標的化ｓｇＲＮＡと別のｓｇＲＮＡとを同時送達することにより、Ｃａｓ９－２Ａ－ＧＦＰ形質移入ＧＦＰ陽性分画の平均蛍光強度（ＭＦＩ）が顕著に低減する一方、Ｃａｓ９－２Ａ－ＥＧＦＰおよび非Ｃａｓ９標的化ｓｇＲＮＡにより形質移入された細胞は高いＭＦＩを維持することを観察した（図５０Ｂ）。

【０７７８】

各々のｓｇＲＮＡ足場が安定的な二次構造に折り畳まれることを必要とすることを所与として、本出願人らは、第２のスペーサーの活性の減少についての潜在的な理由は、単一のｓｇＲＮＡ足場内ではなく、２つのｓｇＲＮＡ足場間の二次構造相互作用に起因し得ることを仮定した。本出願人らは、互いに塩基対形成する可能性が低い多様な最小に相同性のｓｇＲＮＡ足場の使用が、ペア間の相互作用を低減し、個々の折り畳みを支援し得ることを推測した。この仮定を試験するため、本出願人らは、１２個の区別されるｓｇＲＮＡ

足場のセット（それぞれ第１のガイドはＧＲＩＮ２Ｂを標的化し、第２のガイドはＣａｓ９を標的化する）を設計し、全ての足場組合せのペアワイズ比較を実施した。後続のフローサイトメトリー分析は、ＧＦＰ陽性分画ンのＭＦＩおよびＧＦＰ陽性細胞の全体割合の両方を顕著に低減させる５つの潜在的な候補ｓｇＲＮＡ足場を同定し；低減のレベルは、単一転写されるＣａｓ９標的化ｓｇＲＮＡを形質移入することにより得られるものと類似する（図５０Ｃ）。足場間相互作用が適正なｓｇＲＮＡ折り畳みおよびプロセシングを破壊し得る留意と一致して、５つの足場のほとんどが、高度に相同性のｓｇＲＮＡとタンデムで転写された場合に比較的不十分な活性を示した。実際、１２個の足場の配列アラインメント分析は、最大活性を示すタンデム足場のペアが、２つのｓｇＲＮＡ間の最大の配列多様性を有することを示した（図５１）。まとめると、タンデムアレイｓｇＲＮＡは、単一ＲＮＡ転写物中の２つのｓｇＲＮＡの同時送達のために潜在的に有用なアプローチを表す。一部のガイド配列は第２の位置において十分機能すると考えられる一方、足場間配列多様性を最大化し、構造的安定性を改善するためのｓｇＲＮＡアーキテクチャの最適化は、タンデムｓｇＲＮＡのプロセシングおよび活性を支援する可能性が高い。ＰＢＳにより１回、トリプシン処理し、粉砕して単一細胞懸濁液にし、５％ＦＢＳおよび２ｍＭ　ＥＤＴＡを補足したＰＢＳ緩衝液中で再懸濁させた。続いて、Ａｃｃｕｒｉ　Ｃ６フローサイトメーターを使用して蛍光強度を計測した。

【０７７９】

考察

ＣＲＩＳＰＲによるゲノム編集のための二重ニッキングアプローチ

特異性は、特に高度に感受性の適用、例えば、原因遺伝子バリアントを生物学的過程または疾患表現型と関係付けることを目的とする研究について、永久的ゲノム変更を導入する場合に最も重要なものである。デザイナーヌクレアーゼ、例えば、ＺＦＮ６２およびＴＡＬＥＮ６３は、１５％超のオフターゲット活性を報告している。両方のアプローチが複合体に基づくことを所与として、タンパク質エンジニアリングを介する特異性の進化タンパク質－ＤＮＡ相互作用、予測または最適化は、完全に困難であることが証明され得る。これにもかかわらず、ＴＡＬＥＮ特異性を増加させる努力、例えば、タンパク質モノマーにより認識される塩基数の伸長がなされている。

【０７８０】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の標的化精度を改善するための戦略は、その２つの不可欠な成分、Ｃａｓ９ヌクレアーゼまたはｓｇＲＮＡのいずれかを最適化し得る。本出願人らの研究は、ガイド長さの伸長が特異性を改善しないことを示した一方、より短いガイド長さが公知のオフターゲット部位における非特異的活性を潜在的に顕著に減少させ得ることが近年報告されている。しかしながら、より短いガイド配列がゲノムにわたり候補類似標的の数も増加させることを所与として、この戦略が全体的なゲノムワイドオフターゲット突然変異頻度を減少させるか否かを依然として把握すべきである。ここで、本出願人らは、２つのｓｇＲＮＡとＣａｓ９ニッカーゼとの組合せが、効率的にＤＳＢを生成し得る一方、一本鎖ＤＮＡ切断突然変異から生じる突然変異誘発イベントを回避することを実証した。それというのも、それらは典型的には高フィデリティで修復されるためである。

【０７８１】

遺伝子修復または置換テンプレートの送達に関して、単一ｓｇＲＮＡを用いるＤＮＡのＣａｓ９ｎニッキングは、インデルを生成せずにＨＤＲを促進することが既に示されている。しかしながら、これは野生型Ｃａｓ９に対してその実施において実質的に効率的でなく、異なる細胞型間のＨＤＲ効率の差を生じ得る４８、５２。しかしながら、本出願人らは、２つの近接ガイドを使用してＣａｓ９ｎニッカーゼを同一ゲノム遺伝子座に標的化することが、高効率においてＨＤＲを媒介し得る一方、オフターゲット改変をバックグラウンドレベルに保持することを実証した。さらに、Ｃａｓ９二重ニッカーゼ媒介遺伝子標的化の成功を左右する間隔パラメータの特徴付けにより、逆鎖を標的化するｓｇＲＮＡが二重ニッキング適用についてペア形成し得る１００ｂｐを超える有効なウインドウが明らかとなり、それらの設計における高程度の柔軟性が許容される。本出願人らは、ヒトおよび

マウスの両方の細胞における複数の遺伝子座で二重ニッキング媒介性インデル頻度が野生型Ｃａｓ９改変と同等であることをさらに実証し、この高精度のゲノムエンジニアリング戦略の再現性を確認している。

【０７８２】

特異的な標的化インデル突然変異を増強する能力により、遺伝子ノックアウトによる機能的分析が大いに可能となるが、相同組換えを正確に標的化する二重ニッキングの使用は、モデル系および生物の生成における実用的意義を有する。ｓｇＲＮＡおよびＨＤＲテンプレートを用いるＣａｓ９ヌクレアーゼの胚盤胞注入は、条件的およびレポーターマウスを単一ステップで生成し得ることが報告されている。この知見は、そうでなければ労力を有する長期のプロセスを非常に能率化する一方、それぞれ胚盤胞中に注入される比較的高い用量のＣａｓ９　ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡは、オフターゲット改変についての現実的な懸念となり得る。実際、実験室の共同研究者および他のメンバーによる現在の研究は、２つのｓｇＲＮＡを用いるＣａｓ９ｎの類似の胚盤胞送達がマウスＭｅｃｐ２遺伝子座における効率的な標的化遺伝子改変を誘導し得ることを既に実証している。マウスモデル生成に関する相同組換えの促進における二重ニッキングアプローチの効率および特異性を調査するさらなる研究は、非常に有益である。

【０７８３】

顕著なオフターゲット突然変異誘発がヒト細胞中のＣａｓ９ヌクレアーゼについて既に報告されている一方、二重ニッキングアプローチは、迅速かつ正確なゲノム編集に向けた一般化可能な解決法を提供する。二重ニッキングが、ヘミヌクレアーゼドメインを利用してＤＳＢを誘導するＺＦＮおよびＴＡＬＥＮベースゲノム編集系と概念的に類似する場合であっても、ＲＮＡにガイドされるＤＮＡ標的化系を使用する容易性、柔軟性、および改善された予測性は、その潜在的な下流適用を顕著に増加させる。オフターゲット部位における協働的ニッキングがＺＦＮおよびＴＡＬＥＮに関して依然として生じ得ることが観察されていることを所与として、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系の真のゲノムワイドオフターゲット活性の顕著で完全な特徴付けは、依然として効率的な超高精度のゲノム編集の手段としてのそのさらなる開発への前提条件である。たとえそうでも、本出願人らは、Ｃａｓ９ｎを用いる二重ニッキングが、基礎科学研究および医療の両方におけるゲノム操作のための多用途ツールとしてのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系を確立における着実な前進を表すと考える。

【０７８４】

ｓｇＲＮＡ最適化およびタンデムｓｇＲＮＡの作出

ｔｒａｃｒＲＮＡおよびｃｒＲＮＡのエレメントからのキメラｓｇＲＮＡ４１の初期誘導後、後続のｓｐ８５　ｓｇＲＮＡ足場４０、４８が全長ｔｒａｃｒＲＮＡから開発され、ゲノム編集適用に使用される最も一般的なアーキテクチャになった。しかしながら、ｓｇＲＮＡ安定性を改善することを目的とする比較的少数の研究は別として、ｓｇＲＮＡ構造－機能関係の詳細マッピングも、配列置換を介するｓｇＲＮＡアーキテクチャの最適化も依然として何ら報告されていない。本出願人らが実施した標的化機能的研究により、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系についての適用の範囲を広げ得るさらなる改変または官能基の付加に適し得るｓｇＲＮＡ内の多数の領域が同定された。特に、広範囲の足場改変を試験したにもかかわらず、本出願人らは、Ｃａｓ９のインデル活性を顕著に改善する変化をほとんど観察しなかった。ヌクレアーゼと相互作用するｓｇＲＮＡの構造－機能関係のさらなる解明は、オンターゲット効率をさらに獲得することを可能とし得るｓｇＲＮＡおよびＣａｓ９の両方の同時のより標的化される変化の作製において有用である。

【０７８５】

リボヌクレアーゼＲＮアーゼＩＩＩは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系中のｔｒａｃｒＲＮＡへの結合後にｃｒＲＮＡのプロセシングおよび成熟に必要であると示されている。しかしながら、５’末端におけるプロセシングは、微生物および真核生物コンテクストの両方において大部分は不明のままである。ネイセリア属種（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｓｐｐ．）ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡプロセシングのプロセシングを調査する近年の報告は、個々のｃｒＲＮ

Ａ単位の転写をドライブするそれぞれのスペーサー配列に先行するダイレクトリピート中に局在する転写プロモーターを同定した。本出願人らは、３０ｎｔへのスペーサー配列の伸びがより長いｓｇＲＮＡをもたらさないことを既に観察している。ノザンブロット分析は、２０ｎｔガイド配列を有するｓｇＲＮＡと依然として同一の長さの転写物を示す。さらに、たとえ低レベルにおいてもｔｓｇＲＮＡの第２の位置からｓｇＲＮＡ単位が完全にプロセシングされ得るという本出願人らの観察は、ｓｇＲＮＡの末端成熟に関与する潜在的なエンドヌクレアーゼの存在を指摘し得る。

ＲＮＡシーケンシング分析は、ＣＲＩＳＰＲアレイのプロモーター近位末端において局在するスペーサーが、より遠位に局在するものよりも多く存在する傾向にあることを示しており、転写プロセシング性が成熟ｃｒＲＮＡ単位の相対効率の決定における重要なパラメータであり得ることを示唆する。本出願人らの知見と一致して、この試験は、隣接ＲＮＡと二次相互作用を形成すると予測されるあるスペーサー配列が不足していることが多いことも報告する。したがって、合成ＣＲＩＳＰＲアレイを開発する間、スペーサー配列の考慮の重要性はますます増加していく可能性が高い。

類似したＲＮＡｉライブラリーよりも大きい再現性および感度を示している、ゲノムワイドノックアウトスクリーンのためのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９レンチウイルスライブラリーを使用する多数の近年の研究が存在している。２つ以上の単一ガイドＲＮＡを単一ベクター上で同時に送達する能力は、レンチウイルススクリーニング法のコンテクストにおいて特に興味深く、それは高スループット欠失およびペアワイズスクリーンの両方を可能とする。一般に使用されるｓｈＲＮＡライブラリーのコンテクストにおいて、組み換わるレンチウイルスの傾向は、単一ベクターからの複数のショートＲＮＡの発現をドライブする本発明者らの能力を制限し、複数のユニークプロモーターの利用が要求された。依然として、いかに多くのｓｇＲＮＡを効率的にタンデムでアレイさせることができるかを把握すべきであるが、このアプローチは、単一プロモーターが少なくとも２つのｓｇＲＮＡの発現をドライブすることを可能とする。さらに、配列多様性を示すが構造的に類似したｓｇＲＮＡ足場が活性のままであり得るという知識は、構造的エレメント間の組換えが制限されてきた種々の用途において有用である。

【０７８６】

## 表D.最適な間隔を同定するためのsgRNAペアのリスト

| 遺伝子 | オーバーハング長さ(bp) | オーバーハングタイプ | オフセット長さ(bp) | 左sgRNA ID | 右sgRNA ID | 左および右sgRNAを用いるCas9nのインデル(%) | 左sgRNA標的部位 ガイド配列(5'から3') | PAM | 野生型Cas9を用いる左sgRNAのインデル(%) | 右sgRNA標的部位 ガイド配列(5'から3') | PAM | 野生型Cas9を用いる右sgRNAのインデル(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *EMX1* | 148 | 3' | -182 | 15 | 4 | N.D. | TGCGCCACCGGTTGATGTGA | TGG | 13.15 | AGGCCCCAGTGGCTGCTCTG | GGG | 27.29 |
| *EMX1* | 101 | 3' | -135 | 23 | 1 | N.D. | ACTCTGCCCTCGTGGGTTTG | TGG | 24.7 | GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA | GGG | 21.9 |
| *EMX1* | 48 | 3' | -82 | 23 | 17 | N.D. | ACTCTGCCCTCGTGGGTTTG | TGG | 24.7 | CACGAAGCAGGCCAATGGGG | AGG | 13.57 |
| *EMX1* | 25 | 3' | -59 | 10 | 13 | N.D. | CAAACGGCAGAAGCTGGAGG | AGG | 26.15 | GGAGCCCTTCTTCTTCTGCT | CGG | 33.17 |
| *EMX1* | 15 | 3' | -49 | 4 | 5 | N.D. | AGGCCCCAGTGGCTGCTCTG | GGG | 27.29 | GGGGCACAGATGAGAAACTC | AGG | 26.56 |
| *EMX1* | 8 | 3' | -42 | 7 | 9 | N.D. | TGAAGGTGTGGTTCCAGAAC | CGG | 36.02 | GCCGTTTGTACTTTGTCCTC | CGG | 30.49 |
| *EMX1* | 26 | 5' | -8 | 9 | 19 | 13.7 ± 1.27 | GCCGTTTGTACTTTGTCCTC | CGG | 9.82 | GGCAGAGTGCTGCTTGCTGC | TGG | 26.15 |
| *EMX1* | 30 | 5' | -4 | 9 | 10 | 19.72 ± 0.32 | GCCGTTTGTACTTTGTCCTC | CGG | 30.49 | CAAACGGCAGAAGCTGGAGG | AGG | 22.06 |
| *EMX1* | 31 | 5' | -3 | 6 | 7 | 21.35 ± 2.23 | TCACCTGGGCCAGGGAGGGA | GGG | 10.75 | TGAAGGTGTGGTTCCAGAAC | CGG | 36.02 |
| *EMX1* | 34 | 5' | 0 | 15 | 16 | 26.89 ± 1.54 | TGCGCCACCGGTTGATGTGA | TGG | 13.15 | TTGCCACGAAGCAGGCCAAT | GGG | 13.77 |
| *EMX1* | 38 | 5' | 4 | 15 | 17 | 36.31 ± 2.97 | TGCGCCACCGGTTGATGTGA | TGG | 14.49 | CACGAAGCAGGCCAATGGGG | AGG | 13.57 |
| *EMX1* | 51 | 5' | 17 | 5 | 7 | 31.12 ± 0.25 | GGGGCACAGATGAGAAACTC | AGG | 26.56 | TGAAGGTGTGGTTCCAGAAC | CGG | 36.02 |
| *EMX1* | 54 | 5' | 20 | 5 | 8 | 32.41 ± 3.68 | GGGGCACAGATGAGAAACTC | AGG | 26.56 | AGGTGTGGTTCCAGAACCGG | AGG | 35.53 |
| *EMX1* | 65 | 5' | 31 | 6 | 10 | 13.45 ± 1.99 | TCACCTGGGCCAGGGAGGGA | GGG | 10.75 | CAAACGGCAGAAGCTGGAGG | AGG | 26.15 |
| *EMX1* | 69 | 5' | 35 | 6 | 11 | 12.39 ± 1.29 | TCACCTGGGCCAGGGAGGGA | GGG | 10.75 | CGGCAGAAGCTGGAGGAGGA | AGG | 22.06 |
| *EMX1* | 76 | 5' | 42 | 9 | 14 | 21.71 ± 1.66 | GCCGTTTGTACTTTGTCCTC | CGG | 30.49 | AGGGCTCCCATCACATCAAC | CGG | 41.27 |
| *EMX1* | 85 | 5' | 51 | 5 | 10 | 21.89 ± 1.88 | GGGGCACAGATGAGAAACTC | AGG | 26.56 | CAAACGGCAGAAGCTGGAGG | AGG | 26.15 |
| *EMX1* | 95 | 5' | 61 | 6 | 12 | 5.88 ± 1.81 | TCACCTGGGCCAGGGAGGGA | GGG | 10.75 | TGAGTCCGAGCAGAAGAAGA | AGG | 29.06 |
| *EMX1* | 135 | 5' | 101 | 5 | 14 | 15.78 ± 2.19 | GGGGCACAGATGAGAAACTC | AGG | 26.56 | AGGGCTCCCATCACATCAAC | CGG | 41.27 |
| *EMX1* | 145 | 5' | 111 | 6 | 16 | N.D. | TCACCTGGGCCAGGGAGGGA | GGG | 10.75 | TTGCCACGAAGCAGGCCAAT | GGG | 13.77 |
| *EMX1* | 181 | 5' | 147 | 6 | 18 | N.D. | TCACCTGGGCCAGGGAGGGA | GGG | 10.75 | TCACCTCCAATGACTAGGGT | GGG | 25.14 |
| *EMX1* | 201 | 5' | 167 | 5 | 18 | N.D. | GGGGCACACATGAGAAACTC | AGG | 26.56 | TCACCTCCAATGACTAGGGT | GGG | 25.14 |
| *EMX1* | 222 | 5' | 188 | 6 | 19 | N.D. | TCACCTGGGCCAGGGAGGGA | GGG | 10.75 | GGCAGAGTGCTGCTTGCTGC | TGG | 10.75 |
| *EMX1* | 242 | 5' | 208 | 5 | 19 | N.D. | GGGGCACAGATGAGAAACTC | AGG | 26.56 | GGCAGAGTGCTGCTTGCTGC | TGG | 17.22 |
| *DYRK1A* | 164 | 3' | -198 | 34 | 47 | N.D. | ATCTGGTCAGAATATGATAA | AGG | 10.65 ± 2.05 | AACCTCACTTATCTTCTTGT | AGG | 19.02 ± 4.32 |
| *DYRK1A* | 105 | 3' | -139 | 35 | 47 | N.D. | GTCACTGTACTGATGTGAAT | TGG | 16.71 ± 2.47 | AACCTCACTTATCTTCTTGT | AGG | 17.04 ± 1.30 |
| *DYRK1A* | 66 | 3' | -100 | 36 | 48 | N.D. | CATCTGAAGGCCAGCAGCAT | TGG | 8.82 ± 1.01 | CTCACTTATCTTCTTGTAGG | AGG | 18.79 ± 2.71 |
| *DYRK1A* | 25 | 3' | -59 | 35 | 49 | N.D. | GTCACTGTACTGATGTGAAT | TGG | 17.83 ± 0.43 | CCATGCTGCTGGCCTTCAGA | TGG | 17.15 ± 3.29 |
| *DYRK1A* | 4 | 3' | -38 | 37 | 31 | N.D. | TGATAAGGCAGAAACCTGTT | TGG | 4.95 ± 0.66 | GCCAAACATAAGTGACCAAC | AGG | 16.38 ± 3.39 |
| *DYRK1A* | 17 | 5' | -17 | 38 | 47 | N.D. | GAAGATAAGTGAGGTTTAAA | AGG | 5.30 ± 1.98 | AACCTCACTTATCTTCTTGT | AGG | 24.18 ± 3.22 |
| *DYRK1A* | 21 | 5' | -13 | 39 | 33 | 10.54 ± 0.63 | GTATCATTTGACATATCTAA | TGG | 26.90 ± 1.17 | TGTCAAATGATACAAACATT | AGG | 29.69 ± 0.86 |
| *DYRK1A* | 25 | 5' | -9 | 40 | 49 | 2.33 ± 0.11 | CAGCATGGAATGAAAATGAC | CGG | 3.33 ± 0.56 | CCATGCTGCTGGCCTTCAGA | TGG | 20.43 ± 2.40 |
| *DYRK1A* | 29 | 5' | -5 | 41 | 50 | 27.76 ± 0.84 | GCAGCATGGAATGAAAATGA | CGG | 17.84 ± 5.46 | GCTGCTGGCCTTCAGATGGC | TGG | 21.92 ± 3.46 |
| *DYRK1A* | 33 | 5' | -1 | 34 | 51 | 10.42 ± 0.90 | ATCTGGTCAGAATATGATAA | AGG | 9.13 ± 2.32 | TCAGCAACCTCTAACTAACC | AGG | 24.14 ± 2.95 |
| *DYRK1A* | 35 | 5' | 1 | 42 | 52 | 7.63 ± 0.51 | GTGCAAGCCGAACAGATGAA | AGG | 6.65 ± 2.19 | TCATTTTCATTCCATGCTGC | TGG | 20.61 ± 3.64 |

N.D.:不検出

【表６８】

| 遺伝子 | オーバーハング長さ(bp) | オーバーハングタイプ | オフセット長さ(bp) | 左sgRNA ID | 右sgRNA ID | 左および右sgRNAを用いるCas9nのインデル(%) | 左sgRNA標的部位 ガイド配列(5'から3') | 左sgRNA標的部位 PAM | 左sgRNA標的部位 野生型Cas9を用いる左sgRNAのインデル(%) | 右sgRNA標的部位 ガイド配列(5'から3') | 右sgRNA標的部位 PAM | 右sgRNA標的部位 野生型Cas9を用いる右sgRNAのインデル(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *DYRK1A* | 36 | 5' | 2 | 28 | 29 | 38.46 ± 0.74 | GGAGTATCAGAAATGACTAT | TGG | 20.88 ± 9.09 | GGAGTATCAGAAATGACTAT | TGG | 30.3 ± 0.7 |
| *DYRK1A* | 41 | 5' | 7 | 30 | 31 | 34.41 ± 0.87 | GGTCACTGTACTGATGTGAA | TGG | 25.68 ± 5.95 | GCCAAACATAAGTGACCAAC | AGG | 33.1 ± 0.4 |
| *DYRK1A* | 42 | 5' | 8 | 43 | 31 | 38.36 ± 0.32 | TCACTGTACTGATGTGAATG | GGG | 24.68 ± 4.58 | GCCAAACATAAGTGACCAAC | AGG | 29.46 ± 3.30 |
| *DYRK1A* | 43 | 5' | 9 | 32 | 33 | 28.97 ± 0.32 | GTTCCTTAAATAAGAACTTT | AGG | 23.60 ± 2.56 | TGTCAAATGATACAAACATT | AGG | 22.4 ± 1.6 |
| *DYRK1A* | 46 | 5' | 12 | 44 | 53 | 11.90 ± 1.65 | TCCTACAAGAAGATAAGTGA | AGG | 6.57 ± 1.36 | CATGCAAACCTTCATCTGTT | CGG | 30.42 ± 1.14 |
| *DYRK1A* | 77 | 5' | 43 | 36 | 31 | 6.63 ± 0.27 | CATCTGAAGGCCAGCAGCAT | TGG | 10.02 ± 1.17 | GCCAAACATAAGTGACCAAC | AGG | 22.92 ± 5.16 |
| *DYRK1A* | 86 | 5' | 52 | 38 | 52 | N.D. | GAAGATAAGTGACGTTTAAA | AGG | 2.90 ± 0.82 | TCATTTTCATTCCATGCTGC | TGG | 17.30 ± 1.62 |
| *DYRK1A* | 97 | 5' | 63 | 38 | 49 | N.D. | GAAGATAAGTGAGGTTTAAA | AGG | 2.16 ± 0.48 | CCATGCTGCTGGCCTTCAGA | TGG | 24.75 ± 2.56 |
| *DYRK1A* | 131 | 5' | 97 | 45 | 52 | N.D. | TATCATTTGACATATCTAAT | TGG | 8.21 ± 2.83 | TCATTTTCATTCCATGCTGC | TGG | 14.61 ± 4.10 |
| *DYRK1A* | 155 | 5' | 121 | 44 | 31 | N.D. | TCCTACAAGAAGATAAGTGA | AGG | 9.99 ± 4.12 | GCCAAACATAAGTGACCAAC | AGG | 19.74 ± 2.91 |
| *DYRK1A* | 191 | 5' | 157 | 46 | 52 | N.D. | AACTTTTCTAACTACAAACA | AGG | 5.74 ± 2.24 | TCATTTTCATTCCATGCTGC | TGG | 21.37 |
| *GRIN2B* | 165 | 3' | -199 | 70 | 82 | N.D. | CCAACACCAACCAGAACTTG | GGG | 2.95 ± 0.21 | CTGGTAGATGGAGTTGGGTT | TGG | 17.25 ± 1.30 |
| *GRIN2B* | 67 | 3' | -101 | 71 | 83 | N.D. | ACAGCAATGCCAATGCTGGG | GGG | 18.00 ± 2.31 | AGTGCTGTTCTCCCAAGTTC | TGG | 28.64 ± 0.69 |
| *GRIN2B* | 42 | 3' | -76 | 72 | 84 | N.D. | GTGGAAATCATCTTTCTCGT | TGG | 14.56 ± 7.84 | GGCATTGCTGTCATCCTCGT | GGG | 21.36 ± 2.68 |
| *GRIN2B* | 16 | 3' | -50 | 73 | 85 | N.D. | TCTGCTGCCTGACACGGCCA | AGG | 4.24 ± 0.79 | TCCCAAGTTCTGGTTGGTGT | TGG | 19.64 ± 0.23 |
| *GRIN2B* | 2 | 3' | -36 | 74 | 86 | N.D. | CGAGCTCTGCTGCCTGACAC | CGG | 2.99 ± 0.31 | TTGGCCGTCCTGGCCGTGTC | AGG | 4.74 ± 0.45 |
| *GRIN2B* | 9 | 5' | -25 | 75 | 87 | 1.04 ± 0.53 | TCCTTGATGGCCACCTCGTC | CGG | 2.25 ± 1.08 | TTCCGACCAAGGTGGCCATCA | AGG | 17.13 ± 2.90 |
| *GRIN2B* | 18 | 5' | -46 | 76 | 88 | 5.93 ± 1.25 | ATGACAGCAATGCCAATGCT | TGG | 16.46 ± 2.28 | TGGCATTGCTGTCATCCTCG | TGG | 16.35 ± 1.25 |
| *GRIN2B* | 23 | 5' | -11 | 77 | 88 | 2.28 ± 0.34 | AGCAATGCCAATGCTGGGGG | GGG | 3.19 ± 0.51 | TGGCATTGCTGTCATCCTCG | TGG | 15.17 ± 2.02 |
| *GRIN2B* | 28 | 5' | -6 | 78 | 86 | 1.45 ± 0.12 | GCCAACACCAACCAGAACTT | TGG | 17.80 ± 2.39 | TTGGCCGTCCTGGCCGTGTC | AGG | 4.46 ± 1.35 |
| *GRIN2B* | 30 | 5' | -4 | 69 | 85 | 11.80 ± 0.29 | GGAGAACAGCCACTCCGCTCT | TGG | 21.80 ± 1.40 | TCCCAAGTTCTGGTTGGTGT | TGG | 21.33 ± 0.63 |
| *GRIN2B* | 33 | 5' | -1 | 76 | 65 | 24.24 ± 0.23 | ATGACAGCAATGCCAATGCT | TGG | 19.48 ± 1.88 | CCTCGTGGGCACTTCCGACG | AGG | 21.89 ± 3.42 |
| *GRIN2B* | 34 | 5' | 0 | 79 | 65 | 30.83 ± 0.95 | TGACAGCAATGCCAATGCTG | GGG | 21.41 ± 3.02 | CCTCGTGGGCACTTCCGACG | AGG | 24.51 ± 0.14 |
| *GRIN2B* | 36 | 5' | 2 | 58 | 59 | 31.76 ± 1.00 | CCGGCCAAGACCTTGAAGCC | AGG | 32.50 ± 0.50 | CTGGTTGTAGGATTTGAGTT | AGG | 26.7 ± 2.9 |
| *GRIN2B* | 38 | 5' | 4 | 54 | 55 | 34.45 ± 0.45 | TATTACAGAATGAGAGACTG | TGG | 30.90 ± 1.40 | TTATTTCTGAAGAATTATTAA | AGG | 27.6 ± 2.5 |
| *GRIN2B* | 38 | 5' | 4 | 56 | 57 | 44.22 ± 0.55 | AAAAGACCTAAACACAAAAGAA | TGG | 23.20 ± 2.10 | TGTGTGAGGATAAAAGAGTT | GGG | 29.4 ± 2.7 |
| *GRIN2B* | 38 | 5' | 4 | 77 | 65 | 9.60 ± 0.25 | AGCAATGCCAATGCTGGGGG | GGG | 4.19 ± 0.58 | CCTCGTGGGCACTTCCGACG | AGG | 21.78 ± 1.70 |
| *GRIN2B* | 40 | 5' | 6 | 60 | 61 | 42.54 ± 1.39 | TCAGAGCTTCCTGACACCCA | TGG | 14.20 ± 1.50 | AATACCTAGTTACAGGCATT | TGG | 24.8 ± 1.0 |
| *GRIN2B* | 45 | 5' | 11 | 76 | 87 | 18.96 ± 0.93 | ATGACAGCAATGCCAATGCT | TGG | 20.45 ± 0.98 | TTCCGACCAGGTGGCCATCA | AGG | 13.21 ± 0.74 |
| *GRIN2B* | 50 | 5' | 16 | 77 | 87 | 5.33 ± 0.57 | AGCAATGCCAATGCTGGGGG | GGG | 4.93 ± 2.06 | TTCCGACCAGGTGGCCATCA | AGG | 12.51 ± 1.21 |
| *GRIN2B* | 89 | 5' | 55 | 80 | 89 | 7.31 ± 0.83 | GAGAACAGCACTCCGCTCTG | GGG | 3.09 ± 0.54 | CAGAAGAGCCCCCCCAGCAT | TGG | 25.02 ± 1.86 |
| *GRIN2B* | 105 | 5' | 71 | 78 | 90 | 10.56 ± 1.21 | GCCAACACCAACCAGAACTT | TGG | 25.29 ± 1.65 | CGTGGGCACTTCCGACGAGG | TGG | 23.32 ± 0.78 |
| *GRIN2B* | 132 | 5' | 98 | 81 | 67 | 2.66 ± 0.89 | CTGCCTGACACGGCCAGGAC | CGG | 4.34 ± 0.62 | TGATTTCCACCATCTCTCCG | TGG | 20.95 ± 0.79 |
| *GRIN2B* | 175 | 5' | 141 | 80 | 67 | N.D. | GAGAACAGCACTCCGCTCTG | GGG | 2.96 ± 0.93 | TGATTTCCACCACATCTCTCG | TGG | 19.77 ± 2.20 |
| *GRIN2B* | 231 | 5' | 197 | 81 | 91 | N.D. | CTGCCTGACACGGCCAGGAC | CGG | 6.17 ± 2.09 | TGACCGGAAGATCCAGGGGG | TGG | 23.36 ± 2.34 |

N.D.:不検出

【０７８８】

【表６９】

***表E:本試験において使用したsgRNAのリスト***

| 遺伝子 | sgRNA ID | ガイド配列(5'から3') | PAM | 鎖 | 種 |
|---|---|---|---|---|---|
| *EMX1* | 1 | GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA | GGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 2 | GGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAGAAGA | GGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 3 | GGCCTCCAAGGAGTCCGAGCAGAAGAAGAA | GGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 4 | AGGCCCCAGTGGCTGCTCTG | GGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 5 | GGGGCACAGATGAGAAACTC | AGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 6 | TCACCTGGGCCAGGCAGGGA | GGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 7 | TGAAGGTGTGCTTCCAGAAC | CGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 8 | AGGTGTGGTTCCAGAACCGG | AGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 9 | GCCGTTTGTACTTTGTCCTC | CGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 10 | CAAACGGCAGAAGCTGGAGG | AGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 11 | CGGCAGAAGCTGGAGGAGGA | AGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 12 | TGAGTCCGAGCAGAAGAAGA | AGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 13 | GGAGCCCTTCTTCTTCTGCT | CGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 14 | AGGGCTCCCATCACATCAAC | CGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 15 | TGCGCCACCGGTTGATGTGA | TGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 16 | TTGCCACGAAGCAGGCCAAT | GGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 17 | CACGAAGCAGGCCAATGGGG | AGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 18 | TCACCTCCAATGACTAGGGT | GGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 19 | GGCAGAGTGCTGCTTGCTGC | TGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 20 | GACATCGATGTCCTCCCCAT | TGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 21 | GTCACCTCCAATGACTAGGG | TGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 22 | GGCCAACCACAAACCCACGA | GGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 23 | ACTCTGCCCTCGTGGGTTTG | TGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 24 | CAAGCAGCACTCTGCCCTCG | TGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 25 | TTCTTCTTCTGCTCGGACTC | AGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 26 | CTCCCCATTGGCCTGCTTCG | AGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *EMX1* | 27 | GTCACCTCCAATGACTAGGG | TGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 28 | GAACTTACCTCGTTACTTAC | AGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 29 | GGAGTATCAGAAATGACTAT | TGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 30 | GGTCACTGTACTGATGTGAA | TGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 31 | GCCAAACATAAGTGACCAAC | AGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 32 | GTTCCTTAAATAACAACTTT | AGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 33 | TGTCAAATGATACAAACATT | AGG | + | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 34 | ATCTGGTCAGAATATGATAA | AGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 35 | GTCACTGTACTGATGTGAAT | TGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 36 | CATCTGAAGGCCAGCAGCAT | TGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 37 | TGATAAGGCAGAAACCTGTT | TGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 38 | GAAGATAAGTGAGGTTTAAA | AGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 39 | GTATCATTTGACATATCTAA | TGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 40 | CAGCATGGAATGAAAATGAC | CGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 41 | GCAGCATGGAATGAAAATGA | CGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 42 | GTCCAAGCCGAACAGATGAA | AGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 43 | TCACTGTACTGATGTGAATG | GGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 44 | TCCTACAAGAAGATAAGTGA | AGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 45 | TATCATTTGACATATCTAAT | TGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |
| *DYRK1A* | 46 | AACTTTTCTAACTACAAACA | AGG | − | ヒト(*H.sapiens*) |

【０７８９】

【表７０】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| DYRK1A | 47 | AACCTCACTTATCTTCTTGT | AGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 48 | CTCACTTATCTTCTTGTAGG | AGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 49 | CCATGCTGCTGGCCTTCAGA | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 50 | GCTGCTGGCCTTCAGATGGC | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 51 | TCAGCAACCTCTAACTAACC | AGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 52 | TCATTTTCATTCCATGCTGC | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 53 | CATGCAAACCTTCATCTGTT | CGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 54 | TATTACAGAATGAGAGACTG | TGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 55 | TTATTTCTGAAGAATATTAA | AGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 56 | AAAAGACCTAAACAAAAGAA | TGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 57 | TGTGTGAGGATAAAAGAGTT | GGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 58 | CCGGCCAAGACCTTGAAGCC | AGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 59 | CTGGTTGTAGGATTTGAGTT | AGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 60 | TCAGAGCTTCCTGACACCCA | TGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| DYRK1A | 61 | AATACCTAGTTACAGGCATT | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 62 | GGTGATGATGCTCTTTGGGT | CGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 63 | TCTGTGATCTCATGTCTGAC | CGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 64 | CAGCAATGCCAATGCTGGGG | GGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 65 | CCTCGTGGGCACTTCCGACG | AGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 66 | TTTCTCGTGGGCATCCTTGA | TGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 67 | TGATTTCCACCATCTCTCCG | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 68 | GGAGAACAGCACTCCGCTCT | GGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 69 | CTGGTTGGTGTTGGCCGTCC | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 70 | CCAACACCAACCAGAACTTG | CGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 71 | ACAGCAATGCCAATGCTGGG | GGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 72 | GTCGAAATCATCTTTCTCGT | TGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 73 | TCTGCTGCCTGACACGGCCA | AGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 74 | CGAGCTCTGCTGCCTGACAC | CGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 75 | TCCTTGATGGCCACCTCGTC | CGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 76 | ATGACAGCAATGCCAATGCT | TGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 77 | AGCAATGCCAATGCTGGGGG | GGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 78 | GCCAACACCAACCAGAACTT | TGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 79 | TGACAGCAATGCCAATGCTG | GGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 80 | GAGAACAGCACTCCGCTCTG | GGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 81 | CTGCCTGACACGGCCAGGAC | CGG | - | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 82 | CTGGTAGATGGAGTTGGGTT | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 83 | AGTGCTGTTCTCCCAAGTTC | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 84 | GGCATTGCTGTCATCCTCGT | GGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 85 | TCCCAAGTTCTGGTTGGTGT | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 86 | TTGGCCGTCCTGGCCGTGTC | AGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 87 | TTCCGACGAGGTGGCCATCA | AGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 88 | TGGCATTGCTGTCATCCTCG | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 89 | CAGAAGAGCCCCCCCAGCAT | TCG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 90 | CGTGGGCACTTCCGACGAGG | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |
| GRIN2B | 91 | TGACCGGAAGATCCAGGGGG | TGG | + | ヒト(H.sapiens) |

【０７９０】

【表７１】

***表F.本試験において使用したsgRNA足場のリスト***

| sgRNA足場 | 長さ | 配列 |
|---|---|---|
| 野生型sp85 | 81 | gttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttGAAAaagtggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| バルジをG-Cペアにより置き換える | 79 | gttttagCgctaGAAAtagcGttaaaataaggctagtccgttatcaacttGAAAaagtggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| PDRをCCGGトレースにより置き換え、バルジを除去する | 79 | gCCGGCgCgctaGAAAtagcGtGCCGGtaaggctagtccgttatcaacttGAAAaagtggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| PDRをCCGGトラクトにより置き換え、バルジを維持する | 71 | gCCGGCgCGAAAGtGCCGGtaaggctagtccgttatcaacttGAAAaagtggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| PDRを短縮し、バルジを除去する | 81 | gCCGGCgagctaGAAAtagcaagtGCCGGtaaggctagtccgttatcaacttGAAAaagtggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| PDRをCCCCトラクトにより置き換える | 80 | gccccagagctagaaatagcaagttgggqtaaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcttt |
| バルジランダム化 | 81 | gttttagagctaGAAAtagcNNNNtaaaataaggctagtccgttatcaacttGAAAaagtggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| リンカートランケーション、前半 | 72 | gttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtacttGAAAaagtggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| リンカートランケーション、後半 | 63 | gttttagagctaGAAAtagcaagttaaaatacttGAAAaagtggcaccgAGTcggtgcTTTT |
| リンカースクランブル | 81 | gttttagagctaGAAAtagcaagttaaaatagatcgtatacatcattaacttGAAAaagtggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| リンカーランダム化 | 81 | gttttagagctaGAAAtagcaagttaaaatNNNNNNNNNNNNNNNNacttGAAAaagtggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| ステム2をG-Cトラックにより置き換える | 81 | gttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaCGCCGAAAGGCGggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| ステム2を2bpだけ伸長させる | 85 | gttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaGAAAtcaagtggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| ステム3をG-Cトラックにより置き換える | 80 | gttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagcggcggcgctttt |
| ステム3を伸ばす（3bp付加） | 84 | gttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgaaagtttcggtgctttt |
| 4558 | 82 | gttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaCGCCGAAAGGCGggcaccgAGTcggtgccTTTTT |
| 4561 | 92 | gttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaccttgggccGAAAggcccaagggcggccgAGTcggcgccTTTT |
| 4638 | 82 | gttttagagccgAAAcggcaagttaaaataaggctagtccgttatcaCGCCGAAAGGCGggcaccgAGTcggtgccTTTTT |
| Opt1CCCC | 81 | gccccagCgctaGAAAtagcaagttgggqtaaggctagtccgttatcaCGCCGAAAGGCGggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| Opt1CTTC | 81 | gcttcagCgctaGAAAtagcaagttgaagtaaggctagtccgttatcaCGCCGAAAGGCGggcaccgAGTcggtgcTTTTT |
| Scrmb11 | 92 | gttttagatgcaattatgcaaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttatacaataagtcatcgtcgagAAGctcgacgatgTTTT |
| Scrmb12 | 92 | gttttagaactcattagagtaagttaaaataaggctagtccgttatcaacatgcaccagcatgttcaggattcaAAGtgaatcctgaTTTT |
| ShScrmbl1 ポリC | 82 | gccccagatgcaattatgcaaagttgggqtaaggcaagtccgttatcaaccgaccacggtcacgtcgAAGcgacgtgTTTTT |
| ShScrmbl1 CTTC | 82 | gcttcagatgcaattatgcaaagttgaagtaaggcaagtccgttatcacctgaccacagggtgtcgtAAGacgacacTTTTT |
| より短いScrmbl1 ポリC | 77 | gccccagaccattggaagttgcggtaaggcaagtccgttatcaaccgaccacggtcacgtcgAAGcgacgtgTTTTT |
| より短いScrmbl1 CTTC | 77 | gcttcagaggattccaagttgaagtaaggcaagtccgttatcacctgaccacagggtgtcgtAAGacgacacTTTTT |

【０７９１】

【表７２】

***表G.SURVEYORアッセイに使用したプライマー***

| プライマー名 | ゲノム標的 | 配列 |
|---|---|---|
| SUV901 | *EMX1* | CCATCCCCTTCTGTGAATGT |
| SUV902 | *EMX1* | GGAGATTGGAGACACGGAGA |
| DYRK1A-F | *DYRK1A* | GGAGCTGGTCTGTTGGAGAA |
| DYRK1A-R | *DYRK1A* | TCCCAATCCATAATCCCACGTT |
| GRIN2B-F | *GRIN2B* | CAGGAGGGCCAGGAGATTTG |
| GRIN2B-R | *GRIN2B* | TGAAATCGAGGATCTGGGCG |

【０７９２】

【表７３】

*表H.NGSについてのアンプリコンを生成するために使用したプライマー*

| プライマー名 | 配列 |
|---|---|
| EMX1-F | GGAGGACAAAGTACAAACGGC |
| EMX1-R | ATCGATGTCCTCCCCATTGG |
| EMX1-HR-F | CCATCCCCTTCTGTGAATGT |
| EMX1-HR-R | GGAGATTGGAGACACGGAGA |
| EMX1-OT1.1-F | TGGGAGAGAGACCCCTTCTT |
| EMX1-OT1.1-R | TCCTGCTCTCACTTAGACTTTCTC |
| EMX1-OT1.2-F | GACATTCCTCCTGAGGGAAAA |
| EMX1-OT1.2-R | GATAAAATGTATTCCTTCTCACCATTC |
| EMX1-OT1.3-F | CCAGACTCAGTAAAGCCTGGA |
| EMX1-OT1.3-R | TGGCCCCAGTCTCTCTTCTA |
| EMX1-OT1.4-F | CACGGCCTTTGCAAATAGAG |
| EMX1-OT1.4-R | CATGACTTGGCCTTTGTAGGA |

【０７９３】

本発明の好ましい実施形態を本明細書に図示および記載したが、当業者には、かかる実施形態が単に例として提供されることは明らかであろう。ここで多数の変形例、変更例、および代替例が、当業者には本発明から逸脱することなく想起されるであろう。本明細書に記載される発明の実施形態の様々な代替例を本発明の実施に用い得ることが理解されなければならない。

【０７９４】

参考文献

1. Ding, Q. et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. Cell Stem Cell 12, 238-251 (2013).
2. Soldner, F. et al. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. Cell 146, 318-331 (2011).
3. Carlson, D. F. et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 17382-17387 (2012).
4. Geurts, A. M. et al. Knockout Rats via Embryo Microinjection of Zinc-Finger Nucleases. Science 325, 433-433 (2009).
5. Takasu, Y. et al. Targeted mutagenesis in the silkworm Bombyx mori using zinc finger nuclease mRNA injection. Insect Biochem Molec 40, 759-765 (2010).
6. Watanabe, T. et al. Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nu

cleases. Nat Commun 3 (2012).
7. Porteus, M. H. & Baltimore, D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. Science 300, 763 (2003).
8. Miller, J. C. et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. Nat Biotechnol 25, 778-785 (2007).
9. Sander, J. D. et al. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). Nat Methods 8, 67-69 (2011).
10. Wood, A. J. et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. Science 333, 307 (2011).
11. Christian, M. et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics 186, 757-761 (2010).
12. Zhang, F. et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. Nat Biotechnol 29, 149-153 (2011).
13. Miller, J. C. et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat Biotechnol 29, 143-148 (2011).
14. Reyon, D. et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nat Biotechnol 30, 460-465 (2012).
15. Boch, J. et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science 326, 1509-1512 (2009).
16. Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 326, 1501 (2009).
17. Sanjana, N. E. et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. Nat Protoc 7, 171-192 (2012).
18. Deveau, H., Garneau, J. E. & Moineau, S. CRISPR-Cas system and its role in phage-bacteria interactions. Annu Rev Microbiol 64, 475-493 (2010).
19. Horvath, P. & Barrangou, R. CRISPR-Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science 327, 167-170 (2010).
20. Makarova, K. S. et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol 9, 467-477 (2011).
21. Bhaya, D., Davison, M. & Barrangou, R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defens

e and regulation. Annu Rev Genet 45, 273-297 (2011).
22. Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR-Cas systems. Science 339, 819-823 (2013).
23. Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339, 823-826 (2013).
24. Jinek, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife 2, e00471 (2013).
25. Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M. & Kim, J. S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat Biotechnol 31, 230-232 (2013).
26. Garneau, J. E. et al. The CRISPR-Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature 468, 67-71 (2010).
27. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337, 816-821 (2012).
28. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 109, E2579-2586 (2012).
29. Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. & Gregory, P. D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nat Rev Genet 11, 636-646 (2010).
30. Hsu, P. D. & Zhang, F. Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies. ACS Chem Neurosci 3, 603-610 (2012).
31. Perez, E. E. et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4(+) T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol 26, 808-816 (2008).
32. Cong, L. et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR-Cas Systems. Science 339, 819-823 (2013).
33. Chen, F. Q. et al. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. Nat Methods 8, 753-U796 (2011).
34. Bedell, V. M. et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. Nature 491, 114-U133 (2012).

35. Saleh-Gohari, N. & Helleday, T. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. Nucleic Acids Res 32, 3683-3688 (2004).
36. Deltcheva, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature 471, 602-607 (2011).
37. Sapranauskas, R. et al. The Streptococcus thermophilus CRISPR-Cas system provides immunity in Escherichia coli. Nucleic Acids Res 39, 9275-9282 (2011).
38. Hwang, W. Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol 31, 227-229 (2013).
39. Wang, H. et al. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR-Cas-Mediated Genome Engineering. Cell 153, 910-918 (2013).
40. Shen, B. et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. Cell Res 23, 720-723 (2013).
41. Qi, L. S. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell 152, 1173-1183 (2013).
42. Tuschl, T. Expanding small RNA interference. Nat Biotechnol 20, 446-448 (2002).
43. Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A. & Kucherlapati, R. S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. Nature 317, 230-234 (1985).
44. Thomas, K. R., Folger, K. R. & Capecchi, M. R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. Cell 44, 419-428 (1986).
45. Hasty, P., Rivera-Perez, J. & Bradley, A. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. Mol Cell Biol 11, 5586-5591 (1991).
46. Wu, S., Ying, G. X., Wu, Q. & Capecchi, M. R. A protocol for constructing gene targeting vectors: generating knockout mice for the cadherin family and beyond. Nat Protoc 3, 1056-1076 (2008).
47. Guschin, D. Y. et al. A rapid and general assay for monitoring endogenous gene m

odification. Methods Mol Biol 649, 247-256 (2010).
48. Oliveira, T. Y. et al. Translocation capture sequencing: a method for high throughput mapping of chromosomal rearrangements. J Immunol Methods 375, 176-181 (2012).
49. Deltcheva, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature 471, 602-607 (2011).
50. Bogenhagen, D. F. & Brown, D. D. Nucleotide sequences in Xenopus 5S DNA required for transcription termination. Cell 24, 261-270 (1981).
51. Bultmann, S. et al. Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. Nucleic Acids Res 40, 5368-5377 (2012).
52. Valton, J. et al. Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. J Biol Chem 287, 38427-38432 (2012).
53. Christian, M. et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics 186, 757-761 (2010).
54. Mussolino, C. et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. Nucleic acids research 39, 9283-9293 (2011).
55. Bobis-Wozowicz, S., Osiak, A., Rahman, S. H. & Cathomen, T. Targeted genome editing in pluripotent stem cells using zinc-finger nucleases. Methods 53, 339-346 (2011).
56. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nat Biotechnol 31, 233-239 (2013).
57. Michaelis, L. M., Maud "Die kinetik der invertinwirkung.". Biochem. z (1913).
58. Mahfouz, M. M. et al. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 2623-2628 (2011).
59. Wilson, E. B. Probable inference, the law of succession, and statistical inferen

ce. J Am Stat Assoc 22, 209-212 (1927).
60. Tangri S, et al., Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity, J Immunol. 2005 Mar 15;174(6):3187-96.
61. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991)
62. Lopes, V. S., etc al., Retinal gene therapy with a large MYO7A cDNA using adeno-assocaited virus. Gene Ther, 2013 Jan 24. doi:10.1038/gt 2013.3. [Epub ahead of print]
63. Kaplitt, M. G., et al., Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease:an open label, phase I trial. Lancet. 2007 Jun 23;369(9579):2097-105.
64. Nathwani, A. C., et al., Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. N Engl J Med. 2011 Dec 22;365(25):2357-65. doi:10.1056/NEJMoa1108046. Epub 2011 Dec 10.
65. Gray SJ, Foti SB, Schwartz JW, Bachaboina L, Taylor-Blake B, Coleman J, Ehlers MD, Zylka MJ, McCown TJ, Samulski RJ. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. Hum Gene Ther. 2011 Sep;22(9):1143-53. doi:10.1089/hum. 2010. 245.
66. Liu D, Fischer I. Two alternative promoters direct neuron-specific expression of the rat microtubule-associated protein 1B gene. J Neurosci. 1996 Aug 15;16(16):5026-36.
67. Levitt N. Briggs D. Gil A. Proudfoot N. J. Definition of an efficient synthetic poly(A) site. Genes Dev. 1989;3:1019-1025.
68. McClure C, Cole KL, Wulff P, Klugmann M, Murray AJ. Production and titering of recombinant adeno-associated viral vectors. J Vis Exp. 2011 Nov 27;(57):e3348. doi:10.3791/3348.
69. Banker G, Goslin K. Developments in neuronal cell culture. Nature. 1988 Nov 10;336(6195):185-6.
70. Capecchi, M. R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian gen

ome for the twenty-first century. Nat Rev Genet 6, 507-512 (2005).
71. Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H. & Robertson, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature 309, 255-256 (1984).
72. Smithies, R. O. & Koralewski, M. A. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal B-globin locus by homologous recombination. Nature (1985).
73. Rudin, N., Sugarman, E. & Haber, J E. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in Saccharomyces cerevisiae. Genetics (1989).
74. Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. Mol Cell Biol (1994).
75. Choulika, A., Perrin, A. & Dujon, B. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of Saccharomyces cerevisiae. Molecular and cellular (1995).
76. Wyman, C. & Kanaar, R. DNA double-strand break repair: all 's well that ends well. Annu. Rev. Genet. (2006).
77. Li, L., Wu, L. P. & Chandrasegaran, S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. in (1992).
78. Kim, Y. G. & Chandrasegaran, S. Chimeric restriction endonuclease. in (1994).
79. Miller, J., McLachlan, A. D. & Klug, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. EMBO J (1985).
80. Pavletich, N. P. & Pabo, C. O. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 A. Science (1991).
81. Klug, A. The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation. Annu. Rev. Biochem. 79, 213-231 (2010).
82. Beerli, R. R. & Barbas, C. F. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. Nat Biotech (2002).
83. Maeder, M. L., Thibodeau-Beganny, S., Osiak, A. & Wright, D. A. Rapid 'open-source' engineering of customized zinc-finger nucle

ases for highly efficient gene modification. Molecular Cell (2008).
84. Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A. & Hahn, S. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science (2009).
85. Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F., III. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology 1-9 (2013). doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004
86. Ding, Q. et al. A TALEN Genome-Editing System for Generating Human Stem Cell-Based Disease Models. Stem Cell 12, 238-251 (2013).
87. McManus, M. T. & Sharp, P. A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet 3, 737-747 (2002).
88. Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature (1998).
89. Vert, J.-P., Foveau, N., Lajaunie, C. & Vandenbrouck, Y. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. BMC Bioinformatics 7, 520 (2006).
90. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature (2001).
91. Song, J., Giang, A., Lu, Y., Pang, S. & Chiu, R. Multiple shRNA expressing vector enhances efficiency of gene silencing. BMB Rep (2008).
92. van Parijs, L., Chen, J. & Sharp, P. A. Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. The Journal of… (2002).
93. Grimm, D. & Kay, M. A. Combinatorial RNAi: A Winning Strategy for the Race Against Evolving Targets&quest. Mol Ther (2007).
94. Silva, J. M., Marran, K., Parker, J. S., Silva, J. & Golding, M. Profiling essential genes in human mammary cells by multiplex RNAi screening. Science (2008).
95. Stockwell, B. R., Hacohen, N., Hahn, W. C. & Lander, E. S. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. Cell (2006).

96. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. Journal of Bacteriology 169, 5429-5433 (1987).
97. Spilman, M., Cocozaki, A., Hale, C., Shao, Y. & Ramia, N. Structure of an RNA silencing complex of the CRISPR-Cas immune system. Molecular Cell (2013).
98. Wiedenheft, B., Sternberg, S. H. & Doudna, J. A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature 482, 331-338 (2012).
99. Mojica, F. J. M., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. & Almendros, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology (Reading, Engl.) 155, 733-740 (2009).
100. Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science (2013).
101. Gilbert, L. A. et al. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulationof Transcription in Eukaryotes. Cell 154, 442-451 (2013).
102. Konermann, S. et al. NOT FINAL PROOF. Nature 1-17 (2013). doi:10.1038/nature12466
103. Maeder, M. L. et al. nbt.2726. Nat Biotech 1-9 (2013). doi:10.1038/nbt.2726
104. Perez-Pinera, P. et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. Nat Meth 10, 973-976 (2013).
105. Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A. & Ran, F. A. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature (2013).
106. Fu, Y. et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CrIsPr-Cas nucleases in human cells. Nat Biotech 1-6 (2013). doi:10.1038/nbt.2623.
107. Dianov, G. L. & Hubscher, U. Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel. Nucleic Acids Res (2013).
108. Ran, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature Protocols 8, 2281-2308 (2013).
109. Ran, F. A. et al. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. Cell 1-10 (2013). doi:

10.1016/j.cell.2013.08.021
110. O'Roak, B.J., Deriziotis, P., Lee, C., Vives, L. & Schwartz, J.J. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. Nature (2011).
111. Ng, S.B., Turner, E.H., Robertson, P.D. & Flygare, S.D. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. Nature (2009).
112. Hsu, P.D. & Zhang, F. Dissecting Neural Function Using Targeted Genome Engineering Technologies. ACS Chemical Neuroscience (2012).
113. Hofacker, I.L., Fontana, W. & Stadler, P.F. Fast folding and comparison of RNA secondary structures. Monatshefte fur Chemie/… (1994).
114. Niu, Y. et al. Generation of Gene-Modified Cynomolgus Monkey via Cas9/RNA-MediatedGene Targeting in One-Cell Embryos. Cell 1-8 (2014). doi:10.1016/j.cell.2014.01.027
115. Grieger, J.C. & Samulski, R.J. Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. J Virol (2005).
116. Gabriel, R., Lombardo, A., Arens, A. & Miller, J.C. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. Nature (2011).
117. Tesson, L., Usal, C., Menoret, S., Leung, E. & Niles, B.J. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. Nature (2011).
118. Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M. & Joung, J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nat Biotech (2014). doi:10.1038/nbt.2808
119. Zhang, Y. et al. Processing-Independent CRISPR RNAs Limit Natural Transformation in Neisseria meningitidis. Molecular Cell 50, 488-503 (2013).
120. Zoephel, J. & Randau, L. RNA-Seq analyses reveal CRISPR RNA processing and regulation patterns. Biochem. Soc. Trans. 41, 1459-1463 (2013).
121. Shalem, O. et al. Genome-Scale CRISPR-

Cas9 Knockout Screening in Human Cells. Science 343, 84−87（2014）.
122. Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M. & Lander, E. S. Genetic screens in human cells using the CRISPR−Cas9 system. Science（2014）.
123. Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P. & Ma, E. High−throughput profiling of off−target DNA cleavage reveals RNA−programmed Cas9 nuclease specificity. Nature（2013）.

【図１】

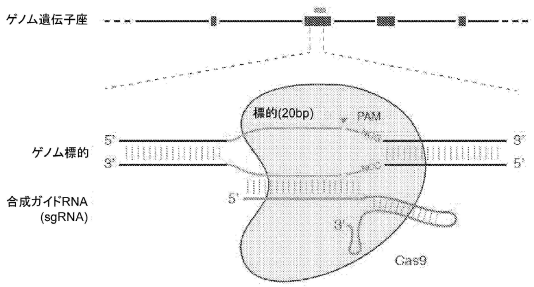
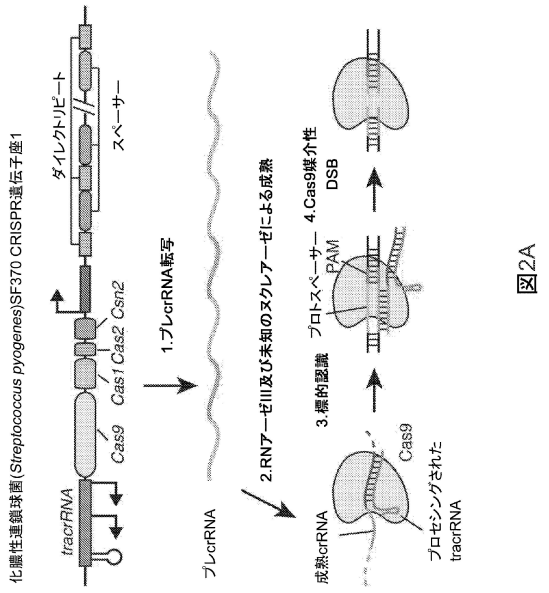



図1

【図２Ａ】




A

図2A

【図２Ｂ】

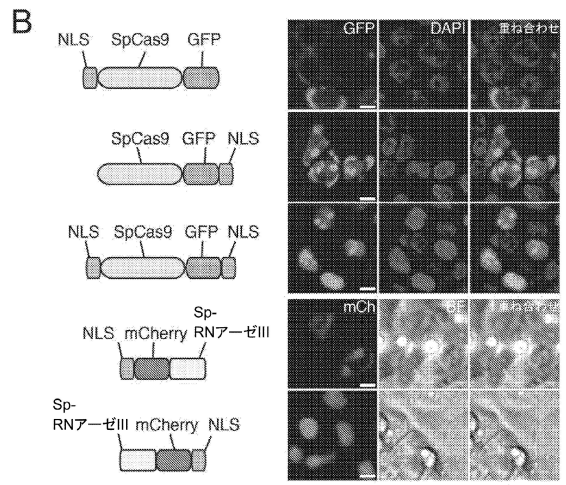



図2B

【図２Ｃ】

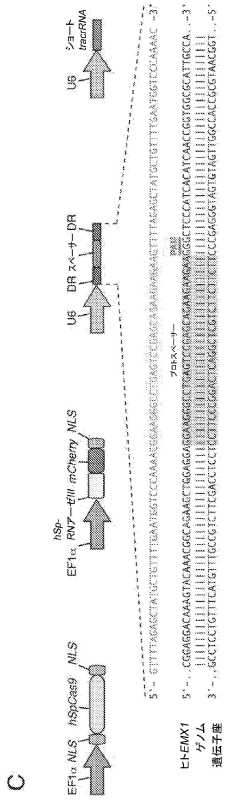



図2C

【図２Ｄ】

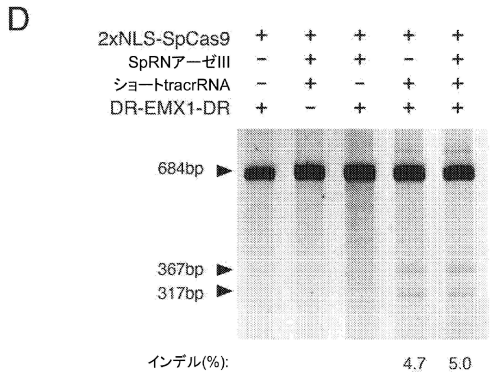



図2D

【図２Ｅ－Ｆ】

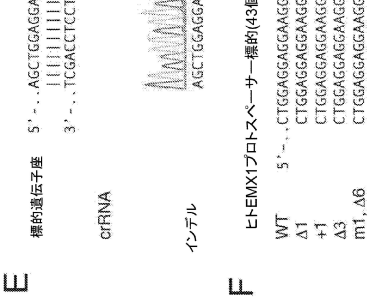



図2E-F

【図３Ａ】

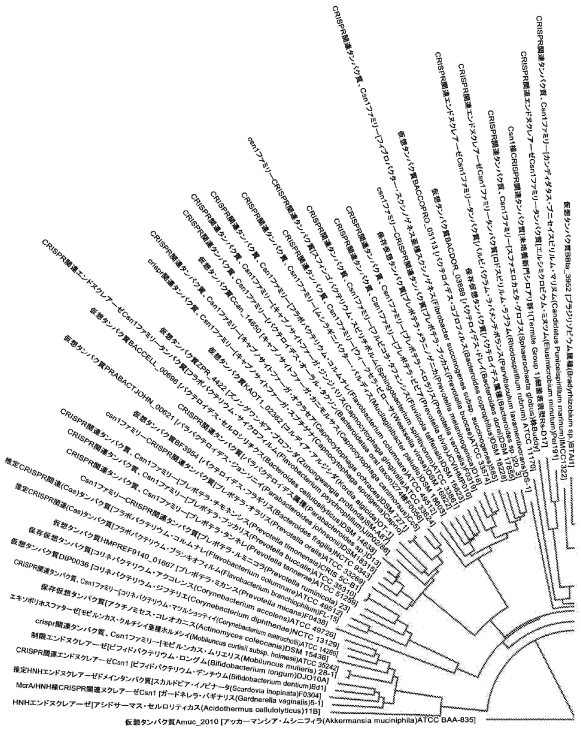


図3A

【図３Ｂ】

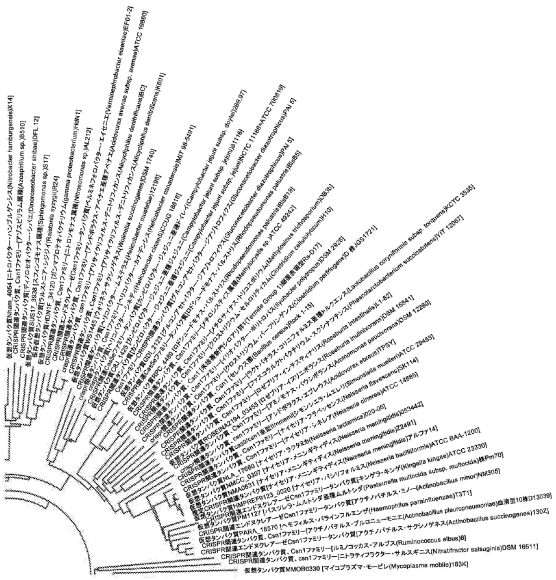


図3B

【図３Ｃ】

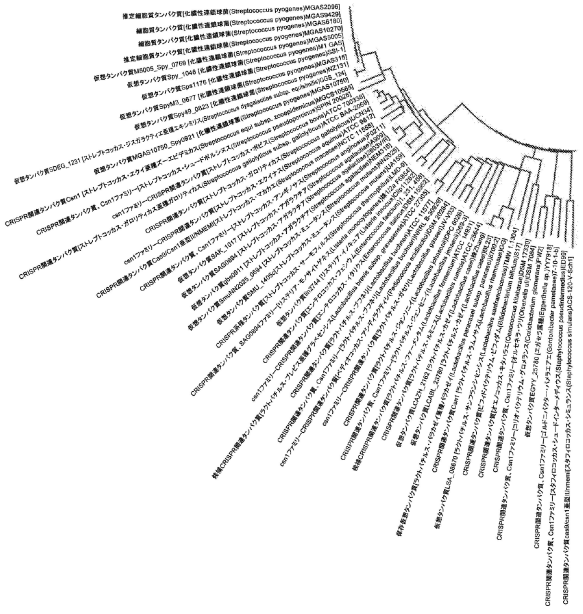


図3C

【図３Ｄ】

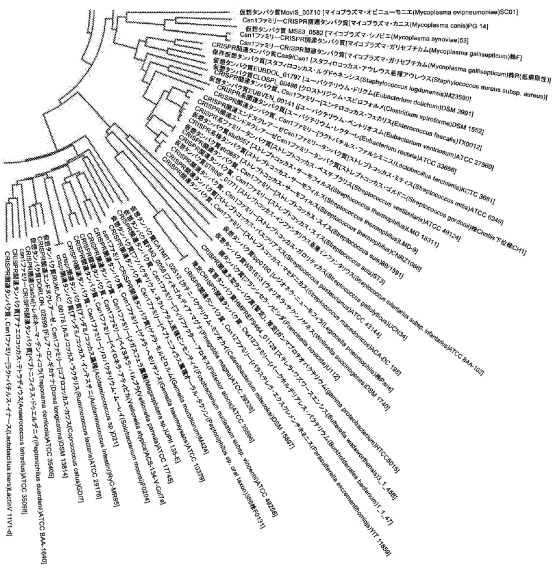


図3D

【図４Ａ】

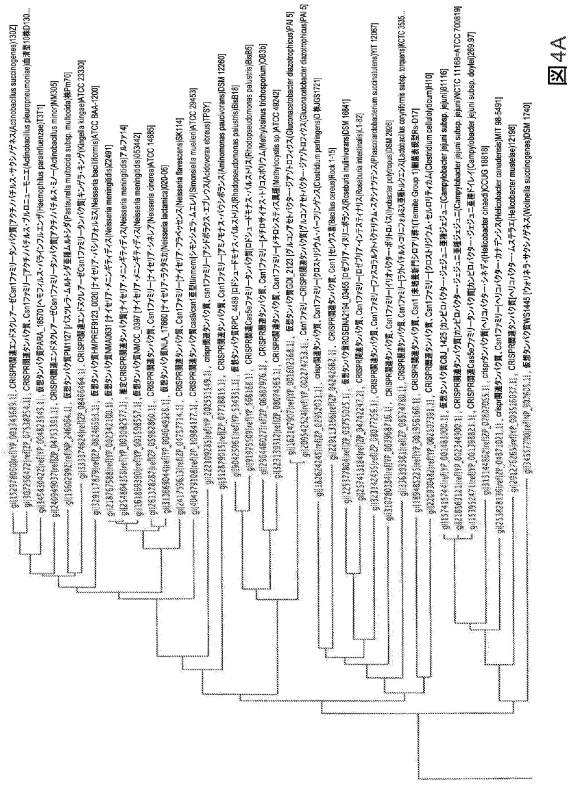


図4A

【図４Ｂ】

図4B

【図４Ｃ】

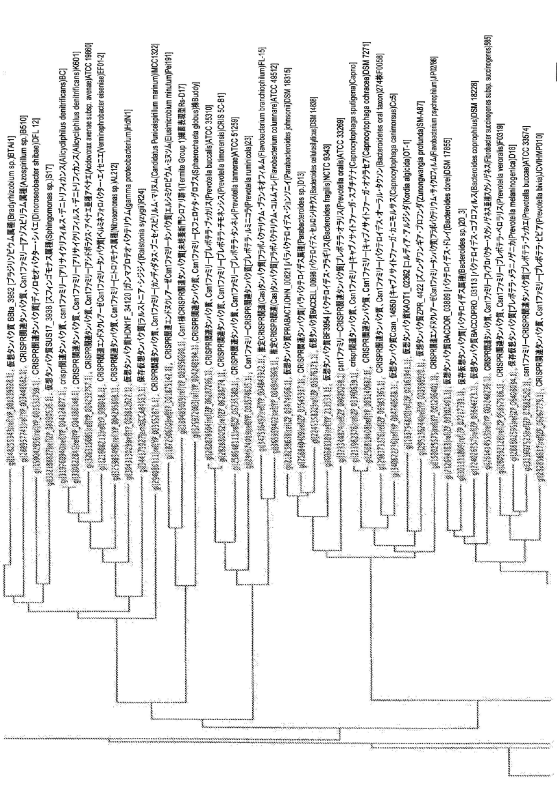


図4C

【図４Ｄ】

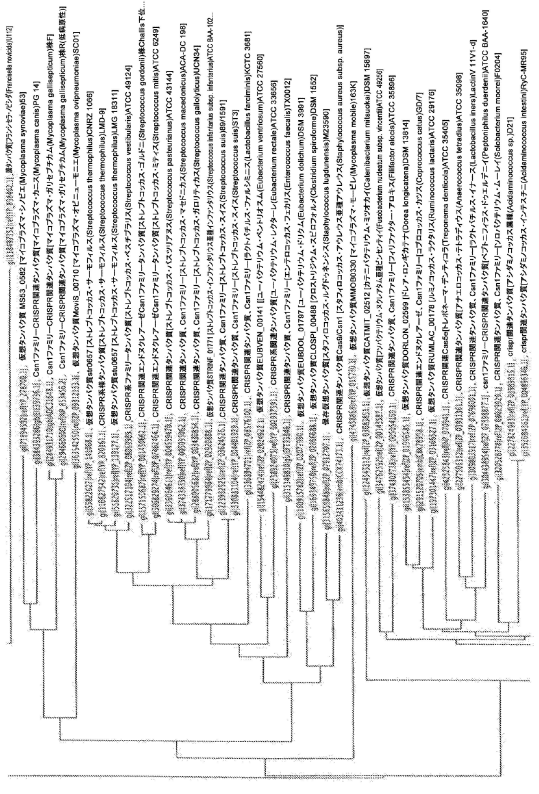


図4D

【図４Ｅ】

図4E

【図４Ｆ】

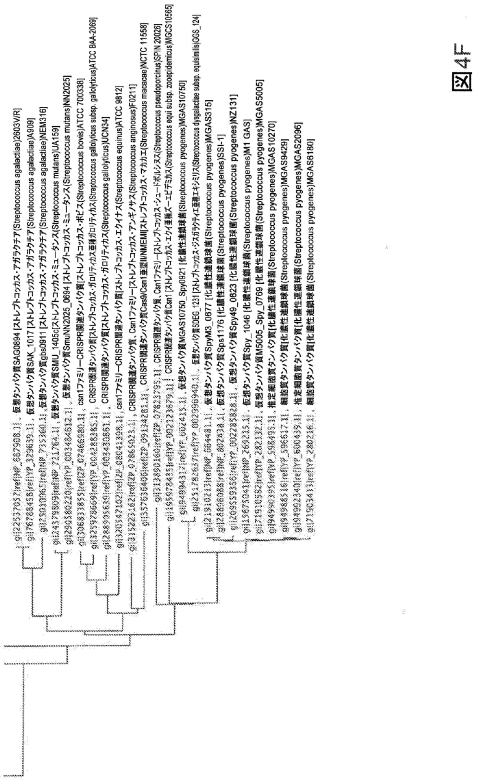


図4F

【図５】

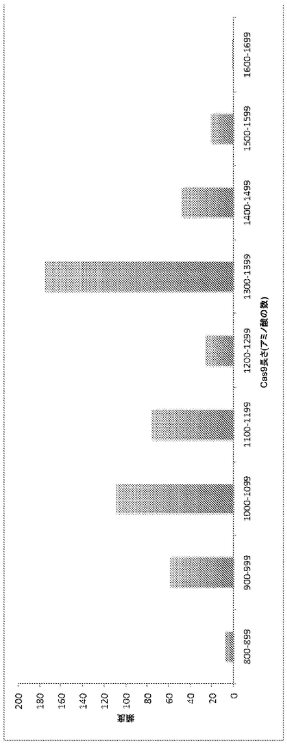



図5

【図６Ａ】

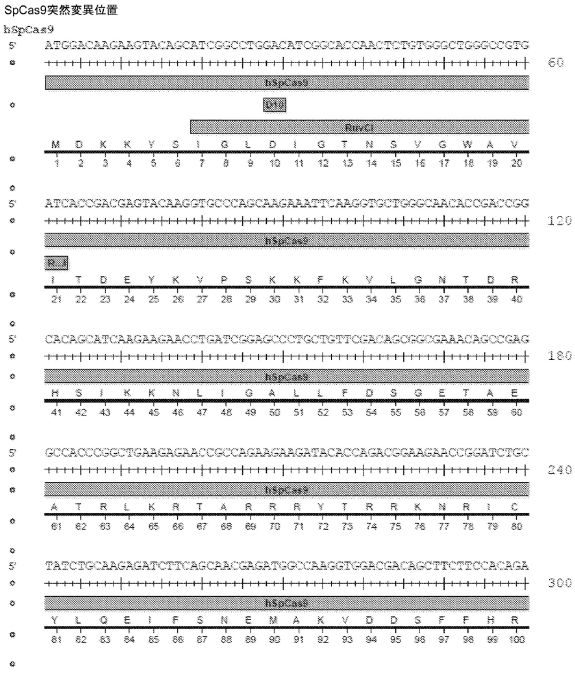



図6A

【図６Ｂ】

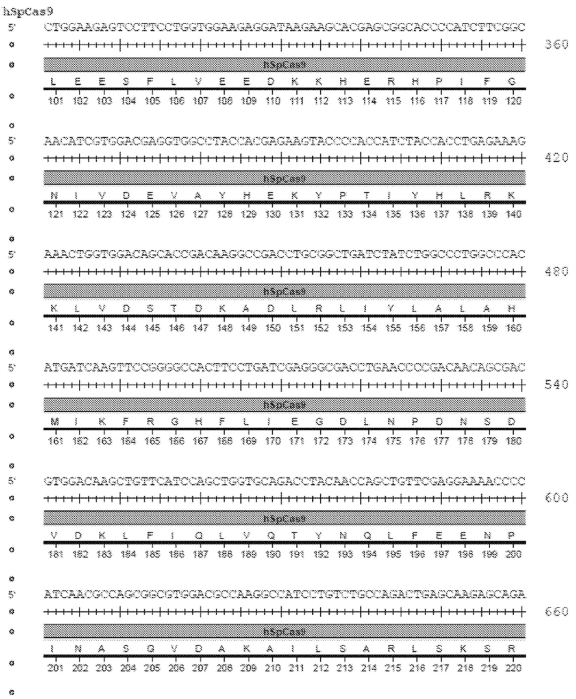


図6B

【図６Ｃ】

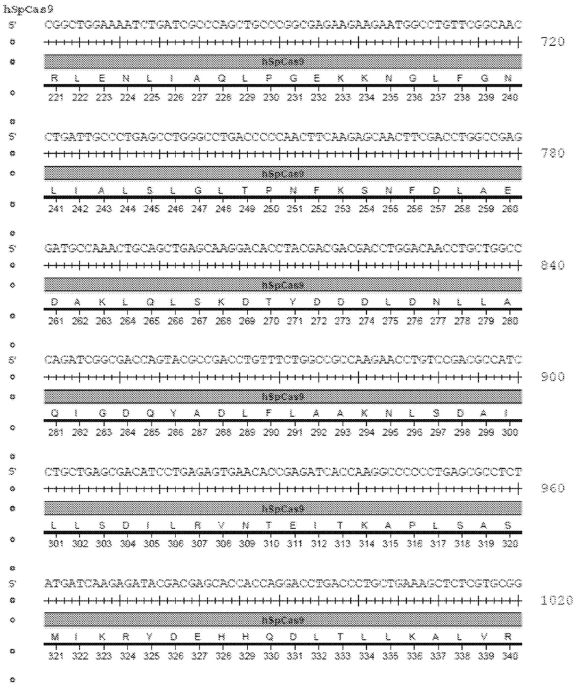


図6C

【図６Ｄ】

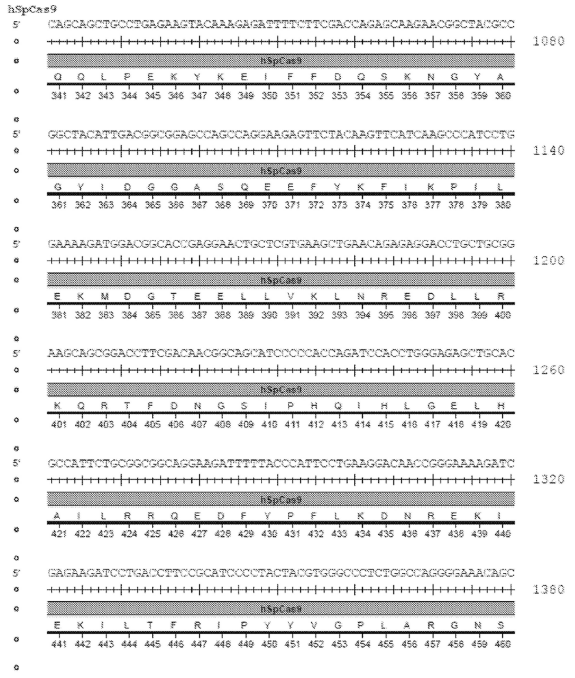


図6D

【図６Ｅ】

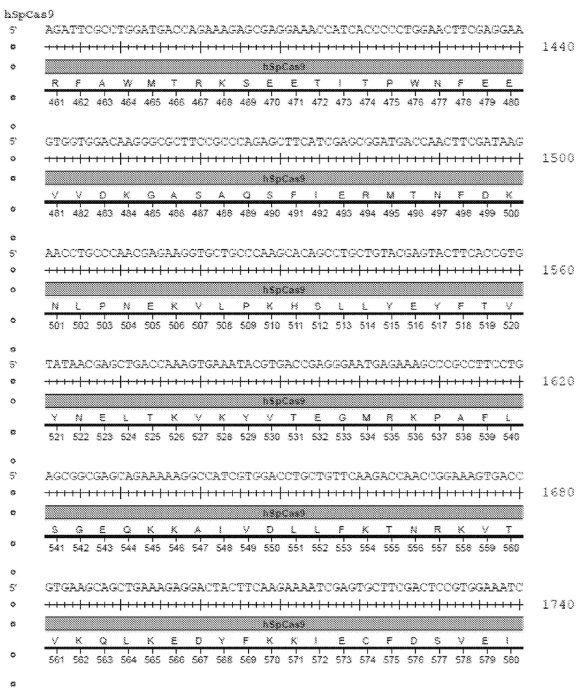


図6E

【図６Ｆ】

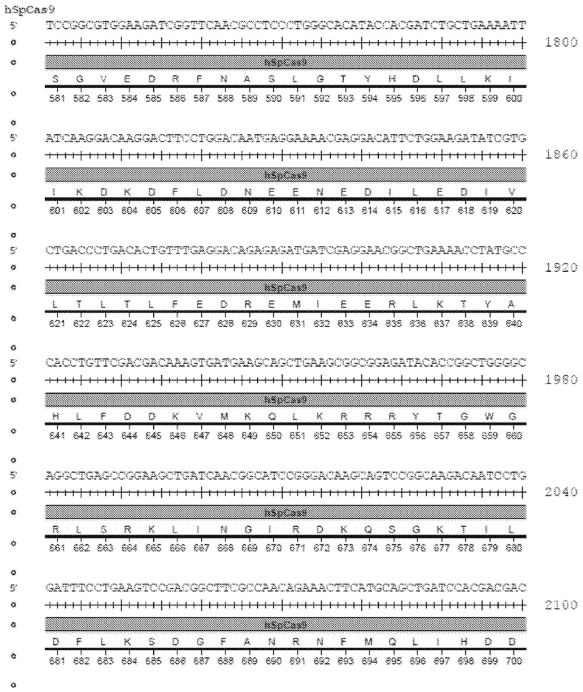


図6F

【図６Ｇ】

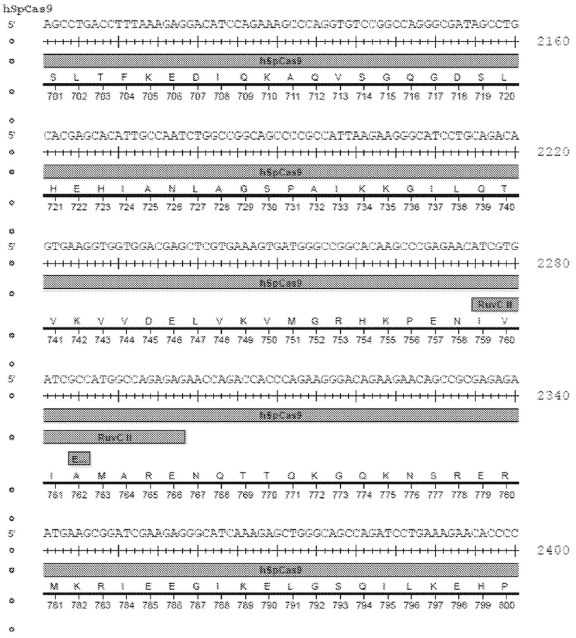


図6G

【図６Ｈ】

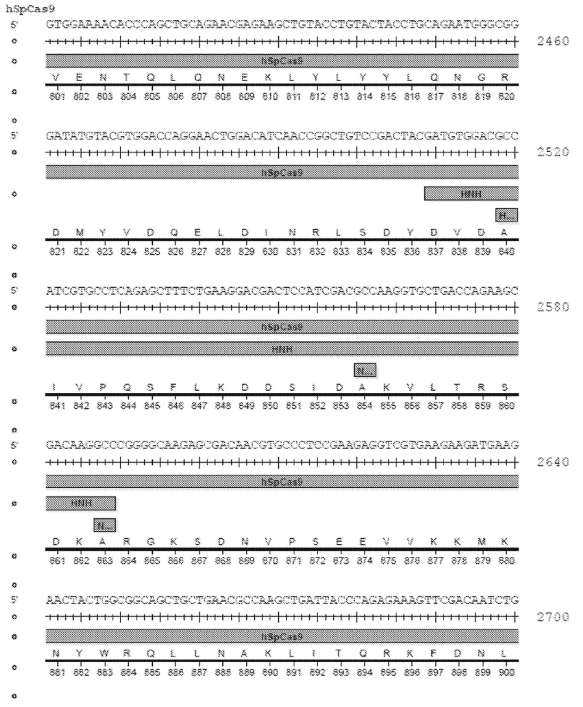


図6H

【図６Ｉ】

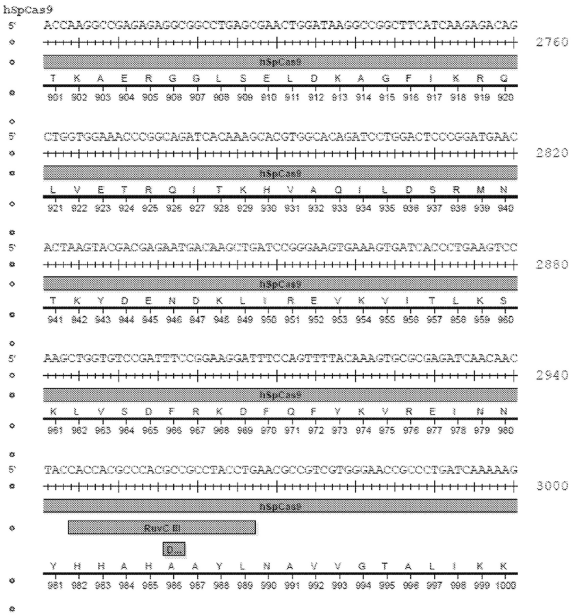


図6I

【図６Ｊ】

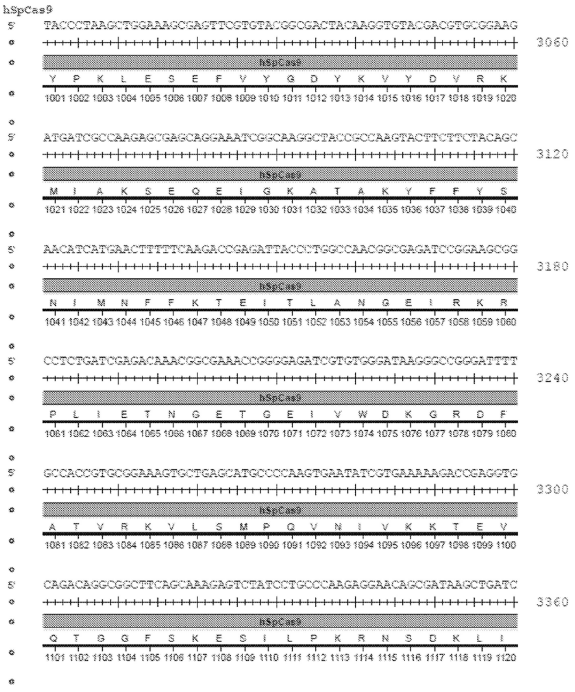


図6J

【図６Ｋ】

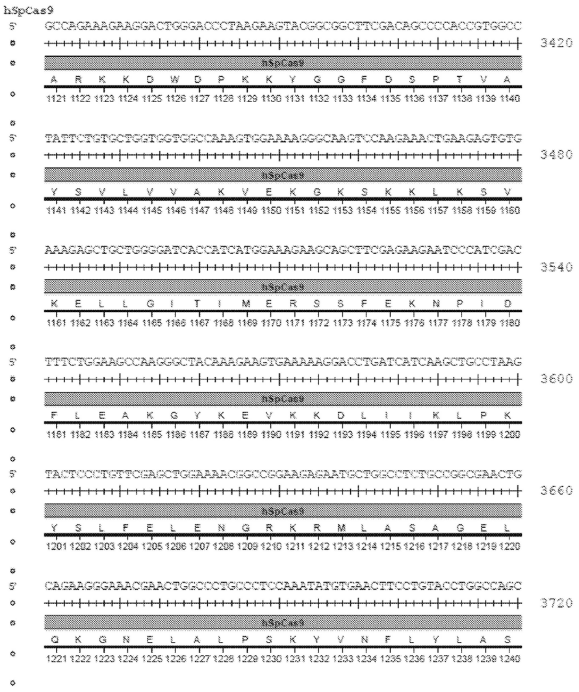


図6K

【図６Ｌ】

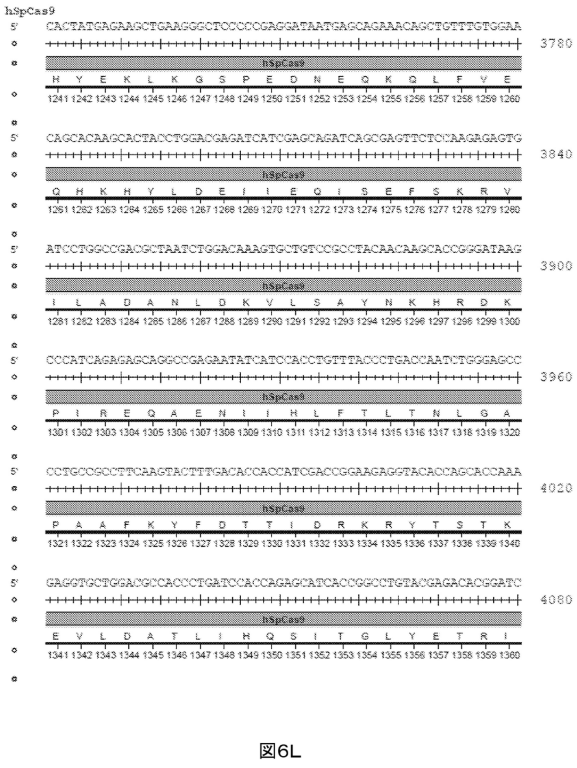


図6L

【図６Ｍ】

図6M

【図７Ａ】

図7A

【図７Ｂ】

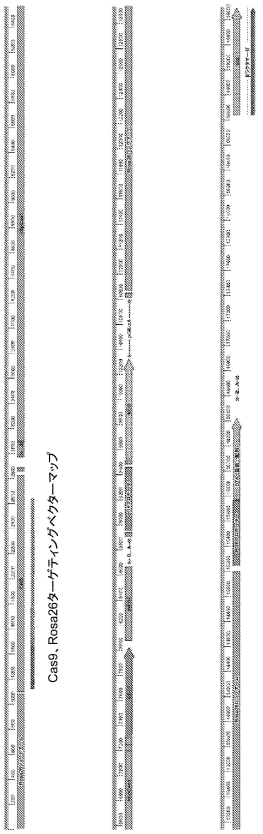



図7B

【図８】

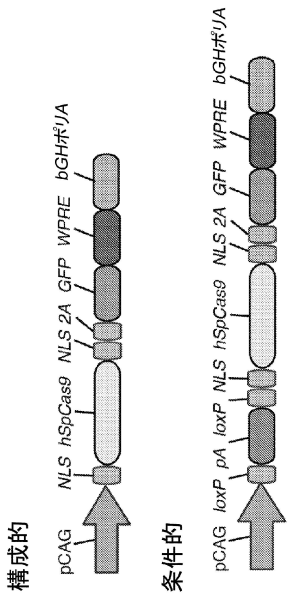



図8

【図９】

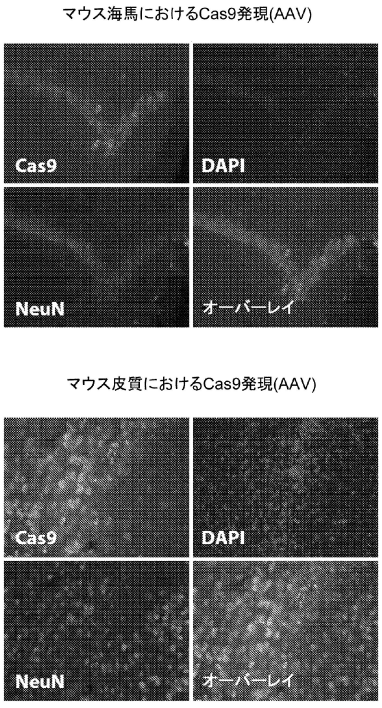



図9

【図１０】

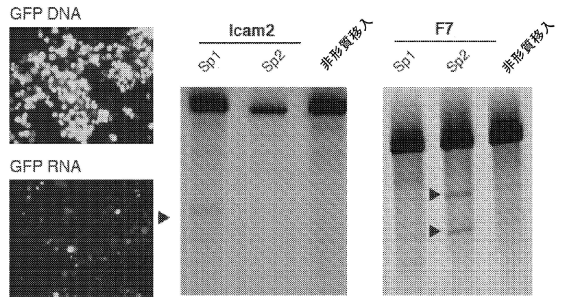



図10

【図１１】

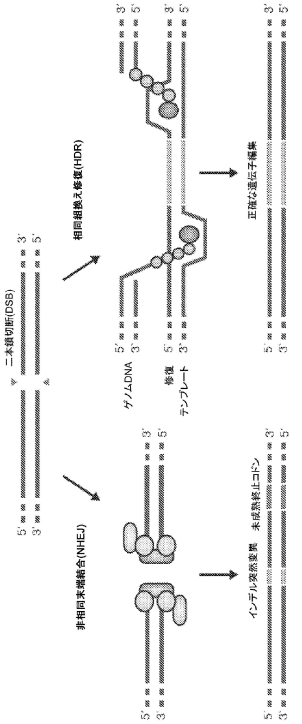



図11

【図１２】

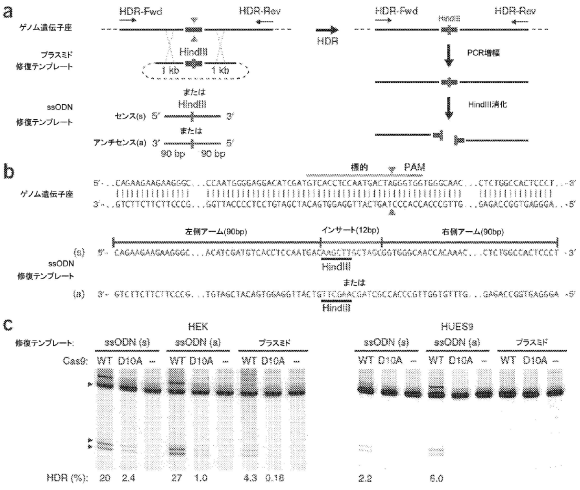



図12A-C

【図１３】

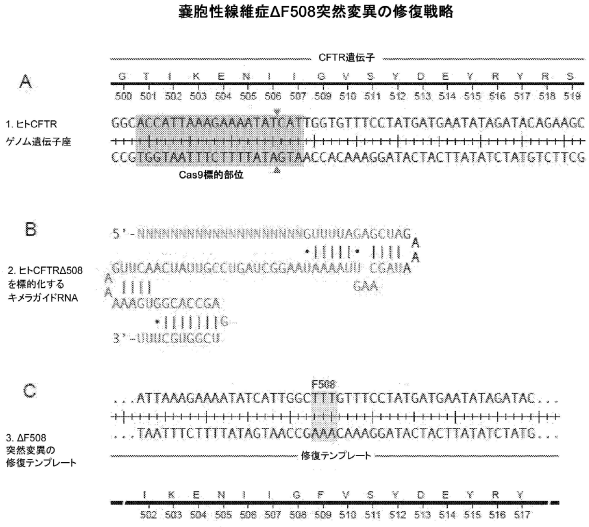



図13A-C

【図１４】

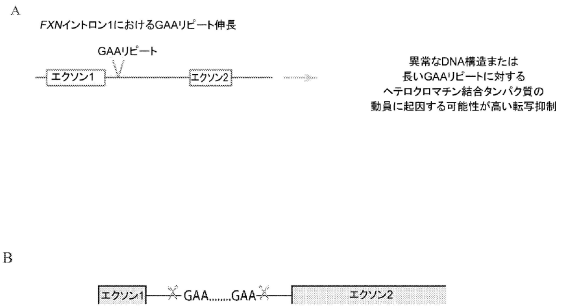



図14A-B

【図１５】

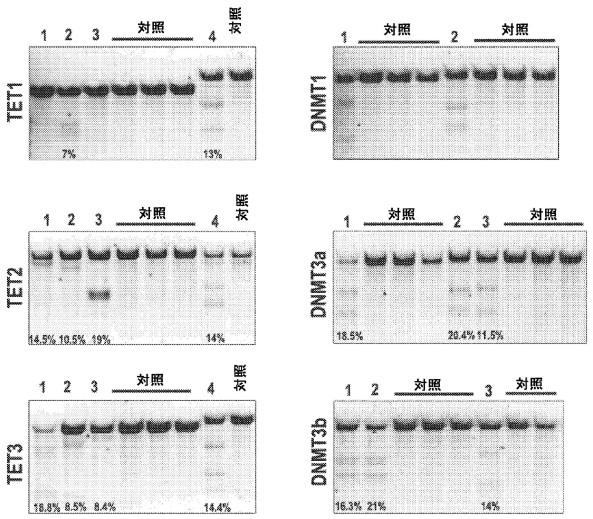



図15

【図１６】

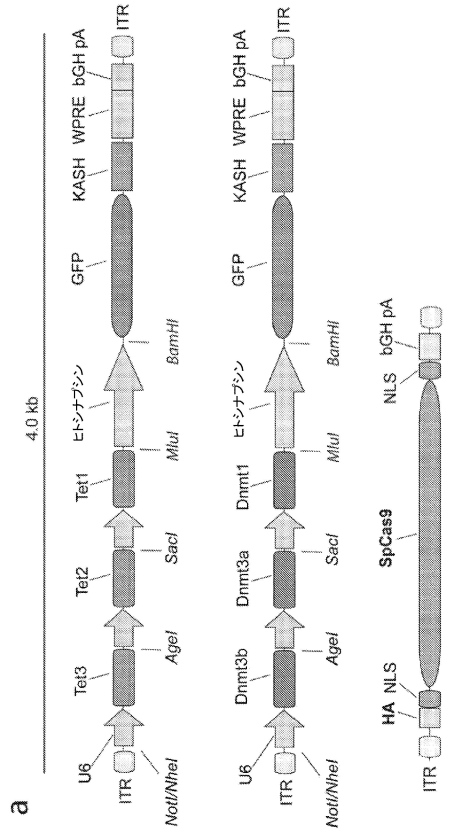



図16

【図１７】

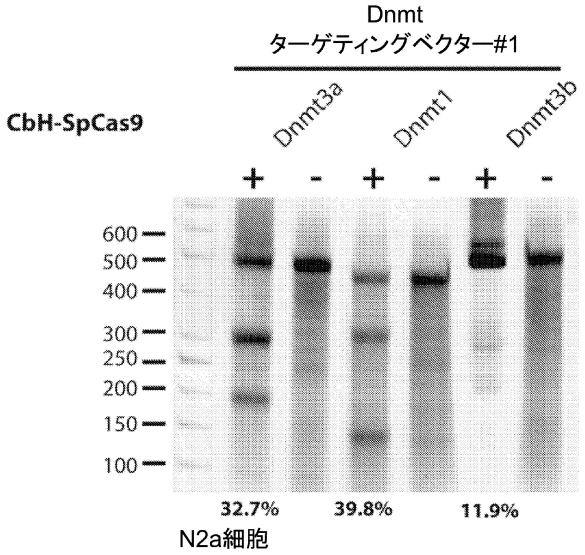



図17

【図１８】

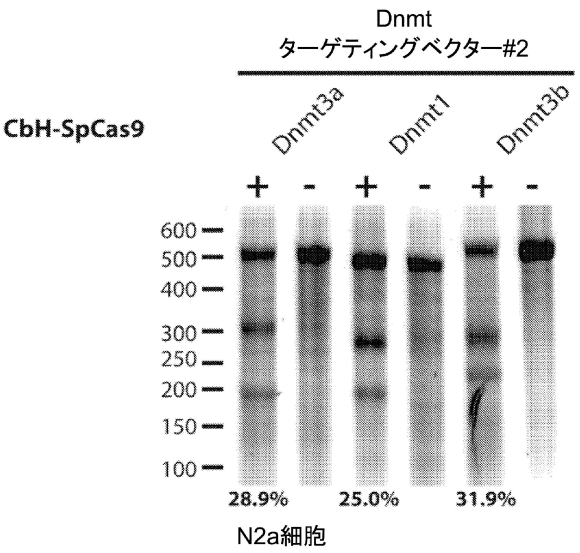



図18

【図１９】

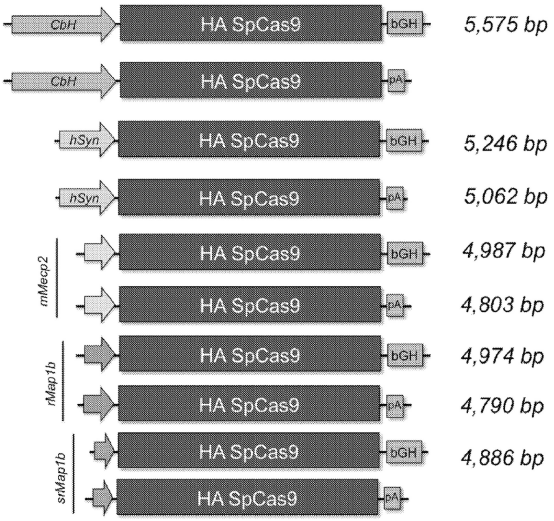



図19

【図２０】

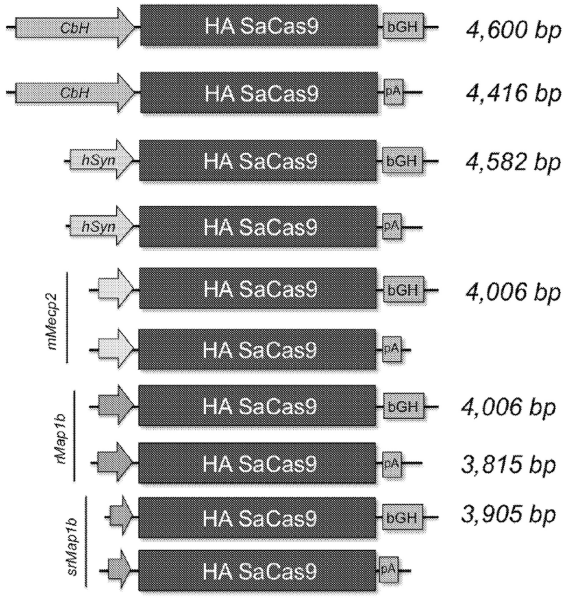



図20

【図２１】

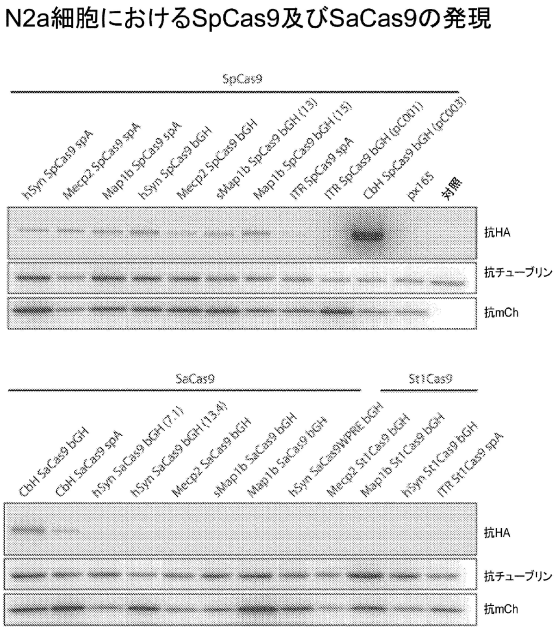



図21

【図２２】

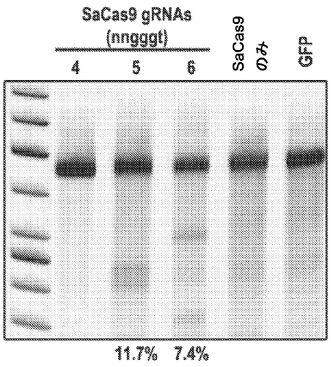



図22

【図２３】

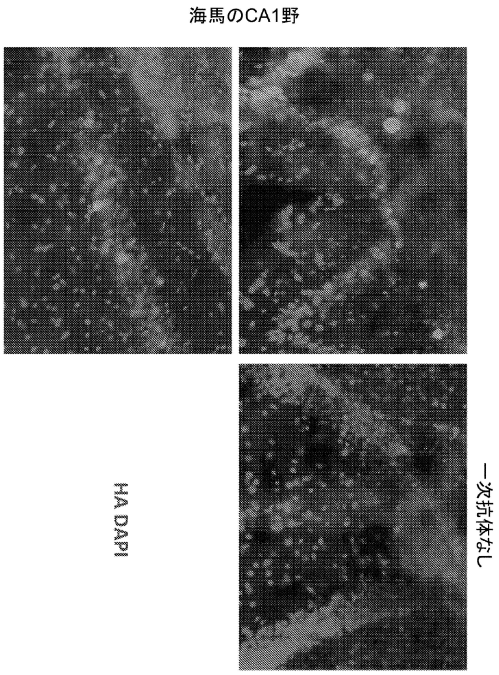



図23

【図２４】

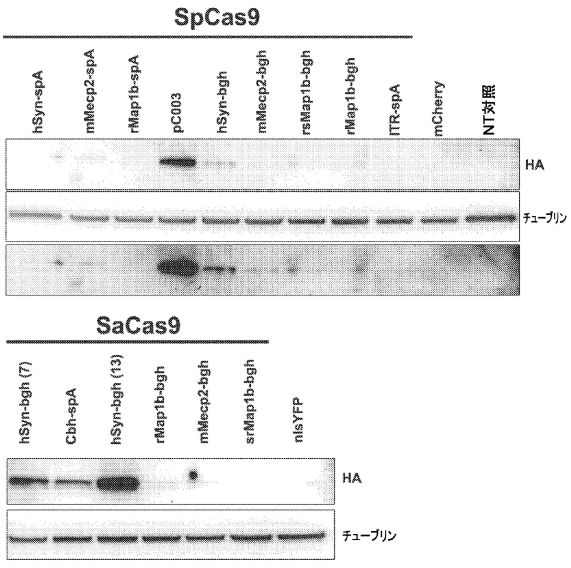



図24

【図２５】

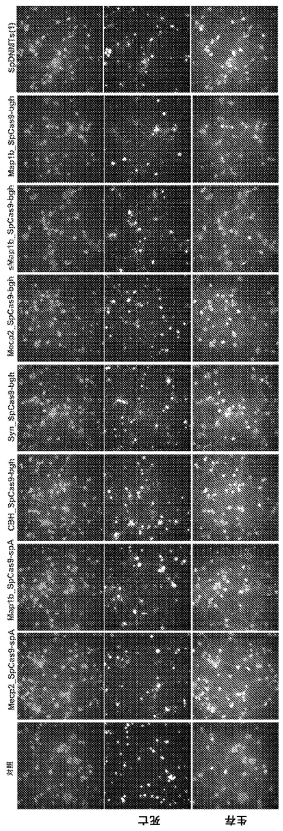



図25

【図２６】

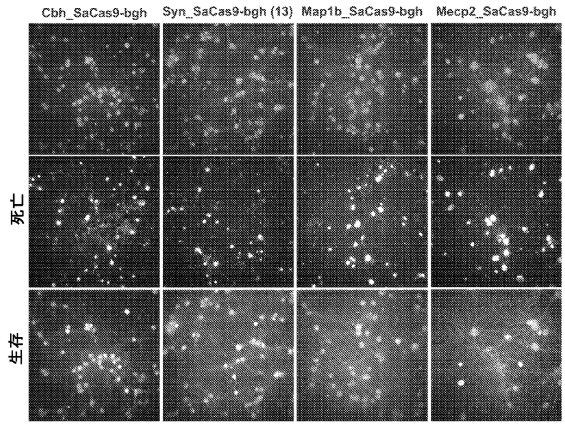



図26

【図２７】

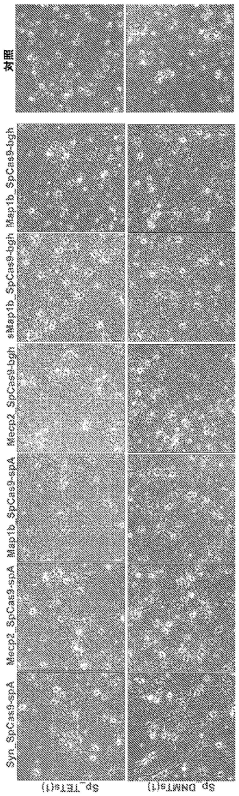



図27

【図２８】

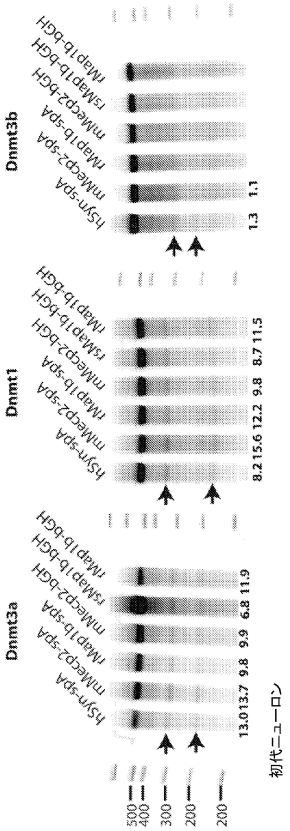



図28

【図２９】

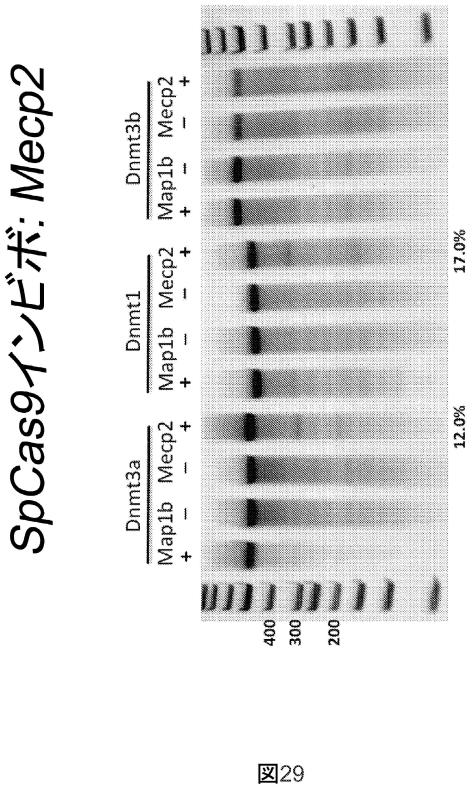



図29

【図３０】

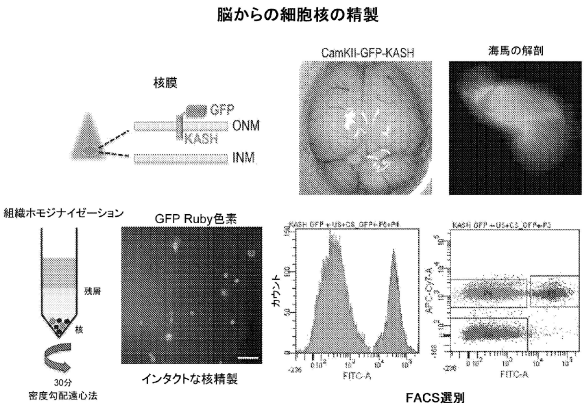



図30

【図３１】

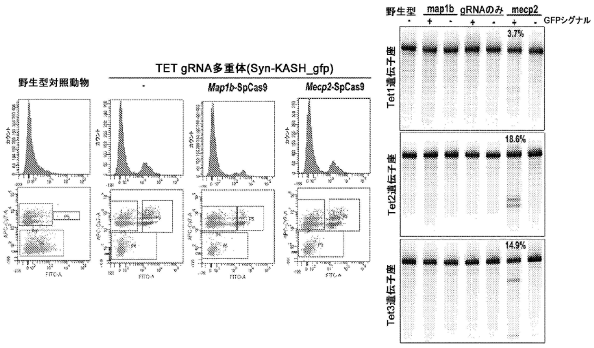



図31

【図３２】

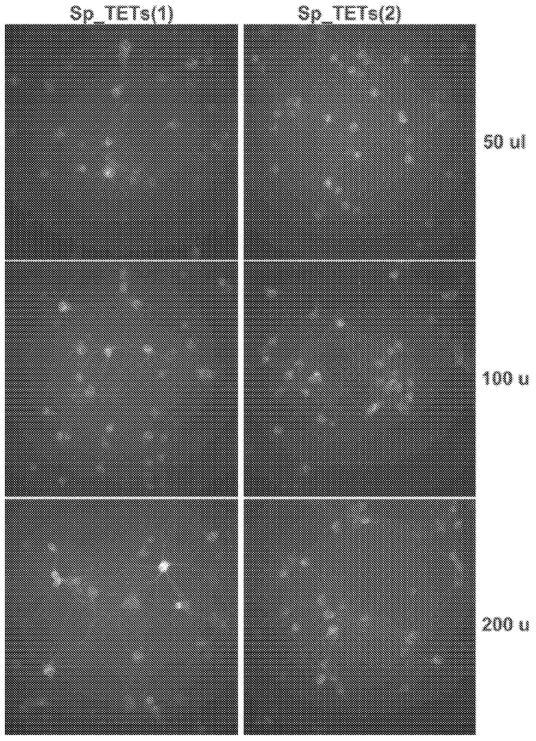



図32

【図３３】

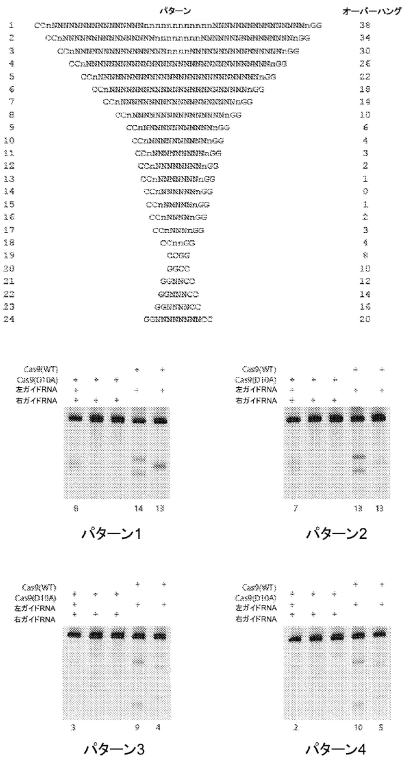



図33

【図３４】

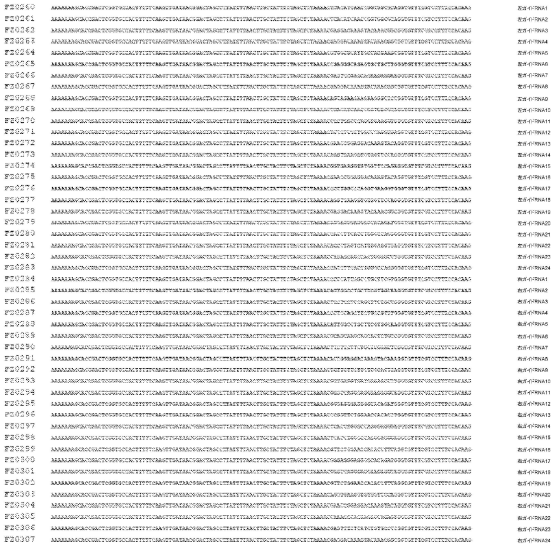



図34

【図３５】

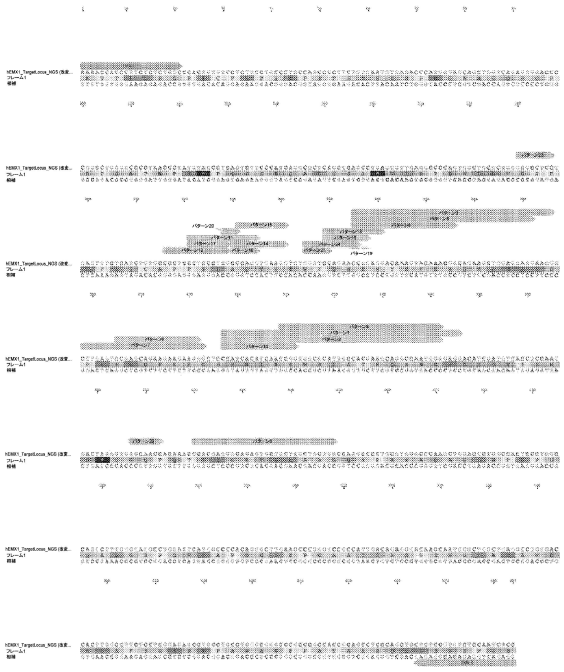
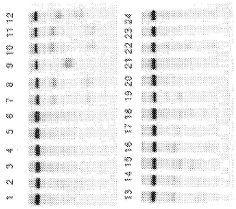


図35

【図３６】



| レーン# | 使用するCas9 | 右gRNA | 左gRNA | オーバーハング(D10A)-5'から突出する塩基数 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | D10A | 左12 | 左23 | -36 |
| 2 | D10A | 右9 | 右4 | -25 |
| 3 | D10A | 右23 | 左23 | -16 |
| 4 | D10A | 左10 | 右7 | -15 |
| 5 | D10A | 左3 | 右16 | -8 |
| 6 | D10A | 右6 | 右22 | 26 |
| 7 | D10A | 右16 | 左12 | 31 |
| 8 | D10A | 右13 | 左12 | 34 |
| 9 | D10A | 右1 | 左10 | 38 |
| 10 | D10A | 右16 | 右23 | 51 |
| 11 | D10A | 右13 | 右23 | 54 |
| 12 | D10A | 右7 | 左3 | 57 |
| 13 | D10A | 右4 | 左12 | 65 |
| 14 | D10A | 右3 | 左12 | 69 |
| 15 | D10A | 右10 | 左3 | 76 |
| 16 | D10A | 右4 | 右23 | 85 |
| 17 | D10A | 右9 | 左12 | 95 |
| 18 | D10A | 右10 | 左12 | 115 |
| 19 | D10A | 右10 | 右23 | 135 |
| 20 | D10A | 右2 | 左12 | 145 |
| 21 | D10A | 左22 | 左12 | 181 |
| 22 | D10A | 左22 | 右23 | 201 |
| 23 | D10A | 右6 | 左12 | 222 |
| 24 | D10A | 右6 | 右23 | 242 |

図36

【図３７】

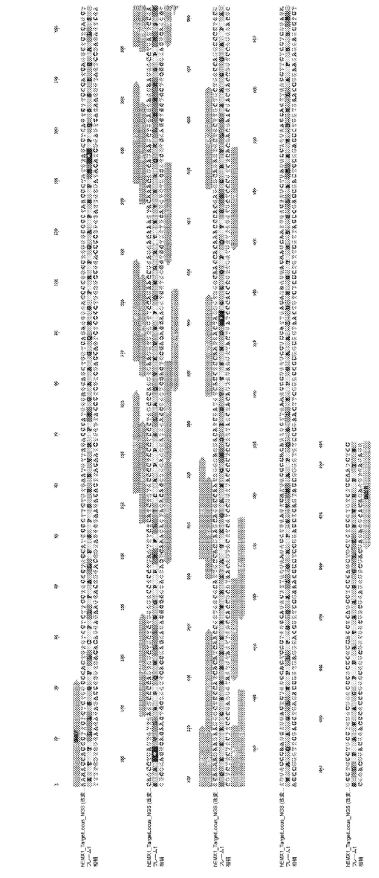


図37

【図３８Ａ－Ｂ】

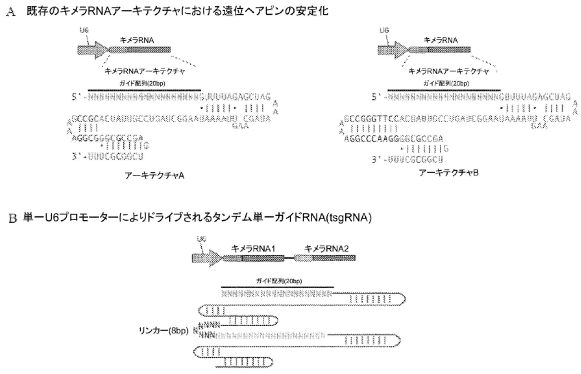



図38A-B

【図３８Ｃ－Ｄ】

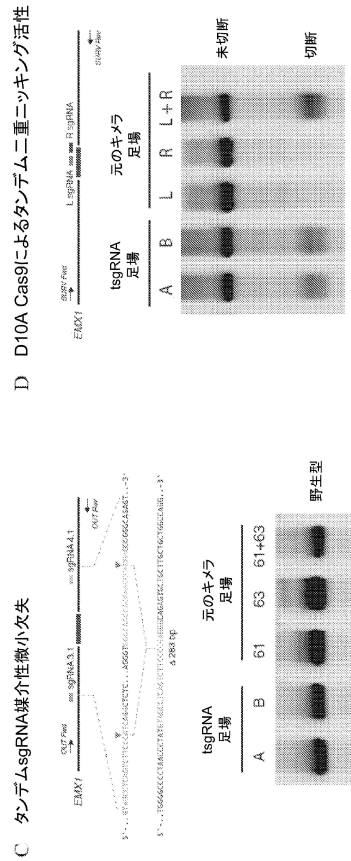



図38C-D

【図３９Ａ－Ｂ】

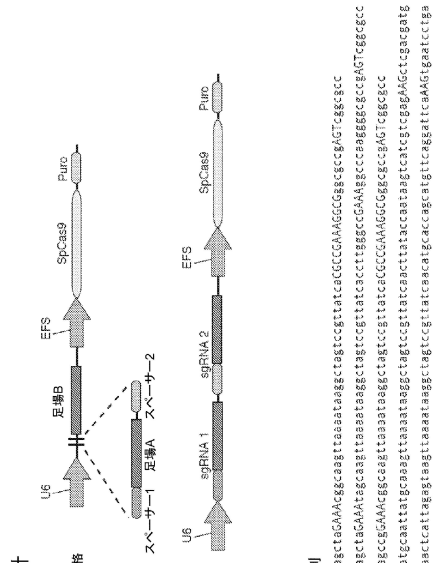



図39A-B

【図３９Ｃ】

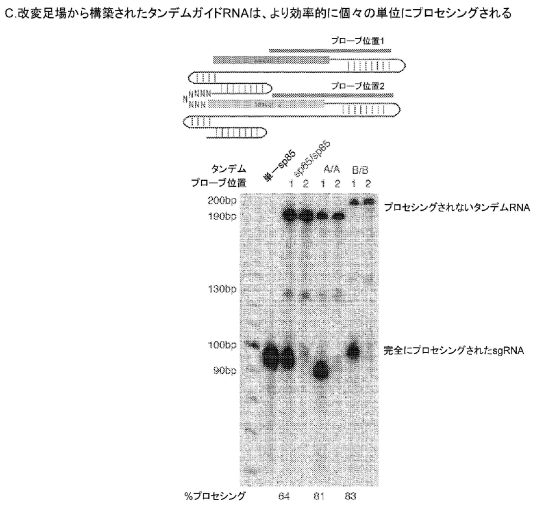



図39C

【図４０】

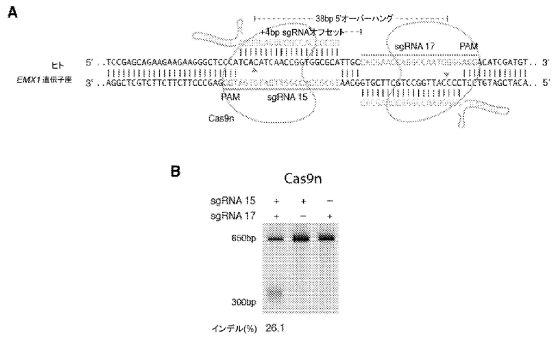



図40A-B

【図４１】

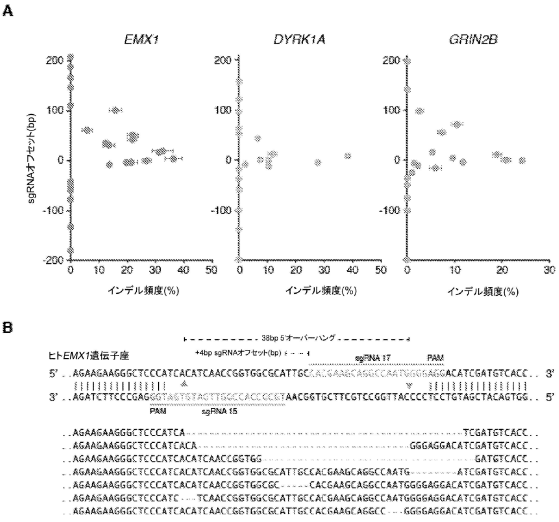



図41A-B

【図４２】

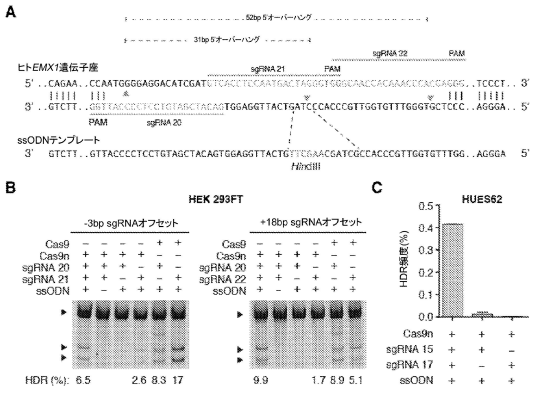



図42A-C

【図４３】

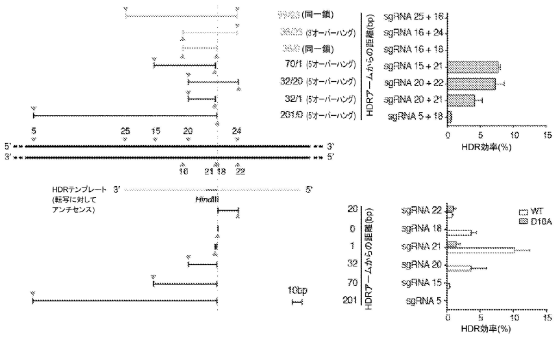



図43

【図４４】

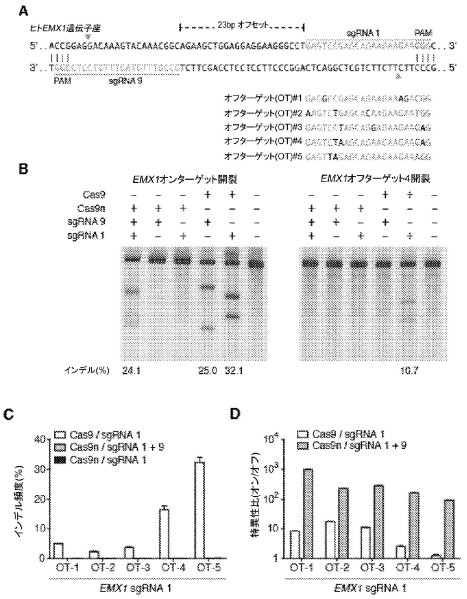



図44A-D

【図４５】

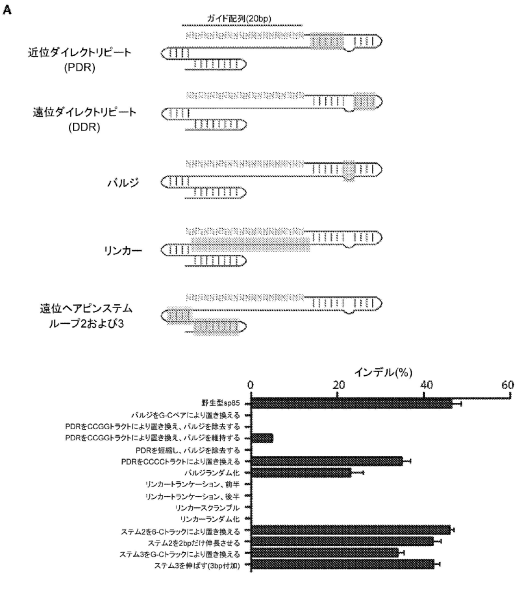



図45A-B

【図４６】

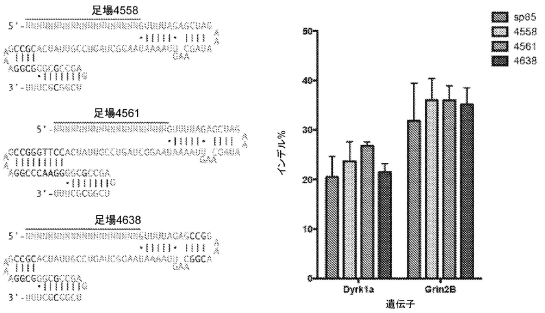



図46

【図４７】

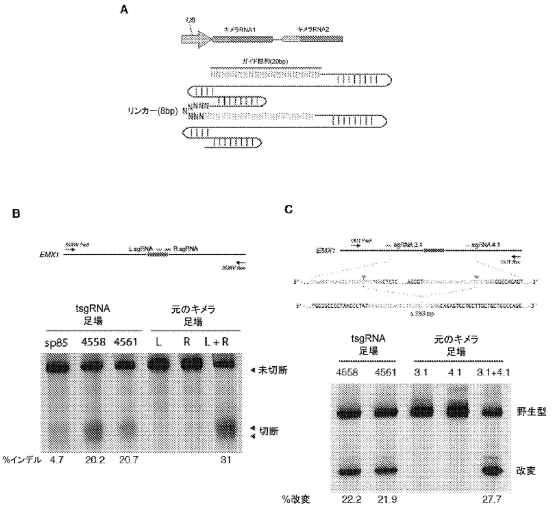
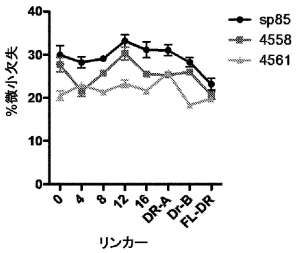



図47A-C

【図４８】




| タンデムリンカー | 長さ | 配列 |
|---|---|---|
| 0 | 0 | |
| 4 | 4 | ATTA |
| 8 | 8 | AATTATTA |
| 12 | 12 | AATTATTAATTA |
| 16 | 16 | AATTATTAATTATAAT |
| ダイレクトリピートA | 16 | GTTTTAGAGCTATGCT |
| ダイレクトリピートA | 20 | GTTTTGAATGGTCCCAAAAC |
| 完全ダイレクトリピート | 36 | GTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAAC |

図48

【図４９】

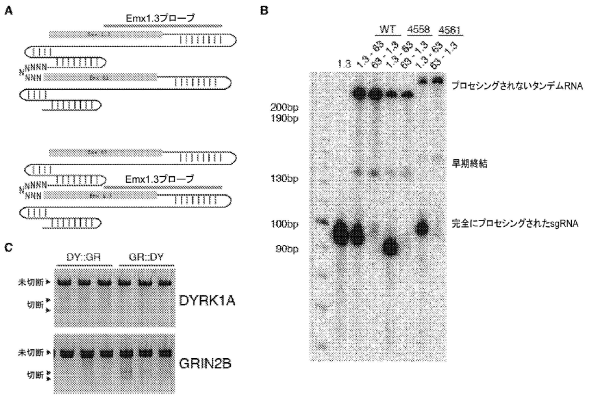



図49A-C

【図５０】

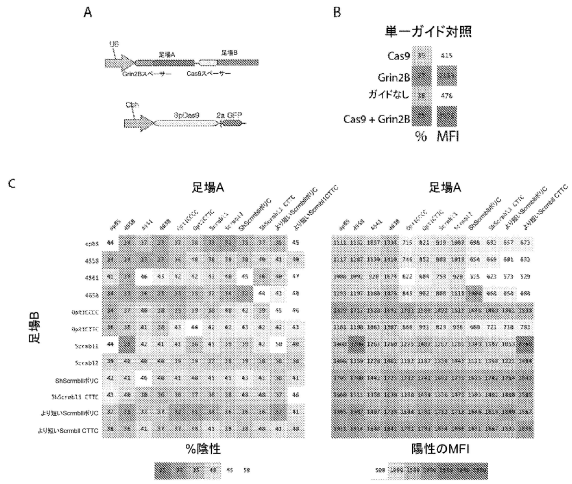



図50A-C

【図５１】

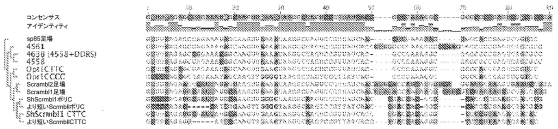



図51

【図５２】

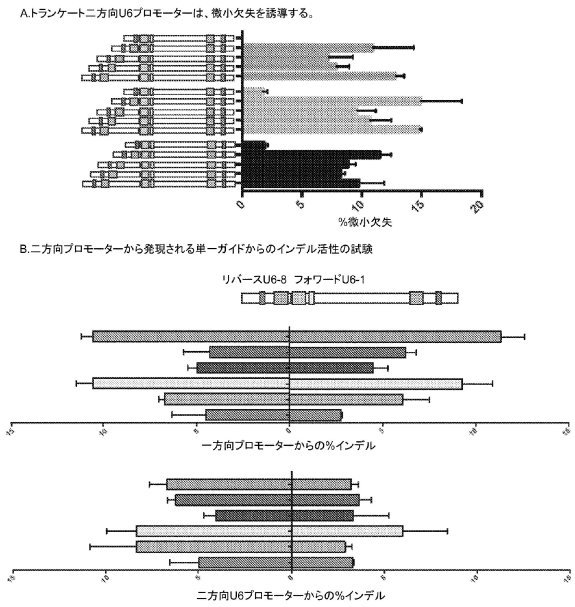



図52

【図５３】

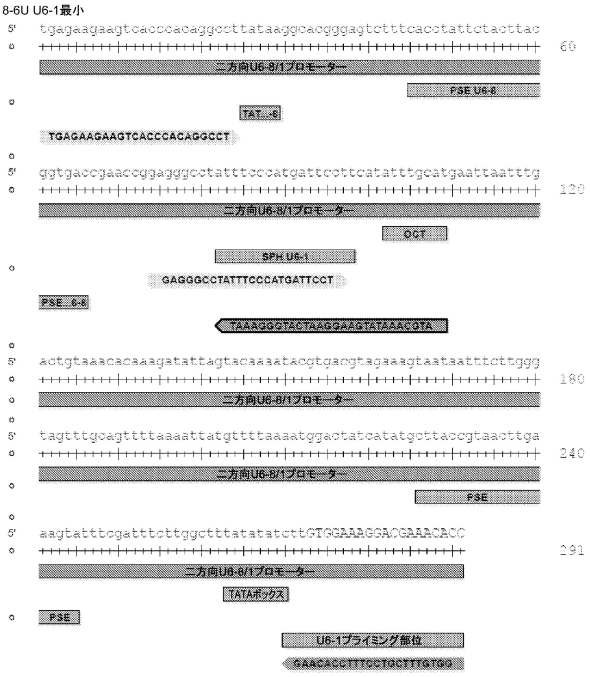



図53

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
*C12N 15/864 (2006.01)* C12N 15/864 100Z

(31)優先権主張番号 61/871,301
(32)優先日 平成25年8月28日(2013.8.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/847,537
(32)優先日 平成25年7月17日(2013.7.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/915,407
(32)優先日 平成25年12月12日(2013.12.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/862,468
(32)優先日 平成25年8月5日(2013.8.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/979,942
(32)優先日 平成26年4月15日(2014.4.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 505028576
プレジデント アンド フェロウズ オヴ ハーヴァード カレッジ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３８ ケンブリッジ クインシー・ストリート １７
(74)代理人 110000109
特許業務法人特許事務所サイクス
(72)発明者 チャン フェン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９ ケンブリッジ パシフィック ストリート １００ アパートメント １１
(72)発明者 リン チェ ユ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２ ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー ７７ マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー内
(72)発明者 ラン フェイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１１６ ボストン クラレンドン ストリート ３０

審査官 西 賢二

(56)参考文献 特表２０１３－５１８６０２（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５２９２８７（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１２／０１２７３８（WO，Ａ１）
特表２００７－５０１６２６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１４／１９１５１８（WO，Ａ１）
CONG, Le et al., "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems", Science, ２０１３年, Vol. 339, pp. 819-823, Supplementary Materials, Published online: 2013 Jan 3

URNOV, Fyodor D. et al., "Genome editing with engineered zinc finger nucleases", Nat. Rev. Genet., ２０１０年, Vol. 11, pp. 636-646
RADECKE, Sarah et al., "Zinc-finger Nuclease-induced Gene Repair With Oligodeoxynucleotides: Wanted and Unwanted Target Locus Modifications", Mol. Ther., ２０１０年, Vol. 18, pp. 743-753
CHYLINSKI, Krzysztof et al., "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems", RNA Biol., ２０１３年, Vol. 10, pp. 726-737, Published online: 2013 Apr 5

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）