

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-521764
(P2022-521764A)

(43)公表日 令和4年4月12日(2022.4.12)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 B 0 5 0
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全145頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-549698(P2021-549698)	(71)出願人	517372508		
(86)(22)出願日	令和2年2月25日(2020.2.25)		エディタス・メディシン、インコーポレ		
(85)翻訳文提出日	令和3年10月19日(2021.10.19)		イテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/019766		アメリカ合衆国、マサチューセッツ州		
(87)国際公開番号	WO2020/176552		0 2 1 4 1、ケンブリッジ、ハーレー・		
(87)国際公開日	令和2年9月3日(2020.9.3)		ストリート 1 1		
(31)優先権主張番号	62/810,320	(74)代理人	100108855		
(32)優先日	平成31年2月25日(2019.2.25)		弁理士 蔵田 昌俊		
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人	100103034		
	米国(US)		弁理士 野河 信久		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100179062		
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(弁理士 井上 正		
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	100199565		
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		弁理士 飯野 茂		
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	100219542		
	最終頁に続く			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 R H O 関連常染色体優性網膜色素変性症 (A D R P) を治療するための C R I S P R / R N A 誘導ヌクレアーゼ関連の方法及び組成物

(57)【要約】
例えば、常染色体優性網膜色素変性症 (a d R P) などの、R H O 関連網膜色素変性症を治療するための C R I S P R / R N A 誘導ヌクレアーゼ関連組成物及び方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

R H O 遺伝子の標的配列に結合する標的ドメインを含む、ガイド R N A (g R N A) 分子。

【請求項 2】

前記標的化ドメインが、R H O 遺伝子の標的ドメインに相補的である、請求項 1 に記載の g R N A 分子。

【請求項 3】

前記標的化ドメインが、R H O 標的位置の 10 ヌクレオチド内で、二本鎖切断及び一本鎖切断から選択される切断事象を提供するように構成される、請求項 1 に記載の g R N A 分子。 10

【請求項 4】

前記 R H O 標的位置が前記 R H O 遺伝子の 5' 領域にある、請求項 1 に記載の g R N A 分子。

【請求項 5】

前記 R H O 遺伝子の 5' 領域が、前記 R H O 遺伝子の 5' 非翻訳 (U T R) 領域、エクソン 1、エクソン 1 / イントロン 1 境界、エクソン 2、及びエクソン 2 / イントロン 1 境界からなる群から選択される、請求項 4 に記載の g R N A 分子。

【請求項 6】

前記標的化ドメインが、表 1 ~ 3 及び 18 のいずれかからの標的化ドメイン配列と同一であるか、又は 3 ヌクレオチド以下が異なる配列を含む、請求項 1 に記載の g R N A 分子。 20

【請求項 7】

前記標的化ドメインが表 1 ~ 3 及び 18 のものから選択される、請求項 1 に記載の g R N A 分子。

【請求項 8】

前記 g R N A がモジュラー g R N A 分子又はキメラ g R N A 分子である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の g R N A 分子。

【請求項 9】

5' から 3' 方向に、
標的化ドメイン；
第 1 の相補的ドメイン；
連結ドメイン；
第 2 の相補的ドメイン；
近位ドメイン；及び
尾部ドメイン
を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の g R N A 分子。 30

【請求項 10】

(a) 前記 R H O 遺伝子の標的ドメインに相補的な標的化ドメインを含む g R N A 分子をコード化する配列を含む核酸。

【請求項 11】

前記 g R N A 分子が、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の g R N A 分子である、請求項 10 に記載の核酸。 40

【請求項 12】

前記標的化ドメインが、R H O 標的位置の 10 ヌクレオチド内で、二本鎖切断及び一本鎖切断から選択される切断事象を提供するように構成される、請求項 11 に記載の核酸。

【請求項 13】

前記標的化ドメインが、表 1 ~ 3 及び 18 のいずれかからの標的化ドメイン配列と同一であるか、又は 3 ヌクレオチド以下が異なる配列を含む、請求項 11 に記載の核酸。

【請求項 14】

前記標的化ドメインが表 1 ~ 3 及び 18 のものから選択される、請求項 11 に記載の核酸 50

。

【請求項 15】

前記 gRNA がモジュラー gRNA 分子又はキメラ分子である、請求項 10 ~ 14 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 16】

前記核酸が、(a) の前記 gRNA 分子をコード化する配列と作動可能に連結するプロモーターを含む、請求項 10 ~ 15 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 17】

(a) の前記 gRNA 分子をコード化する配列と作動可能に連結する前記プロモーターが、U6 プロモーターである、請求項 16 に記載の核酸。

10

【請求項 18】

(b) RNA 誘導ヌクレアーゼ分子をコード化する配列をさらに含む、請求項 10 ~ 17 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 19】

前記 RNA 誘導ヌクレアーゼ分子が、標的核酸中で二本鎖切断を形成する、請求項 18 に記載の核酸。

【請求項 20】

前記 RNA 誘導ヌクレアーゼ分子が、標的核酸中で一本鎖切断を形成する、請求項 18 に記載の核酸。

【請求項 21】

前記一本鎖切断が、前記 gRNA 分子の前記標的化ドメインがそれに相補的である前記標的核酸の前記鎖中に形成される、請求項 20 に記載の核酸。

20

【請求項 22】

前記一本鎖切断が、前記 gRNA の前記標的化ドメインがそれに相補的である前記鎖以外の前記標的核酸の前記鎖中に形成される、請求項 21 に記載の核酸。

【請求項 23】

前記 RNA 誘導ヌクレアーゼ分子が Cas9 分子である、請求項 18 に記載の核酸。

【請求項 24】

前記 Cas9 分子がニッカーゼ分子を含む、請求項 23 に記載の核酸。

【請求項 25】

前記 RNA 誘導ヌクレアーゼ分子が Cpf1 分子である、請求項 18 に記載の核酸。

30

【請求項 26】

前記核酸が、(b) の前記 RNA 誘導ヌクレアーゼ分子をコード化する前記配列と作動可能に連結するプロモーターを含む、請求項 18 ~ 25 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 27】

(b) の前記 RNA 誘導ヌクレアーゼ分子をコード化する前記配列と作動可能に連結する前記プロモーターが、RHO、CMV、EFS、GRK1、CRX、NRL、及び RCVRN プロモーターからなる群から選択されるプロモーターを含む、請求項 26 に記載の核酸。

【請求項 28】

(c) RHO cDNA 分子をさらに含む、請求項 10 ~ 27 のいずれか一項に記載の核酸。

40

【請求項 29】

前記 RHO cDNA 分子が、前記 gRNA 分子とのハイブリッド形成に耐性があるようにコドン修飾されていない、請求項 24 に記載の核酸。

【請求項 30】

前記 RHO cDNA 分子が、前記 RHO 遺伝子のエクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、及びエクソン 5 を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 28 に記載の核酸。

【請求項 31】

50

前記 R H O c D N A 分子が、前記 R H O 遺伝子のエクソン 1、イントロン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、及びエクソン 5 を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 28 に記載の核酸。

【請求項 32】

イントロン 1 が、イントロン 1 の 5' 末端、イントロン 1 の 3' 末端、又はその双方に 1 つ又は複数のランケーションを含む、請求項 28 に記載の核酸。

【請求項 33】

前記核酸が、前記 R H O c D N A 分子の下流の 3' U T R ヌクレオチド配列を含む、請求項 28 ~ 32 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 34】

前記 3' U T R ヌクレオチド配列が、R H O 遺伝子 3' U T R ヌクレオチド配列を含む、請求項 33 に記載の核酸。

【請求項 35】

前記 3' U T R ヌクレオチド配列が、 - グロビン 3' U T R ヌクレオチド配列を含む、請求項 33 に記載の核酸。

【請求項 36】

前記 3' U T R ヌクレオチド配列が、 - グロビン 3' U T R ヌクレオチド配列を含む、請求項 33 に記載の核酸。

【請求項 37】

前記 3' U T R ヌクレオチド配列が、前記 3' U T R ヌクレオチド配列の 5' 末端、前記 3' U T R ヌクレオチド配列の 3' 末端、又はその双方に 1 つ又は複数のランケーションを含む、請求項 33 ~ 36 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 38】

前記核酸が、(c) の前記 R H O c D N A 分子と作動可能に連結するプロモーターを含む、請求項 28 ~ 37 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 39】

(c) の前記 R H O c D N A 分子と作動可能に連結する前記プロモーターが、桿体特異的プロモーターである、請求項 38 に記載の核酸。

【請求項 40】

前記桿体特異的プロモーターが、ヒト R H O プロモーターである、請求項 39 に記載の核酸。

【請求項 41】

前記ヒト R H O プロモーターが、内在性 R H O プロモーターを含む、請求項 40 に記載の核酸。

【請求項 42】

(d) 前記 R H O 遺伝子の第 2 の標的ドメインに相補的な標的化ドメインを有する第 2 の g R N A 分子をコード化する配列をさらに含む、請求項 41 に記載の核酸。

【請求項 43】

前記第 2 の g R N A の前記標的化ドメインが、R H O 標的位置の 10 ヌクレオチド内で、二本鎖切断及び一本鎖切断から選択される切断事象を提供するように構成される、請求項 42 に記載の核酸。

【請求項 44】

前記第 2 の g R N A 分子が、モジュラー g R N A 分子又はキメラ g R N A 分子である、請求項 42 又は 43 に記載の核酸。

【請求項 45】

前記第 2 の g R N A 分子が、キメラ g R N A 分子である、請求項 42 ~ 44 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 46】

前記第 2 の g R N A 分子が、5' から 3' 方向に、
標的化ドメイン；

10

30

40

50

第 1 の相補的ドメイン；
 連結ドメイン；
 第 2 の相補的ドメイン；
 近位ドメイン；及び
 尾部ドメイン

を含む、請求項 4 2 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 4 7】

第 3 の g R N A 分子をさらに含む、請求項 4 2 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 4 8】

第 4 の g R N A 分子をさらに含む、請求項 4 7 に記載の核酸。

10

【請求項 4 9】

(a) 及び (b) のそれぞれが同じ核酸分子上に存在する、請求項 1 8 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 5 0】

前記核酸分子が A A V ベクターである、請求項 4 9 に記載の核酸。

【請求項 5 1】

(a) が第 1 の核酸分子上に存在し、(b) が第 2 の核酸分子上に存在する、請求項 1 8 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 5 2】

前記第 1 及び第 2 の核酸分子が A A V ベクターである、請求項 5 1 に記載の核酸。

20

【請求項 5 3】

(c) 請求項 2 8 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の R H O c D N A 分子をさらに含む、請求項 1 8 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 5 4】

(a) 及び (c) のそれぞれが同じ核酸分子上に存在する、請求項 5 3 に記載の核酸。

【請求項 5 5】

前記核酸分子が A A V ベクターである、請求項 5 4 に記載の核酸。

【請求項 5 6】

(a) が第 1 の核酸分子上に存在し、(c) が第 2 の核酸分子上に存在する、請求項 5 3 に記載の核酸。

30

【請求項 5 7】

前記第 1 及び第 2 の核酸分子が A A V ベクターである、請求項 5 6 に記載の核酸。

【請求項 5 8】

(b) 請求項 1 8 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の R N A 誘導ヌクレアーゼ分子をコード化する配列；及び

(c) 請求項 2 8 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の R H O c D N A 分子をさらに含む、請求項 1 0 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 5 9】

(a) 、(b) 、及び (c) のそれぞれが同じ核酸分子上に存在する、請求項 5 8 に記載の核酸。

40

【請求項 6 0】

前記核酸分子が A A V ベクターである、請求項 5 9 に記載の核酸。

【請求項 6 1】

(a) 、(b) 、及び (c) の 1 つが第 1 の核酸分子上に存在し；

(a) 、(b) 、(c) の第 2 及び第 3 のものが第 2 の核酸分子上に存在する、請求項 5 8 に記載の核酸。

【請求項 6 2】

前記第 1 及び第 2 の核酸分子が A A V ベクターである、請求項 6 1 に記載の核酸。

【請求項 6 3】

(a) が第 1 の核酸分子上に存在し、(b) 及び (c) が第 2 の核酸分子上に存在する、

50

請求項 5 8 に記載の核酸。

【請求項 6 4】

前記第 1 及び第 2 の核酸分子が A A V ベクターである、請求項 6 3 に記載の核酸。

【請求項 6 5】

(b) が第 1 の核酸分子上に存在し、(a) 及び (c) が第 2 の核酸分子上に存在する、請求項 5 8 に記載の核酸。

【請求項 6 6】

前記第 1 及び第 2 の核酸分子が A A V ベクターである、請求項 6 5 に記載の核酸。

【請求項 6 7】

(c) が第 1 の核酸分子上に存在し、(b) 及び (a) が第 2 の核酸分子上に存在する、請求項 5 8 に記載の核酸。 10

【請求項 6 8】

前記第 1 及び第 2 の核酸分子が A A V ベクターである、請求項 6 7 に記載の核酸。

【請求項 6 9】

前記第 1 の核酸分子が A A V ベクター以外であり、前記第 2 の核酸分子が A A V ベクターである、請求項 5 1、5 6、6 1、6 3、6 5、及び 6 7 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 7 0】

請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の g R N A 分子を含む、組成物。

【請求項 7 1】

請求項 1 8 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の (b) C a s 9 分子をさらに含む、請求項 7 0 に記載の組成物。 20

【請求項 7 2】

(c) 請求項 2 8 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の R H O c D N A 分子をさらに含む、請求項 7 1 に記載の組成物。

【請求項 7 3】

第 2 の g R N A 分子をさらに含む、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 7 4】

第 3 の g R N A 分子をさらに含む、請求項 7 3 に記載の組成物。

【請求項 7 5】

第 4 の g R N A 分子をさらに含む、請求項 7 5 に記載の組成物。 30

【請求項 7 6】

前記細胞を

(a) 請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の g R N A ;

(b) 請求項 1 8 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の R N A 誘導ヌクレアーゼ分子 ;

(c) 請求項 2 8 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の R H O c D N A 分子 ; 及び

任意選択的に、(d) 請求項 4 2 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の第 2 の g R N A 分子に接触させるステップを含む、細胞を改変する方法。

【請求項 7 7】

第 3 の g R N A 分子をさらに含む、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

第 4 の g R N A 分子をさらに含む、請求項 7 7 に記載の方法。 40

【請求項 7 9】

前記細胞を (a)、(b)、(c)、及び任意選択的に (d) と接触させるステップを含む、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記細胞が、a d R P に罹患している対象に由来する、請求項 7 6 ~ 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記細胞が、前記 R H O 遺伝子に変異を有する対象に由来する、請求項 7 6 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の方法。 50

【請求項 8 2】

前記細胞が網膜細胞である、請求項 7 6 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記網膜細胞が桿体光受容体である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記細胞が、胚性幹細胞、誘導万能性幹細胞、造血幹細胞、神経細胞幹細胞又は間葉系幹細胞である、請求項 7 6 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記接触が生体外で実施される、請求項 7 6 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記接触した細胞を前記対象の体内に戻す、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記接触が生体内で実施される、請求項 7 6 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記細胞中の前記 R H O 遺伝子における前記変異の存在についての知識を得るステップを含む、請求項 8 0 ~ 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記 R H O 遺伝子の一部を配列決定することによって、前記細胞中の前記 R H O 遺伝子における前記変異の存在についての知識を得るステップを含む、請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

R H O 標的位置を変更して前記 R H O 遺伝子の機能をロックアウトするステップを含む、請求項 7 6 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 1】

接触させるステップが、前記細胞を (a)、(b)、(c)、及び任意選択的に (d) の少なくとも 1 つをコード化する核酸に接触させるステップを含む、請求項 7 6 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 2】

接触させるステップが、(b) の前記 R N A 誘導ヌクレアーゼ分子と、(a) 及び (c)、及び任意選択的に (d) をコード化する核酸とを前記細胞に送達するステップを含む、請求項 7 6 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 3】

接触させるステップが、(b) の前記 R N A 誘導ヌクレアーゼ分子、(a) の前記 g R N A 分子、及び (c) の前記 R H O c D N A 分子を前記細胞に送達するステップを含む、請求項 7 6 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 4】

接触させるステップが、(a) の前記 g R N A 分子と、(c) の前記 R H O c D N A 分子と、(b) の前記 R N A 誘導ヌクレアーゼ分子をコード化する核酸とを前記細胞に送達するステップを含む、請求項 7 6 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 5】

対象 (又は前記対象の細胞) を

(a) 請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の g R N A ;

(b) 請求項 1 8 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の R N A 誘導ヌクレアーゼ分子 ;

(c) 請求項 2 8 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の R H O c D N A 分子 ; 及び

任意選択的に、(d) 請求項 4 2 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の第 2 の g R N A と接触させる方法。

【請求項 9 6】

第 3 の g R N A 分子をさらに含む、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

第 4 の g R N A 分子をさらに含む、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

10

20

30

40

50

前記対象を (a)、(b)、(c)、及び任意選択的に (d) と接触させるステップをさらに含む、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記対象が a d R P に罹患している、請求項 9 5 ~ 9 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記対象が前記 R H O 遺伝子に変異を有する、請求項 9 5 ~ 9 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記対象中の前記 R H O 遺伝子における前記変異の存在についての知識を得るステップを含む、請求項 9 5 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 0 2】

前記 R H O 遺伝子の一部を配列決定することによって、前記対象中の前記 R H O 遺伝子における前記変異の存在についての知識を得るステップを含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

R H O 標的位置を変更して前記 R H O 遺伝子の機能をロックアウトするステップを含む、請求項 9 5 ~ 1 0 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記対象の細胞が、生体外で、(a)、(b)、(c)、及び任意選択的に (d) に接触される、請求項 9 5 ~ 1 0 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 0 5】

前記細胞を前記対象の体内に戻す、請求項 1 0 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記治療が、細胞を前記対象の身体に導入するステップを含み、前記細胞対象が、生体外で、(a)、(b)、(c)、及び任意選択的に (d) に接触される、請求項 9 5 ~ 1 0 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記接触させるステップが生体内で実施される、請求項 9 5 ~ 1 0 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

30

前記接触させるステップが静脈内送達を含む、請求項 1 0 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 9】

接触させるステップが、前記対象を (a)、(b)、(c)、及び任意選択的に (d) の少なくとも 1 つをコード化する核酸に接触させるステップを含む、請求項 9 5 ~ 1 0 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

接触させるステップが、前記対象を請求項 1 0 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の核酸に接触させるステップを含む、請求項 9 5 ~ 1 0 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

接触させるステップが、(b) の前記 R N A 誘導ヌクレアーゼ分子と、(a) 及び (c)、及び任意選択的に (d) をコード化する (encodes and) 核酸とを前記対象に送達するステップを含む、請求項 9 5 ~ 1 0 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 1 2】

接触させるステップが、(b) の前記 R N A 誘導ヌクレアーゼ分子、(a) の前記 g R N A、及び (c) の前記 R H O c D N A 分子、及び任意選択的に (d) の前記第 2 の g R N A を前記対象に送達するステップを含む、請求項 9 5 ~ 1 0 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 3】

接触させるステップが、(a) の前記 g R N A と、(c) の前記 R H O c D N A 分子と、(b) の前記 R N A 誘導ヌクレアーゼ分子をコード化する核酸とを前記対象に送達する

50

ステップを含む、請求項 95 ~ 108 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 114】

本明細書に記載の gRNA、核酸、又は組成物、及び adRP を有する対象からの、又は前記 RHO 遺伝子に変異を有する対象からの細胞を含む、反応混合物。

【請求項 115】

(a) 請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の gRNA 分子、又は前記 gRNA をコード化する核酸、及び

(b) 請求項 18 ~ 27 のいずれか一項に記載の Cas9 分子；

(c) 請求項 28 ~ 41 のいずれか一項に記載の RHO cDNA 分子；

任意選択的に、(d) 請求項 42 ~ 46 のいずれか一項に記載の第 2 の gRNA 分子；及び

(e) (b) 及び (c) の 1 つ又は複数をコード化する核酸の 1 つ又は複数を含むキット。

【請求項 116】

(a)、(b)、(c)、及び (d) の 1 つ又は複数をコード化する核酸を含む、請求項 115 に記載のキット。

【請求項 117】

前記 RHO 遺伝子の RHO 標的位置を標的化する第 3 の gRNA 分子をさらに含む、請求項 116 に記載のキット。

【請求項 118】

前記 RHO 遺伝子の RHO 標的位置を標的化する第 4 の gRNA 分子をさらに含む、請求項 117 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権主張

本出願は、その主題が、あたかも本明細書に完全に記載されているかのように、その全体が本明細書に参照により援用される、2019年2月25日に出願された米国仮特許出願第 62/810,320 号明細書の優先権を主張する。

【0002】

本開示は、標的核酸配列を編集するための CRISPR / RNA 誘導ヌクレアーゼ関連の方法及び構成要素、及び常染色体優性網膜色素変性症 (ADRP) に関連するそれらの適用に関する。

【背景技術】

【0003】

光受容体及び網膜色素上皮細胞に影響を及ぼす遺伝性網膜ジストロフィーである網膜色素変性症 (RP) は、進行性の網膜の劣化及び萎縮を特徴とし、罹患した患者の漸進的視力喪失と、最終的には失明をもたらす。RP は、ホモ接合型とヘテロ接合型の双方の変異に起因し得て、例えば、常染色体優性 RP (ADRP)、常染色体劣性 RP (ARRP)、又は X 連鎖 RP (X-LRP) などの様々な形態で存在し得る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

RP の治療選択肢は限られており、RP の進行を停止又は逆転させる得る承認された治療法は現在ない。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本明細書で提供される戦略、方法、組成物、及び治療様式のいくつかの態様は、常染色体優性網膜色素変性症 (ADRP) に罹患している対象の罹患細胞及び組織に、ゲノム編集システムを送達する、新しい効果的な手段を提供することによって、この分野に

10

20

30

40

50

おける重要な満たされていない必要性に対処する。本開示のいくつかの態様は、網膜細胞への a d R P 関連遺伝子ロドプシンを標的化するゲノム編集システムを導入するためのストラテジー、方法、及び組成物を提供する。このようなストラテジー、方法、及び組成物は、いくつかの実施形態では、例えば、このようなロドプシン変異型の機能喪失をもたらす遺伝子編集イベントを誘導するために、ロドプシン遺伝子の a d R P 関連変異型を編集するのに有用である。いくつかの実施形態では、このようなストラテジー、方法、及び組成物は、例えば常染色体優性型 R P を有する対象などのそれを必要とする対象に投与するための治療法として有用である。したがって、本明細書で提供されるストラテジー、方法、組成物、及び治療法は、例えば、a d R P の治療のためなど、R P の治療のための臨床的介入の開発における重要な前進に相当する。

10

【0006】

R H O 遺伝子はロドプシントタンパク質をコード化し、網膜光受容体 (P R) 桿体細胞で発現される。ロドプシンは、桿体細胞の外節で発現される G タンパク質共役受容体であり、光伝達カスケードの重要な要素である。R H O 遺伝子の欠陥は、典型的には、野生型ロドプシンの産生の減少及び / 又は光受容体機能の中断と対応する視力喪失とにつながる、変異型ロドプシンの発現を特徴とする。R H O の変異は典型的には、最初に P R 桿体細胞の変性をもたらし、疾患の進行に伴って P R 錐体細胞の変性がそれに続く。R H O 変異のある対象は、夜間視力の進行性喪失、並びに末梢視野の喪失と、それに続く中心視野の喪失とを経験する。例示的な R H O 変異は、表 A で提供される。

【0007】

20

本開示のいくつかの態様は、例えば、RNA 誘導ヌクレアーゼ (例えば、Cas9 又は Cpf1 分子) 及び 1 つ又は複数のガイド RNA (g RNA) によって媒介される、1 つ又は複数のヌクレオチドの挿入又は欠失によって、野生型及び / 又は変異型 R H O 遺伝子の配列を改変するなど、R H O 遺伝子の配列を改変するためのストラテジー、方法、組成物、及び治療様式を例えば、細胞において又は a d R P を有する患者において提供し、R H O 遺伝子配列の機能の喪失をもたらす。このタイプの改変は、R H O 遺伝子の「ノックアウト」とも称される。本開示のいくつかの態様は、例えば、機能的ロドプシントタンパク質 (例えば、野生型ロドプシントタンパク質) をコード化する外因性 R H O 相補的 DNA (c DNA) 配列を送達することによって、例えば、RNA 誘導ヌクレアーゼ媒介性の R H O のノックアウトに供された細胞において、外因性 R H O を発現するためのストラテジー、方法、組成物、及び治療様式を提供する。

30

【0008】

特定の実施形態では、R H O 遺伝子の 5 ' 領域 (例えば、5 ' 非翻訳領域 (U T R)、エクソン 1、エクソン 2、イントロン 1、エクソン 1 / イントロン 1 境界又はエクソン 2 / イントロン 1 境界) が RNA 誘導ヌクレアーゼによって標的化され、遺伝子が改変される。特定の実施形態では、R H O 遺伝子の任意の領域 (例えば、プロモーター領域、5 ' 非翻訳領域、3 ' 非翻訳領域、エクソン、イントロン、又はエクソン / イントロン境界) が RNA 誘導ヌクレアーゼによって標的化され、遺伝子が改変される。特定の実施形態では、R H O 遺伝子の非コード領域 (例えば、エンハンサー領域、プロモーター領域、イントロン、5 ' U T R、3 ' U T R、ポリアデニル化シグナル) が標的化され、遺伝子が改変され 40 る。特定の実施形態では、R H O 遺伝子のコード領域 (例えば、初期コード領域、エクソン) が標的化されて、遺伝子が改変される。特定の実施形態では、R H O 遺伝子のエクソン / イントロンの境界にわたる領域 (例えば、エクソン 1 / イントロン 1、エクソン 2 / イントロン 1) が標的化され、遺伝子が改変される。特定の実施形態では、R H O 遺伝子の領域が標的化され、これは、改変されると停止コドンをもたらし、R H O 遺伝子がノックアウトされる。特定の実施形態では、変異型 R H O 遺伝子の改変は、変異非依存性様式で発生し、これは、表 A に記載される各 R H O 変異の治療ストラテジーを開発する必要性を回避するという利点を提供する。

【0009】

一実施形態では、治療後、例えば、a d R P の進行が遅延、抑制、予防、又は停止され、

50

P R 細胞変性が、遅延、抑制、予防及び／又は停止され、及び／又は視力喪失が改善されるなど、例えば、視力喪失の進行が遅延、抑制、予防、又は停止されるなど、a d R P に関連する１つ又は複数の症状（例えば、夜盲症、異常な網膜電図、白内障、視野欠損、桿体錐体ジストロフィー、又はa d R P に関連することが知られているその他の症状）が改善される。一実施形態では、治療後、例えば、P R 細胞の変性が遅延するなど、a d R P の進行が遅延する。一実施形態では、治療後、a d R P の進行が逆転し、例えば、既存のP R 桿体細胞及び錐体細胞の機能及び／又は新しいP R 桿体細胞及び錐体細胞の誕生が増加／増強され、及び／又は例えば、視力喪失の進行などの視力喪失が、遅延、抑制、予防、又は停止される。

【 0 0 1 0 】

10

一実施形態では、本開示のC R I S P R / R N A 誘導ヌクレアーゼ関連の方法及び構成要素及び組成物は、例えば、コード化されたR H O m R N A 又はR H O タンパク質など、例えば、コード化されたR H O 遺伝子産物のランケーション、ナンセンス変異、又はその他のタイプの機能喪失をもたらすヌクレオチド置換など、例えば、影響を受けたR H O 遺伝子又は対立遺伝子の機能喪失をもたらすインデルを作成することによって、R H O の標的位置で配列を改変すること；例えば、単一ヌクレオチド、二重ヌクレオチド、又はその他のフレームシフト欠失、又は早期停止コドンをもたらす欠失など、例えば、コード化されたR H O m R N A 又はR H O タンパク質など、コード化されたR H O 遺伝子産物のランケーション、ナンセンス変異、又はその他のタイプの機能喪失をもたらす１つ又は複数のヌクレオチドの欠失；又は、例えば、単一ヌクレオチド、二重ヌクレオチド、又はその他のフレームシフト挿入、又は早期停止コドンをもたらす挿入など、例えば、コード化されたR H O m R N A 又はR H O タンパク質など、コード化されたR H O 遺伝子産物のランケーション、ナンセンス変異、又はその他のタイプの機能喪失をもたらす挿入によって、a d R P に関連する変異型R H O 遺伝子の改変（例えば、ノックアウト）を提供する。いくつかの実施形態では、本開示のC R I S P R / R N A 誘導ヌクレアーゼ関連の方法及び構成要素及び組成物は、例えば、コード化されたR H O 転写物など、例えば、コード化された遺伝子産物のナンセンス介在性崩壊をもたらすインデルの作成など、R H O の標的位置で配列を改変することによって、a d R P に関連する変異型R H O 遺伝子の改変（例えば、ノックアウト）を提供する。

20

【 0 0 1 1 】

30

一態様では、本明細書で開示されるのは、例えば、R H O 遺伝子からの標的ドメインと相補的な標的化ドメインを含む、単離された又は非天然 g R N A 分子などの、g R N A 分子である。

【 0 0 1 2 】

一実施形態では、g R N A 分子の標的化ドメインは、例えば、R H O 遺伝子におけるR H O の標的位置に十分に近い二本鎖切断又は一本鎖切断などの切断事象を提供し、R H O 遺伝子の改変を可能にするように構成され、例えば、R H O 遺伝子産物（例えば、R H O 転写物又はR H O タンパク質）の発現の減少又は消失、又は機能不全又は非機能的R H O 遺伝子産物（例えば、短縮型R H O タンパク質又は転写物）の発現によって特徴付けられる、例えば、R H O 遺伝子の機能喪失など、R H O 遺伝子活性の破壊（例えば、ノックアウト）がもたらされる。一実施形態では、標的化ドメインは、例えば、二本鎖又は一本鎖切断などの切断事象が、R H O 標的位置の１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０又は２００ヌクレオチド内に位置するように構成される。例えば、二本鎖又は一本鎖切断などの切断は、R H O 遺伝子中のR H O 標的位置の上流又は下流に配置され得る。

40

【 0 0 1 3 】

一実施形態では、第２の標的化ドメインを含む第２のg R N A 分子は、例えば、R H O 遺伝子におけるR H O 標的位置に十分に近い二本鎖切断又は一本鎖切断などの切断事象を提供し、単独で、又は前記第１のg R N A 分子によって配置された切断と組み合わせるのいずれかで、R H O 遺伝子の改変を可能にするように構成される。一実施形態では、第１及

50

び第2のgRNA分子標的化ドメインは、例えば、二本鎖又は一本鎖切断などの切断事象が、標的位置の1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150又は200ヌクレオチド内のgRNA分子のそれぞれから独立して位置するように構成される。一実施形態では、例えば、二本鎖又は一本鎖切断などの切断は、RHO遺伝子中でRHO標的位置のヌクレオチドの両側に配置される。一実施形態では、例えば、二本鎖又は一本鎖切断などの切断は、RHO遺伝子中のRHO標的位置のヌクレオチドの例えば、上流又は下流などの片方の側に配置される。

【0014】

一実施形態では、一本鎖切断は、下で考察されるように、第2のgRNA分子によって配置される追加的一本鎖切断を伴う。例えば、標的化ドメインは、例えば、2つの一本鎖切断などの切断事象が、RHO標的位置の1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150又は200ヌクレオチド内に位置するように構成される。一実施形態では、第1及び第2のgRNA分子は、Cas9ニッカザを誘導すると、一本鎖切断が、第2のgRNAによって配置される互いに十分に近い追加的一本鎖切断を伴い、RHO遺伝子中のRHO標的位置改変をもたらすように構成される。一実施形態では、第1及び第2のgRNA分子は、例えば、Cas9がニッカザである場合、前記第2のgRNAによって配置される一本鎖切断が、前記第1のgRNA分子によって配置される切断の10、20、30、40、又は50ヌクレオチド内であるように構成される。一実施形態では、2つのgRNA分子は、異なる鎖上の同一位置に、又は互いに少数のヌクレオチド内に、切断を配置させるように構成されて、例えば、二本鎖切断を本質的に模倣する。

【0015】

一実施形態では、二本鎖切断は、下で考察されるように、第2のgRNA分子によって配置される追加の二本鎖切断を伴い得る。例えば、第1のgRNA分子の標的化ドメインは、二本鎖切断が、例えば、標的位置の1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150又は200ヌクレオチド内など、RHO遺伝子中のRHO標的位置の上流に配置されるように構成され；第2のgRNA分子の標的化ドメインは、二本鎖切断が、例えば、標的位置の1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150又は200ヌクレオチド内など、RHO遺伝子中のRHO標的位置の下流に配置されるように構成される。

【0016】

一実施形態では、二本鎖切断は、第2のgRNA分子及び第3のgRNA分子によって配置される2つの追加的一本鎖切断を伴い得る。例えば、第1のgRNA分子の標的化ドメインは、二本鎖切断が、例えば、標的位置の1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150又は200ヌクレオチド内など、RHO遺伝子中のRHO標的位置の上流に配置されるように構成され；第2及び第3のgRNA分子の標的化ドメインは、2つの一本鎖切断が、例えば、標的位置の1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150又は200ヌクレオチド内などのRHO遺伝子中のRHO標的位置の下流に配置されるように構成されている。一実施形態では、第1、第2、及び第3のgRNA分子の標的化ドメインは、例えば、二本鎖又は一本鎖切断などの切断事象が、各gRNA分子から独立して位置するように構成される。

【0017】

一実施形態では、第1及び第2の一本鎖切断は、第3のgRNA分子及び第4のgRNA分子によって配置される、2つの追加的一本鎖切断を伴い得る。例えば、第1及び第2のgRNA分子の標的化ドメインは、2つの一本鎖切断が、例えば、標的位置の1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150又は200ヌクレオチド内などのRHO遺伝子中のRHO標的位置

10

20

30

40

50

置の上流に配置されるように構成され；第3及び第4のgRNA分子の標的化ドメインは、2つの一本鎖切断が、例えば、標的位置の1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150又は200ヌクレオチド内などのRHO遺伝子中のRHO標的位置の下流に配置されるように構成されている。

【0018】

本明細書では、複数のgRNAが使用されて、(1)近傍の2つの一本鎖切断、(2)RHOの標的位置に隣接する1つの二本鎖切断と2つの対のニック(例えば、DNAの一部を除去するため)、又は(3)標的位置の両側に2つずつの4つの一本鎖切断が生じる場合、それらは、同一RHO標的位置を標的化することが検討される。本明細書では、複数のgRNAを使用して、同一遺伝子の2つ以上のRHO標的位置が標的化されてもよいことがさらに検討される。

10

【0019】

いくつかの実施形態では、第1のgRNA分子の標的化ドメイン及び第2のgRNA分子の標的化ドメインは、対向する標的鎖核酸分子と相補的である。いくつかの実施形態では、gRNA分子及び第2のgRNA分子は、PAMが外側を向くように構成される。

【0020】

一実施形態では、gRNA分子の標的化ドメインは、標的ドメインの例えばAlu反復などの反復要素などの望まれない標的染色体要素を回避するように構成される。gRNA分子は、第1、第2、第3及び/又は第4のgRNA分子であってもよい。

20

【0021】

一実施形態では、RHO標的位置は、RHO遺伝子のエクソン1又はエクソン2に位置する標的位置であり、gRNA分子の標的化ドメインは、表1からの標的化ドメイン配列と同じであるか、又は1、2、3、4、又は5ヌクレオチド以下が異なる配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは表1のものから選択される。一実施形態では、RHO標的位置は、RHO遺伝子の5'UTR領域に位置する標的位置であり、gRNA分子の標的化ドメインは、表2からのいずれかの標的化ドメイン配列と同じであるか、又は1、2、3、4、又は5ヌクレオチド以下が異なる配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは表2のものから選択される。一実施形態では、標的位置は、RHO遺伝子のイントロン1領域に位置する標的位置であり、gRNA分子の標的化ドメインは、表3からのいずれかの標的化ドメイン配列と同じであるか、又は1、3、3、4、又は5ヌクレオチド以下が異なる配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは表3のものから選択される。一実施形態では、標的位置は、RHO遺伝子中に位置する標的位置であり、gRNA分子の標的化ドメインは、表18からのいずれかの標的化ドメイン配列と同じであるか、又は1、2、3、4、又は5ヌクレオチド以下が異なる配列を含む。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは表18のものから選択される。一実施形態では、例えば、RHO遺伝子と相補的な標的化ドメインを含むgRNAなどのgRNAは、モジュラーgRNAである。その他の実施形態では、gRNAは、単分子又はキメラgRNAである。

30

【0022】

一実施形態では、RHO遺伝子と相補的な標的化ドメインは、17ヌクレオチド長以上である。一実施形態では、標的化ドメインは17ヌクレオチド長である。その他の実施形態では、標的化ドメインは18ヌクレオチド長である。なおもその他の実施形態では、標的化ドメインは19ヌクレオチド長である。なおもその他の実施形態では、標的化ドメインは20ヌクレオチド長である。なおもその他の実施形態では、標的化ドメインは21ヌクレオチド長である。なおもその他の実施形態では、標的化ドメインは22ヌクレオチド長である。なおもその他の実施形態では、標的化ドメインは23ヌクレオチド長である。なおもその他の実施形態では、標的化ドメインは24ヌクレオチド長である。なおもその他の実施形態では、標的化ドメインは25ヌクレオチド長である。なおもその他の実施形態では、標的化ドメインは26ヌクレオチド長である。

40

50

【 0 0 2 3 】

本明細書に記載の g R N A は、5' から 3' 方向に、標的化ドメイン（「コアドメイン」、及び任意選択的に「二次ドメイン」を含む）；第 1 の相補的ドメイン；連結ドメイン；第 2 の相補的ドメイン；近位ドメイン；及び尾部ドメインを含んでもよい。いくつかの実施形態では、隣接ドメイン及びテールドメインは、合わせて単一ドメインとされる。

【 0 0 2 4 】

一実施形態では、g R N A は、25ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも20ヌクレオチド長の隣接及びテールドメイン；及び17、18、19又は20ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む。

【 0 0 2 5 】

別の実施形態では、g R N A は、25ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも30ヌクレオチド長の隣接及びテールドメイン；及び17、18、19又は20ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む。

【 0 0 2 6 】

別の実施形態では、g R N A は、25ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも30ヌクレオチド長の隣接及びテールドメイン；及び17、18、19又は20ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む。

【 0 0 2 7 】

別の実施形態では、g R N A は、25ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも40ヌクレオチド長の隣接及びテールドメイン；及び17、18、19又は20ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む。

【 0 0 2 8 】

例えば、二本鎖又は一本鎖切断などの切断事象は、RNA誘導ヌクレアーゼ（例えば、Cas9又はCpf1分子）によって発生する。Cas9分子は、例えば、標的核酸中に二本鎖切断を形成するe a C a s 9分子、又は標的核酸中に一本鎖切断を形成するe a C a s 9分子などの酵素的に活性なCas9（e a C a s 9）分子（例えば、ニッカーゼ分子）であってもよい。特定の実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼは、Cpf1分子であってもよい。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼ（例えば、e a C a s 9分子又はCpf1分子）は、二本鎖切断を触媒する。

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態では、e a C a s 9分子は、HNH様領域切断活性を含むが、N末端RuvC様領域切断活性はほぼ皆無である。この場合、e a C a s 9分子はHNH様ドメインニッカーゼであり、例えば、e a C a s 9分子はD10に、例えばD10Aなどの変異を含む。その他の実施形態では、e a C a s 9分子は、N末端RuvC様領域切断活性を含むが、HNH様領域切断活性はほぼ皆無である。この事例では、e a C a s 9分子はN末端RuvC様領域ニッカーゼであり、例えば、e a C a s 9分子はH840に、例えばH840Aなどの変異を含む。

【 0 0 3 1 】

特定の実施形態では、Cas9分子は、Cas9タンパク質の一過性発現のために設計された自己不活性化Cas9分子であってもよい。

【 0 0 3 2 】

一実施形態では、一本鎖切断は、前記g R N Aの標的化ドメインがそれに対して相補的である、標的核酸鎖中に形成される。別の実施形態では、一本鎖切断は、前記g R N Aの標的化ドメインがそれに対して相補的である鎖以外の標的核酸鎖中に形成される。

【 0 0 3 3 】

別の態様では、本明細書に開示されるのは、(a)本明細書で開示されるような標的化ドメインを含む、例えば、DNAなどの、例えば、単離又は非天然核酸などの、g R N A分子をコード化する配列を含む核酸である。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

一実施形態では、核酸は、例えば、RHO遺伝子におけるRHO標的位置に十分に近い二本鎖切断又は一本鎖切断などの切断事象を提供し、RHO遺伝子の改変を可能にするように構成された標的化ドメインを含む、第1のgRNA分子などのgRNA分子をコード化する。一実施形態では、核酸は、例えば、表1～3及び18に記載されているものから選択される標的化ドメイン配列と同じであるか、又は1、2、3、4、又は5ヌクレオチド以下が異なる配列を含む、標的化ドメインを含む第1のgRNA分子などのgRNA分子をコード化する。一実施形態では、核酸は、表1～3及び18に記載されているものから選択される標的化ドメイン配列を含む、gRNA分子をコード化する。

【 0 0 3 5 】

一実施形態では、核酸は、モジュラーgRNAをコード化し、例えば、1つ又は複数の核酸が、モジュラーgRNAをコード化する。その他の実施形態では、核酸は、キメラgRNAをコード化する。核酸は、例えば、17ヌクレオチド長以上を含む標的化ドメインを含む、第1のgRNA分子などのgRNAをコード化してもよい。一実施形態では、核酸は、例えば、17ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む第1のgRNA分子などのgRNAをコード化する。その他の実施形態では、核酸は、例えば、18ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む第1のgRNA分子などのgRNAをコード化する。なおもその他の実施形態では、核酸は、例えば、19ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む第1のgRNA分子などのgRNAをコード化する。なおもその他の実施形態では、核酸は、例えば、20ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む第1のgRNA分子などのgRNAをコード化する。

【 0 0 3 6 】

一実施形態では、核酸は、5'から3'方向に、標的化ドメイン(「コアドメイン」、及び任意選択的に「二次ドメイン」を含む)；第1の相補的ドメイン；連結ドメイン；第2の相補的ドメイン；近位ドメイン；及び尾部ドメインを含むgRNAをコード化する。いくつかの実施形態では、隣接ドメイン及びテールドメインは、合わせて単一ドメインとされる。

【 0 0 3 7 】

一実施形態では、核酸は、例えば、25ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも20ヌクレオチド長の隣接及びテールドメイン；及び17、18、19又は20ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む第1のgRNA分子などのgRNAをコード化する。

【 0 0 3 8 】

一実施形態では、核酸は、例えば、25ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも30ヌクレオチド長の隣接及びテールドメイン；及び17、18、19又は20ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む第1のgRNA分子などのgRNAをコード化する。

【 0 0 3 9 】

一実施形態では、核酸は、例えば、25ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも30ヌクレオチド長の隣接及びテールドメイン；及び17、18、19又は20ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む第1のgRNA分子などのgRNAをコード化する。

【 0 0 4 0 】

一実施形態では、例えば、第1のgRNA分子などのgRNAをコード化する核酸は、25ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも40ヌクレオチド長の隣接及びテールドメイン；及び17、18、19又は20ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む。

【 0 0 4 1 】

一実施形態では、核酸は、(a)本明細書で開示されるようなRHO遺伝子のRHO標的化ドメインと相補的な標的化ドメインを含む、例えば、第1のgRNA分子などのgRNA

10

20

30

40

50

A 分子をコード化する配列を含み、(b) RNA 誘導ヌクレアーゼをコード化する配列（例えば、Cas9 又は Cpf1 分子）をさらに含む。

【0042】

Cas9 分子は、例えば、標的核酸中に二本鎖切断を形成する eCas9 分子、又は標的核酸中に一本鎖切断を形成する eCas9 分子などの酵素的に活性な Cas9 (eCas9) 分子（例えば、ニッカーゼ分子）であってもよい。

【0043】

本明細書で開示される核酸は、(a) 本明細書で開示されるような RHO 遺伝子中の RHO 標的ドメインと相補的な標的化ドメインを含む、gRNA 分子をコード化する配列；(b) RNA 誘導ヌクレアーゼをコード化する配列（例えば、Cas9 又は Cpf1 分子）；(c) RHO cDNA 分子を含んでもよく、(d) (i) RHO 遺伝子の第2の標的ドメインに相補的な標的化ドメインを有する本明細書に記載の第2の gRNA 分子をコード化する配列、及び任意選択的に、(ii) RHO 遺伝子の第3の標的ドメインに相補的な標的化ドメインを有する本明細書に記載の第3の gRNA 分子をコード化する配列、及び任意選択的に、(iii) RHO 遺伝子の第4の標的ドメインに相補的な標的化ドメインを有する本明細書に記載の第4の gRNA 分子をコード化する配列をさらに含む。

【0044】

一実施形態では、RHO cDNA 分子は二本鎖核酸である。いくつかの実施形態では、RHO cDNA 分子は、ロドプシンタンパク質をコード化する、例えば、1つ又は複数のヌクレオチドなどのヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態では、RHO cDNA 分子は、コドン修飾されていない。特定の実施形態では、RHO cDNA 分子はコドン修飾され、gRNA 分子とのハイブリッド形成に対する耐性が提供される。特定の実施形態では、RHO cDNA 分子はコドン修飾され、コード化された RHO タンパク質（例えば、配列番号 13 ~ 18）の改善された発現が提供される。特定の実施形態では、RHO cDNA 分子は、RHO 遺伝子のエクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、及びエクソン 5 を含むヌクレオチド配列を含んでもよい。特定の実施形態では、RHO cDNA は、イントロン（例えば、配列番号 4 ~ 7）を含んでもよい。特定の実施形態では、RHO cDNA 分子は、RHO 遺伝子のエクソン 1、イントロン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、及びエクソン 5 を含むヌクレオチド配列を含んでもよい。特定の実施形態では、RHO cDNA 分子は、RHO 遺伝子のエクソン 1、イントロン 1、エクソン 2、イントロン 2、エクソン 3、イントロン 3、エクソン 4、イントロン 4、及びエクソン 5 から選択される配列を含むか又はそれからなる、ヌクレオチド配列の 1つ又は複数を含んでもよい。特定の実施形態では、イントロンは、イントロン 1 の 5' 末端、イントロン 1 の 3' 末端、又はその双方に 1つ又は複数のランケーションを含む。

【0045】

一実施形態では、標的化ドメインを含む第2の gRNA 分子をコード化する核酸は、例えば、RHO 遺伝子における RHO 標的位置に十分に近い二本鎖切断又は一本鎖切断などの切断事象を提供し、単独で、又は前記第1の gRNA 分子によって配置された切断と組み合わせるいずれかで、RHO 遺伝子の改変を可能にするように構成される。

【0046】

一実施形態では、標的化ドメインを含む第3の gRNA 分子をコード化する核酸は、例えば、RHO 遺伝子における RHO 標的位置に十分に近い二本鎖切断又は一本鎖切断などの切断事象を提供し、単独で、又は第1の及び / 又は第2の gRNA 分子によって配置された切断と組み合わせるいずれかで、RHO 遺伝子の改変を可能にするように構成される。

【0047】

一実施形態では、標的化ドメインを含む第4の gRNA 分子をコード化する核酸は、例えば、RHO 遺伝子における RHO 標的位置に十分に近い二本鎖切断又は一本鎖切断などの切断事象を提供し、単独で、又は第1の gRNA 分子、第2の gRNA 分子、及び第3の gRNA 分子によって配置された切断と組み合わせるいずれかで、改変を可能にするよ

10

20

30

40

50

うに構成される。

【 0 0 4 8 】

一実施形態では、核酸は、第 2 の g R N A 分子をコード化する。第 2 の g R N A は、第 1 の g R N A 分子と同じ R H O 標的位置を標的化するように選択される。任意選択的に、核酸は第 3 の g R N A をコード化してもよく、さらに任意選択的に、核酸は第 4 の g R N A 分子をコード化してもよい。第 3 の g R N A 分子及び第 4 の g R N A 分子は、第 1 及び第 2 の g R N A 分子と同じ R H O 標的位置を標的化するように選択される。

【 0 0 4 9 】

一実施形態では、核酸は、表 1 ~ 3 及び 1 8 に記載されているものから選択される標的化ドメイン配列と同じであるか、又は 1、2、3、4、又は 5 ヌクレオチド以下が異なる配列を含む標的化ドメインを含む、第 2 の g R N A 分子をコード化する。一実施形態では、核酸は、表 1 ~ 3 及び 1 8 に記載されているものから選択される標的化ドメインを含む、第 2 の g R N A 分子をコード化する。一実施形態では、第 3 の又は第 4 の g R N A 分子が存在する場合、第 3 及び第 4 の g R N A 分子は、表 1 ~ 3 及び 1 8 に記載されているものから選択される標的化ドメイン配列と同じであるか、又は 1、2、3、4、又は 5 ヌクレオチド以下が異なる配列を含む標的化ドメインを独立して含んでもよい。さらなる実施形態では、第 3 の又は第 4 の g R N A 分子が存在する場合、第 3 の及び第 4 の g R N A 分子は、表 1 ~ 3 及び 1 8 に示されるものから選択される標的化ドメインを独立して含んでもよい。

【 0 0 5 0 】

一実施形態では、核酸はモジュラー g R N A である第 2 の g R N A をコード化し、例えば、1 つ又は複数の核酸分子がモジュラー g R N A をコード化する。その他の実施形態では、第 2 の g R N A をコード化する核酸はキメラ g R N A である。その他の実施形態では、核酸が第 3 又は第 4 の g R N A をコード化する場合、第 3 及び第 4 の g R N A はモジュラー g R N A 又はキメラ g R N A であってもよい。複数の g R N A が使用される場合、モジュラー又はキメラ g R N A の任意の組合せが使用されてもよい。

【 0 0 5 1 】

核酸は、1 7 ヌクレオチド長以上を含む標的化ドメインを含む第 2、第 3、及び / 又は第 4 の g R N A をコード化してもよい。一実施形態では、核酸は、1 7 ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む第 2 の g R N A をコード化する。その他の実施形態では、核酸は、1 8 ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む第 2 の g R N A をコード化する。なおもその他の実施形態では、核酸は、1 9 ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む第 2 の g R N A をコード化する。なおもその他の実施形態では、核酸は、2 0 ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む第 2 の g R N A をコード化する。

【 0 0 5 2 】

一実施形態では、核酸は、5 ' から 3 ' 方向に、標的化ドメイン；第 1 の相補的ドメイン；連結ドメイン；第 2 の相補的ドメイン；近位ドメイン；及び尾部ドメインを含む、第 2、第 3、及び / 又は第 4 の g R N A をコード化する。いくつかの実施形態では、隣接ドメイン及びテールドメインは、合わせて単一ドメインとされる。

【 0 0 5 3 】

一実施形態では、核酸は、2 5 ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも 2 0 ヌクレオチド長の近位及び尾部ドメイン；1 7、1 8、1 9 又は 2 0 ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む、第 2、第 3、及び / 又は第 4 の g R N A をコード化する。

【 0 0 5 4 】

一実施形態では、核酸は、2 5 ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも 3 0 ヌクレオチド長の近位及び尾部ドメイン；1 7、1 8、1 9 又は 2 0 ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む、第 2、第 3、及び / 又は第 4 の g R N A をコード化する。

【 0 0 5 5 】

一実施形態では、核酸は、2 5 ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも 3 0 ヌクレオチド長の近位及び尾部ドメイン；1 7、1 8、1 9 又は 2 0 ヌクレオチド

10

20

30

40

50

長の標的化ドメインを含む、第2、第3、及び/又は第4のgRNAをコード化する。

【0056】

一実施形態では、核酸は、25ヌクレオチド長以下の連結ドメイン；合わせると少なくとも40ヌクレオチド長の近位及び尾部ドメイン；17、18、19又は20ヌクレオチド長の標的化ドメインを含む、第2、第3、及び/又は第4のgRNAをコード化する。

【0057】

上述されるように、核酸は、(a)RHO遺伝子の標的ドメインと相補的な標的ドメインを含むgRNA分子をコード化する配列、(b)RNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9又はCpf1分子)をコード化する配列、及び(c)RHO cDNA分子配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、(a)、(b)、及び(c)は、例えば、同一アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターなどの、例えば同一ウイルスベクターなどの、例えば、同一ベクターなどの同一核酸分子上に存在する。一実施形態では、核酸分子はAAVベクターである。記載された組成物及び方法のいずれかで使用されてもよい、例示的なAAVベクターとしては、AAV5ベクター、修飾AAV5ベクター、AAV2ベクター、修飾AAV2ベクター、AAV3ベクター、修飾AAV3ベクター、AAV6ベクター、修飾AAV6ベクター、AAV8ベクター、及びAAV9ベクターが挙げられる。

10

【0058】

その他の実施形態では、(a)は、例えば、第1のAAVベクターなどの、例えば、第1のウイルスベクターなどの、例えば、第1のベクターなどの第1の核酸分子上に存在し；(b)及び(c)は、例えば、第2のAAVベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、第2の核酸分子上に存在する。第1及び第2の核酸分子は、AAVベクターであってもよい。

20

【0059】

その他の実施形態では、(a)及び(b)は、例えば、第1のAAVベクターなどの、例えば、第1のウイルスベクターなどの、例えば、第1のベクターなどの第1の核酸分子上に存在し；(c)は、例えば、第2のAAVベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、第2の核酸分子上に存在する。第1及び第2の核酸分子は、AAVベクターであってもよい。

【0060】

その他の実施形態では、(a)及び(c)は、例えば、第1のAAVベクターなどの、例えば、第1のウイルスベクターなどの、例えば、第1のベクターなどの第1の核酸分子上に存在し；(b)は、例えば、第2のAAVベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、第2の核酸分子上に存在する。第1及び第2の核酸分子は、AAVベクターであってもよい。

30

【0061】

その他の実施形態では、(a)は、例えば、第1のAAVベクターなどの、例えば、第1のウイルスベクターなどの、例えば、第1のベクターなどの第1の核酸分子上に存在し；(b)は、例えば、第2のAAVベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、第2の核酸分子上に存在し；(c)は、例えば、第3のAAVベクターなどの、例えば、第3のベクターなどの、例えば、第3のベクターなどの、第3の核酸分子上に存在する。第1、第2、及び第3の核酸分子は、AAVベクターであってもよい。

40

【0062】

その他の実施形態では、核酸は、(d)(i)本明細書に記載の第2のgRNA分子をコード化する配列をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、核酸は、(a)、(b)、(c)、及び(d)(i)を含む。(a)、(b)、(c)、及び(d)(i)のそれぞれは、例えば、同一アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターなどの、例えば、同一ウイルスベクターなどの、例えば、同一ベクターの同一核酸分子上に存在してもよい。一実施形態では、核酸分子はAAVベクターである。

【0063】

50

その他の実施形態では、(a)及び(d)(i)は、異なるベクター上にある。例えば、(a)は、例えば、第1のAAVベクターなどの、例えば、第1のウイルスベクターなどの、例えば、第1のベクターなどの第1の核酸分子上に存在してもよく；(d)(i)は、例えば、第2のAAVベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、第2の核酸分子上に存在してもよい。一実施形態では、第1及び第2の核酸分子は、AAVベクターである。

【0064】

その他の実施形態では、(b)及び(d)(i)は、異なるベクター上にある。例えば、(b)は、例えば、第1のAAVベクターなどの、例えば、第1のウイルスベクターなどの、例えば、第1のベクターなどの第1の核酸分子上に存在してもよく；(d)(i)は、例えば、第2のAAVベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、第2の核酸分子上に存在してもよい。一実施形態では、第1及び第2の核酸分子は、AAVベクターである。

10

【0065】

その他の実施形態では、(c)及び(d)(i)は、異なるベクター上にある。例えば、(c)は、例えば、第1のAAVベクターなどの、例えば、第1のウイルスベクターなどの、例えば、第1のベクターなどの第1の核酸分子上に存在してもよく；(d)(i)は、例えば、第2のAAVベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、第2の核酸分子上に存在してもよい。一実施形態では、第1及び第2の核酸分子は、AAVベクターである。

20

【0066】

別の実施形態では、(a)及び(d)(i)は、例えば、AAVベクターなどの、例えば、同一ウイルスベクターなどの、例えば同一ベクターなどの、同一核酸分子上に存在する。一実施形態では、核酸分子はAAVベクターである。代替の実施形態では、(a)及び(d)(i)は、例えば、第1のAAVベクターなどの、例えば、第1のウイルスベクターなどの、例えば第1のベクターの第1の核酸分子上でコードされ；(a)及び(d)(i)の2つめ及び3つめは、例えば、第2のAAVベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、第2の核酸分子上でコードされる。第1及び第2の核酸分子は、AAVベクターであってもよい。

30

【0067】

別の実施形態では、(b)及び(d)(i)は、例えば、AAVベクターなどの、例えば、同一ウイルスベクターなどの、例えば同一ベクターなどの、同一核酸分子上に存在する。一実施形態では、核酸分子はAAVベクターである。代替の実施形態では、(b)及び(d)(i)は、例えば、第1のAAVベクターなどの、例えば、第1のウイルスベクターなどの、例えば第1のベクターの第1の核酸分子上でコードされ；(b)及び(d)(i)の2つめ及び3つめは、例えば、第2のAAVベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、第2の核酸分子上でコードされる。第1及び第2の核酸分子は、AAVベクターであってもよい。

【0068】

別の実施形態では、(c)及び(d)(i)は、例えば、AAVベクターなどの、例えば、同一ウイルスベクターなどの、例えば同一ベクターなどの、同一核酸分子上に存在する。一実施形態では、核酸分子はAAVベクターである。代替の実施形態では、(c)及び(d)(i)は、例えば、第1のAAVベクターなどの、例えば、第1のウイルスベクターなどの、例えば第1のベクターの第1の核酸分子上でコードされ；(c)及び(d)(i)の2つめ及び3つめは、例えば、第2のAAVベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、例えば、第2のベクターなどの、第2の核酸分子上でコードされる。第1及び第2の核酸分子は、AAVベクターであってもよい。

40

【0069】

別の実施形態では、(a)、(b)、及び(d)(i)のそれぞれは、例えば、AAVベクターなどの、例えば、同一ウイルスベクターなどの、例えば同一ベクターなどの、同一

50

核酸分子上に存在する。一実施形態では、核酸分子は A A V ベクターである。代替の実施形態では、(a)、(b)、及び (d) (i) の 1 つは、例えば、第 1 の A A V ベクターなどの、例えば、第 1 のウイルスベクターなどの、例えば第 1 のベクターの第 1 の核酸分子上でコードされ；(a)、(b)、及び (d) (i) の 2 つめ及び 3 つめは、例えば、第 2 の A A V ベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、第 2 の核酸分子上でコードされる。第 1 及び第 2 の核酸分子は、A A V ベクターであってもよい。

【 0 0 7 0 】

別の実施形態では、(b)、(c)、及び (d) (i) のそれぞれは、例えば、A A V ベクターなどの、例えば、同一ウイルスベクターなどの、例えば同一ベクターなどの、同一核酸分子上に存在する。一実施形態では、核酸分子は A A V ベクターである。代替の実施形態では (b)、(c)、及び (d) (i) の 1 つは、例えば、第 1 の A A V ベクターなどの、例えば、第 1 のウイルスベクターなどの、例えば第 1 のベクターの第 1 の核酸分子上でコードされ；(b)、(c)、及び (d) (i) の 2 つめ及び 3 つめは、例えば、第 2 の A A V ベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、第 2 の核酸分子上でコードされる。第 1 及び第 2 の核酸分子は、A A V ベクターであってもよい。

10

【 0 0 7 1 】

別の実施形態では、(a)、(c)、及び (d) (i) のそれぞれは、例えば、A A V ベクターなどの、例えば、同一ウイルスベクターなどの、例えば同一ベクターなどの、同一核酸分子上に存在する。一実施形態では、核酸分子は A A V ベクターである。代替の実施形態では (a)、(c)、及び (d) (i) の 1 つは、例えば、第 1 の A A V ベクターなどの、例えば、第 1 のウイルスベクターなどの、例えば第 1 のベクターの第 1 の核酸分子上でコードされ；(a)、(c)、及び (d) (i) の 2 つめ及び 3 つめは、例えば、第 2 の A A V ベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、第 2 の核酸分子上でコードされる。第 1 及び第 2 の核酸分子は、A A V ベクターであってもよい。

20

【 0 0 7 2 】

その他の実施形態では、(a) は、例えば、第 1 の A A V ベクターなどの、第 1 のウイルスベクターなどの、例えば、第 1 のベクターなどの第 1 の核酸分子上に存在し；(b)、(c)、及び (d) (i) は、例えば、第 2 の A A V ベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、第 2 の核酸分子上に存在する。第 1 及び第 2 の核酸分子は、A A V ベクターであってもよい。

30

【 0 0 7 3 】

その他の実施形態では、(b) は、例えば、第 1 の A A V ベクターなどの、例えば、第 1 のウイルスベクターなどの、例えば、第 1 のベクターなどの第 1 の核酸分子上に存在し；(a)、(c)、及び (d) (i) は、例えば、第 2 の A A V ベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、第 2 の核酸分子上に存在する。第 1 及び第 2 の核酸分子は、A A V ベクターであってもよい。

【 0 0 7 4 】

その他の実施形態では、(c) は、例えば、第 1 の A A V ベクターなどの、例えば、第 1 のウイルスベクターなどの、例えば、第 1 のベクターなどの第 1 の核酸分子上に存在し；(a)、(b)、及び (d) (i) は、例えば、第 2 の A A V ベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、第 2 の核酸分子上に存在する。第 1 及び第 2 の核酸分子は、A A V ベクターであってもよい。

40

【 0 0 7 5 】

その他の実施形態では、(d) (i) は、例えば、第 1 の A A V ベクターなどの、例えば、第 1 のウイルスベクターなどの、例えば、第 1 のベクターなどの第 1 の核酸分子上に存在し；(a)、(b)、及び (c) は、例えば、第 2 の A A V ベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、例えば、第 2 のベクターなどの、第 2 の核酸分子上に存在する。

50

第 1 及び第 2 の核酸分子は、A A V ベクターであってもよい。

【 0 0 7 6 】

別の実施形態では、(a)、(b)、(c)、及び (d) (i) のそれぞれは、例えば異なるベクター、例えば異なるウイルスベクター、例えば異なる A A V ベクターなどの異なる核酸分子上に存在する。例えば、(a) は、第 1 の核酸分子上、(b) は第 2 の核酸分子上、(c) は第 3 の核酸分子上、(d) (i) は第 4 の核酸分子上にあってもよい。第 1、第 2、第 3、及び第 4 の核酸分子は、A A V ベクターであってもよい。

【 0 0 7 7 】

別の実施形態では、第 3 及び / 又は第 4 の g R N A 分子が存在する場合、(a)、(b)、(c)、(d) (i)、(d) (i i)、及び (d) (i i i) のそれぞれは、例えば同一ベクター、例えば同一ウイルスベクター、例えば A A V ベクターなどの同一核酸分子上に存在してもよい。一実施形態では、核酸分子は A A V ベクターである。代替の実施形態では、(a)、(b)、(c)、(d) (i)、(d) (i i)、及び (d) (i i i) のそれぞれは、例えば異なるベクター、例えば異なるウイルスベクター、例えば異なる A A V ベクターなどの異なる核酸分子上に存在してもよい。さらなる実施形態では、(a)、(b)、(c)、(d) (i)、(d) (i i)、及び (d) (i i i) のそれぞれは、例えば、A A V ベクターなどの 2 つ以上の核酸分子であるが、5 つ未満の核酸分子上に存在してもよい。

【 0 0 7 8 】

本明細書に記載される核酸は、例えば、本明細書に記載されるプロモーターなどの (a) の g R N A 分子をコード化する配列と作動可能に連結するプロモーターを含んでもよい。核酸は、例えば、本明細書に記載されるプロモーターなどの (d) の第 2、第 3 及び / 又は第 4 の g R N A 分子をコード化する配列と作動可能に連結する第 2 のプロモーターをさらに含んでもよい。プロモーター及び第 2 のプロモーターは、互いに異なる。いくつかの実施形態では、プロモーター及び第 2 のプロモーターは同一である。

【 0 0 7 9 】

本明細書に記載の核酸は、例えば、本明細書に記載されるプロモーターなどの、(b) の R N A 誘導ヌクレアーゼ (例えば、C a s 9 又は C p f 1 分子) をコード化する配列と作動可能に連結するプロモーターをさらに含んでもよい。特定の実施形態では、(b) の R N A 誘導ヌクレアーゼをコード化する配列と作動可能に連結するプロモーターは、桿体特異的プロモーターを含む。特定の実施形態では、桿体特異的プロモーターは、ヒト R H O プロモーターであってもよい。特定の実施形態では、ヒト R H O プロモーターは、最小 R H O プロモーター (例えば、配列番号 4 4) であってもよい。

【 0 0 8 0 】

本明細書に記載の核酸は、例えば、本明細書に記載されるプロモーターなどの、(c) の R H O c D N A 分子と作動可能に連結するプロモーターをさらに含んでもよい。特定の実施形態では、(c) の R H O c D N A 分子と作動可能に連結するプロモーターは、桿体特異的プロモーターを含む。特定の実施形態では、桿体特異的プロモーターは、ヒト R H O プロモーターであってもよい。特定の実施形態では、ヒト R H O プロモーターは、最小 R H O プロモーター (例えば、配列番号 4 4) であってもよい。特定の実施形態では、核酸は、R H O c D N A 分子の下流の 3 ' U T R ヌクレオチド配列をさらに含んでもよい。特定の実施形態では、R H O c D N A 分子の下流の 3 ' U T R ヌクレオチド配列は、R H O 遺伝子 3 ' U T R ヌクレオチド配列を含んでもよい。特定の実施形態では、R H O c D N A 分子の下流の 3 ' U T R ヌクレオチド配列は、高度に発現されたタンパク質をコード化する m R N A の 3 ' U T R ヌクレオチド配列を含んでもよい。例えば、特定の実施形態では、R H O c D N A 分子の下流の 3 ' U T R ヌクレオチド配列は、 - グロビン 3 ' U T R ヌクレオチド配列を含んでもよい。特定の実施形態では、R H O c D N A 分子の下流の 3 ' U T R ヌクレオチド配列は、 - グロビン 3 ' U T R ヌクレオチド配列を含んでもよい。特定の実施形態では、3 ' U T R ヌクレオチド配列は、前記 3 ' U T R ヌクレオチド配列の 5 ' 末端、前記 3 ' U T R ヌクレオチド配列の 3 ' 末端、又は双方の 1 つ又は複数の

トランケーションを含む。

【0081】

別の態様では、本明細書で開示されるのは、(a) 本明細書に記載の RHO 遺伝子中の標的ドメインと相補的な標的化ドメインを含む gRNA 分子を含む組成物である。(a) の組成物は、(b) RNA ガイドのヌクレアーゼ (例えば、本明細書に記載の Cas9 又は Cpf1 分子) をさらに含んでもよい。Cpf1 は、Cas12a とともに称されることがある。(a) 及び (b) の組成物は、(c) RHO cDNA 分子をさらに含んでもよい。(a)、(b)、及び (c) の組成物は、例えば、本明細書に記載される第 2、第 3 及び / 又は第 4 の gRNA 分子などの (d) 第 2、第 3 及び / 又は第 4 の gRNA 分子をさらに含んでもよい。

10

【0082】

別の態様では、本明細書で開示されるのは、前記細胞と、(a) 例えば、本明細書に記載の gRNA などの RHO 遺伝子を標的化する gRNA; (b) RNA 誘導ヌクレアーゼ (例えば、本明細書に記載の Cas9 又は Cpf1 分子); 及び (c) aRHO cDNA 分子; 及び任意選択的に、(d) 例えば、gRNA などの RHO 遺伝子を標的化する、第 2 の、第 3 の及び / 又は第 4 の gRNA とを接触させるステップを含む、例えば細胞標的核酸の構造を改変し、例えば配列を改変するなどの細胞を改変する方法である。

【0083】

いくつかの実施形態では、方法は、前記細胞を (a) 及び (b) に接触させるステップを含む。

20

【0084】

いくつかの実施形態では、方法は、前記細胞を (a)、(b)、及び (c) に接触させるステップを含む。

【0085】

いくつかの実施形態では、方法は、前記細胞 (a)、(b)、(c)、及び (d) に接触させるステップを含む。

【0086】

(a) 及び任意選択的に (d) の gRNA は、表 1 ~ 3 及び 18 に記載されているものから選択される標的化ドメイン配列を含んでもよく、又は表 1 ~ 3 及び 18 のいずれかに記載される標的化ドメイン配列と 1、2、3、4、又は 5 ヌクレオチド以下が異なる標的化ドメイン配列を含んでもよい。

30

【0087】

いくつかの実施形態では、この方法は、aDRP に罹患している、又は発症する可能性のある対象からの細胞を接触させるステップを含む。細胞は、RHO 標的位置に変異を有する対象に由来してもよい。

【0088】

いくつかの実施形態では、開示された方法で接触される細胞は、例えば、光受容体細胞などの、例えば、網膜細胞などの、対象の眼からの細胞である。接触させるステップは、生体外で実施されてもよく、接触細胞は、接触させるステップ後に対象の身体に戻されてもよい。その他の実施形態では、接触させるステップは生体内で実施されてもよい。

40

【0089】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞を改変する方法は、接触させるステップの前に、前記細胞における RHO 遺伝子の変異の存在についての知識を得るステップを含む。細胞内の RHO 遺伝子の変異の知識を得るステップは、RHO 遺伝子、又は RHO 遺伝子の一部の配列を決定するステップであってもよい。

【0090】

いくつかの実施形態では、方法の接触させるステップは、細胞を例えばベクター、例えば AAV ベクターなどの (a)、(b)、及び (c) の少なくとも 1 つを発現する核酸に接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、方法の接触させるステップは、細胞を例えばベクター、例えば AAV ベクターなどの (a)、(b)、及び (c) のそれぞれ

50

を発現する核酸に接触させるステップを含む。別の実施形態では、方法の接触させるステップは、細胞に、(b)のRNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9分子又はCpf1分子)、(a)のgRNAをコード化する核酸、(c)のRHO cDNA、及び任意選択的に(d)(i)の第2のgRNA、さらに任意選択的に(d)(iv)の第3のgRNA、及び/又は(d)(iii)の第4のgRNAを送達するステップを含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、方法の接触させるステップは、細胞を例えばベクター、例えばAAVベクターなどの(a)、(b)、(c)、及び(d)の少なくとも1つを発現する核酸に接触させるステップを含む。いくつかの実施形態では、方法の接触させるステップは、細胞を例えばベクター、例えばAAVベクターなどの(a)、(b)、及び(c)のそれぞれを発現する核酸に接触させるステップを含む。別の実施形態では、方法の接触させるステップは、細胞に、(b)のRNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9分子又はCpf1分子)、(a)のgRNAをコード化する核酸、(c)のRHO cDNA分子、及び任意選択的に(d)(i)の第2のgRNA、さらに任意選択的に(d)(iv)の第3のgRNA、及び/又は(d)(iii)の第4のgRNAを送達するステップを含む。

10

【0092】

一実施形態では、接触は、細胞と、例えば、AAV5ベクター、修飾AAV5ベクター、AAV2ベクター、修飾AAV2ベクター、AAV3ベクター、修飾AAV3ベクター、AAV6ベクター、修飾AAV6ベクター、AAV8ベクター又はAAV9ベクターなどの、例えば、AAVベクターなどの、例えば、ベクターなどの核酸とを接触させるステップを含む。

20

【0093】

一実施形態では、接触させるステップは、タンパク質又はmRNAとしての(b)のRNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9又はCpf1分子)、及び(a)をコード化する核酸、及び(c)、及び任意選択的に(d)を細胞に送達するステップを含む。

【0094】

一実施形態では、接触させるステップは、タンパク質又はmRNAとしての(b)のRNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9分子又はCpf1分子)、RNAとしての(a)の前記gRNA、及び任意選択的にRNAとしての(d)の前記第2のgRNA、及びDNAとしての(c)のRHO cDNA分子を細胞に送達するステップを含む。

30

【0095】

一実施形態では、接触させるステップは、RNAとしての(a)のgRNA、任意選択的にRNAとしての(d)の前記第2のgRNA、及び(b)のRNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9又はCpf1分子)をコード化する核酸、及びDNAとしての(c)のRHO cDNA分子を細胞に送達するステップを含む。

【0096】

別の態様では、本明細書で開示されるのは、対象(又は対象に由来する細胞)を(a)例えば、本明細書に記載のgRNAなどのRHO遺伝子を標的化するgRNA；(b)例えば、本明細書で開示されるCas9又はCpf1分子などのRNA誘導ヌクレアーゼ；及び

40

(c)RHO cDNA分子；及び

任意選択的に、(d)(i)例えば、本明細書で開示される第2のgRNAなどの、RHO遺伝子を標的化する第2のgRNA；及び

さらに任意選択的に、(d)(ii)第3のgRNA、及びなおさらに任意選択的に、(d)(iii)例えば、本明細書に開示される第3及び第4のgRNAなどの、RHO遺伝子を標的化する第4のgRNA

に接触させるステップを含む、例えば対象の標的核酸の構造、例えば配列を改変するなどのadRPに罹患している又は発症する可能性が高い対象を治療する方法である。

【0097】

50

いくつかの実施形態では、接触させるステップは、(a)及び(b)を接触させるステップを含む。

【0098】

いくつかの実施形態では、接触させるステップは、(a)、(b)、及び(c)を接触させるステップを含む。

【0099】

いくつかの実施形態では、接触させるステップは、(a)、(b)、(d)(i)を接触させるステップを含む。

【0100】

いくつかの実施形態では、接触させるステップは、(a)、(b)、(c)、(d)(i)、及び(d)(ii)を接触させるステップを含む。 10

【0101】

いくつかの実施形態では、接触させるステップは、(a)、(b)、(c)、(d)(i)、(d)(ii)、及び(d)(iii)を接触させるステップを含む。

【0102】

(a)又は(d)(例えば、(d)(i)、(d)(ii)、又は(d)(iii)のgRNAは、表1～3及び18に記載されているもののいずれかから選択される標的化ドメイン配列を含んでもよく、又は表1～3及び18のいずれかに記載される標的化ドメイン配列と1、2、3、4、又は5ヌクレオチド以下が異なる標的化ドメイン配列を含んでもよい。 20

【0103】

一実施形態では、方法は、前記対象において、RHO遺伝子における変異の存在についての知識を得るステップを含む。

【0104】

一実施形態では、方法は、RHO遺伝子又はRHO遺伝子の一部を配列決定することによって、前記対象において、RHO遺伝子における変異の存在についての知識を得るステップを含む。

【0105】

一実施形態では、方法は、RHO遺伝子のRHO標的位置を変更して、RHO遺伝子をノックアウトし、外因性RHO cDNAを提供するステップを含む。 30

【0106】

方法が、RHO標的位置を変更し、外因性RHO cDNAを提供するステップを含む場合、(b)のRNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9又はCpf1分子)、少なくとも1つのガイドRNA(例えば、(a)のガイドRNA、及び(c)のRHO cDNA分子が、接触させるステップに含まれる。

【0107】

一実施形態では、対象の細胞は、生体外で(a)、(b)、(c)、及び任意選択的に(d)に接触される。一実施形態では、前記細胞は対象の身体に戻される。

【0108】

一実施形態では、対象の細胞は、生体内で(a)、(b)、(c)、及び任意選択的に(d)に接触される。 40

【0109】

一実施形態では、対象の細胞は、(a)、(b)、(c)、及び任意選択的に(d)の静脈内送達によって生体内で接触される。

【0110】

一実施形態では、接触させるステップは、対象と、例えば、(a)、(b)、(c)、及び任意選択的に(d)の少なくとも1つをコード化する核酸などの、例えば、本明細書に記載のAAVベクターなどの、例えば、ベクターなどの、核酸とを接触させるステップを含む。

【0111】

一実施形態では、接触させるステップは、タンパク質又はmRNAとしての(b)の前記RNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9又はCpf1分子)、(a)をコード化する核酸、(c)のRHO cDNA分子、及び任意選択的に(d)を前記対象に送達するステップを含む。

【0112】

一実施形態では、接触させるステップは、タンパク質又はmRNAとしての(b)のRNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9又はCpf1分子)、RNAとしての(a)のgRNA、(c)のRHO cDNA分子、及び任意選択的にRNAとしての(d)の第2のgRNAを対象に送達するステップを含む。

【0113】

一実施形態では、接触させるステップは、RNAとしての(a)のgRNA、任意選択的にRNAとしての(d)の前記第2のgRNA、(b)のRNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9又はCpf1分子)をコード化する核酸、及び(c)のRHO cDNA分子を対象に送達するステップを含む。

【0114】

一実施形態では、対象の細胞は、生体外で(a)、(b)、(c)、及び任意選択的に(d)に接触される。一実施形態では、前記細胞は対象の身体に戻される。

【0115】

一実施形態では、対象の細胞は、生体内で(a)、(b)、(c)、及び任意選択的に(d)に接触される。一実施形態では、対象の細胞は、(a)、(b)、(c)、及び任意選択的に(d)の静脈内送達によって生体内で接触される。

【0116】

一実施形態では、接触させるステップは、対象と、例えば、(a)、(b)、(c)、及び任意選択的に(d)の少なくとも1つをコード化する核酸などの、例えば、本明細書に記載のAAVベクターなどの、例えば、ベクターなどの、核酸とを接触させるステップを含む。

【0117】

一実施形態では、接触させるステップは、タンパク質又はmRNAとしての(b)の前記RNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9又はCpf1分子)、(a)をコード化する核酸、(c)、及び任意選択的に(d)を前記対象に送達するステップを含む。

【0118】

一実施形態では、接触させるステップは、タンパク質又はmRNAとしての(b)のRNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9分子又はCpf1分子)、RNAとしての(a)のgRNA、及び任意選択的にRNAとしての(d)の第2のgRNA、及びさらに任意選択的にDNAとしての(c)のRHO cDNA分子を対象に送達するステップを含む。

【0119】

一実施形態では、接触させるステップは、RNAとしての(a)のgRNA、任意選択的にRNAとしての(d)の前記第2のgRNA、及び(b)のRNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9又はCpf1分子)をコード化する核酸、及びDNAとしての(c)のRHO cDNA分子を対象に送達するステップを含む。

【0120】

別の態様では、本明細書で開示されるのは、本明細書に記載のgRNA、核酸、又は組成物；及び例えば、adRPに罹患している又は発症する可能性が高い対象からの細胞、又はRHO遺伝子に変異を有する対象からの細胞などの細胞を含む、反応混合物である。

【0121】

別の態様では、本明細書で開示されるのは、(a)本明細書に記載されるgRNA分子、又はgRNAをコード化する核酸と、

(b)例えば、本明細書に記載のCas9又はCpf1分子などのRNA誘導ヌクレアーゼ分子、又はRNA誘導ヌクレアーゼをコード化する核酸又はmRNA；

(c)RHO cDNA分子；

10

20

30

40

50

(d) (i) 例えば本明細書に記載される第 2 の g R N A 分子などの第 2 の g R N A 分子、又は (d) (i) をコード化する核酸；

(d) (i i) 例えば本明細書に記載される第 2 の g R N A 分子などの第 3 の g R N A 分子、又は (d) (i i) をコード化する核酸；

(d) (i i i) 例えば本明細書に記載される第 2 の g R N A 分子などの第 4 の g R N A 分子、又は (d) (i i i) をコード化する核酸

の 1 つ又は複数とを含むキットである。

【 0 1 2 2 】

一実施形態では、キットは、例えば、(a)、(b)、(c)、(d) (i)、(d) (i i)、及び (d) (i i i) の 1 つ又は複数をコード化する A A V ベクターなどの核酸を含む。 10

【 0 1 2 3 】

特定の実施形態では、ベクター又は核酸は、配列番号 8 ~ 1 1 の 1 つ又は複수에記載される配列を含んでもよい。

【 0 1 2 4 】

特に断りのない限り、本明細書で使用される全ての技術的及び科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様の又は同等の方法及び材料が、本開示で又は本開示の試験で使用されるが、適切な方法及び材料は下述のとおりである。本明細書で言及される、全ての刊行物、特許出願、特許、及びその他の参考文献は、その内容全体を参照により援用する。これに加えて、材料、方法、及び実施例は、例証のみを意図し、制限は意図されない。 20

【 0 1 2 5 】

数字及びアルファベットの見出し及び小見出しをはじめとする見出しは、組織化と提示を目的とし、制限は意図されない。

【 0 1 2 6 】

本開示の他の特徴及び利点は、詳細な説明、図面、及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【 0 1 2 7 】

添付の図面は、本開示の特定の態様及び実施形態を例示する。図面の描写は、本開示の特定の態様及び実施形態の包括的ではなく、むしろ例示的で概略的な例を提供することを意図している。図面は、任意の特定の理論又はモデルを制限することも又はそれに拘束されることも意図されず、必ずしも縮尺どおりではない。上記を限定することなく、核酸及びポリペプチドは線状配列として、又は概略的な二次元もしくは三次元構造として描写されてもよく；これらの描写は、それらの構造に関する任意の特定のモデル又は理論を制限することも又はそれに拘束されることもなく、むしろ例示的であることを意図している。 30

【図面の簡単な説明】

【 0 1 2 8 】

【図 1】本開示の特定の実施形態で実行される、ゲノム編集ストラテジーを示す。ステップ 1 は、例えば、エクソン 1 の R H O 標的位置での R H O 遺伝子のノックアウト (K O) 又は改変を含む。R H O 遺伝子をノックアウトすると、内在性 R H O 遺伝子 (例えば、変異型 R H O 遺伝子など) の機能喪失がもたらされる。ステップ 2 は、最小 R H O プロモーター及び R H O c D N A を含む外因性 R H O c D N A によって、R H O 遺伝子を置き換えるステップを含む。 40

【図 2】本開示の特定の実施形態による、R H O 標的位置の変更をはじめとするがこれに限定されない、様々な用途に使用されてもよい例示的二重 A A V 送達システムの概略図である。ベクター 1 は、I T R、G R K 1 プロモーター、及び N L S 配列で挟まれた C a s 9 分子をコード化する A A V 5 ゲノムを示す。ベクター 2 は、I T R、最小 R H O プロモーター、R H O c D N A 分子、U 6 プロモーター、及び g R N A をコード化する A A V 5 ゲノムを示す。特定の実施形態では、A A V ベクターは、網膜下注射を介して送達されてもよい。 50

【図 3】本開示の特定の実施形態による、RHO 標的位置の変更をはじめとするがこれに限定されない、様々な用途に使用されてもよい例示的二重 AAV 送達システムの概略図である。ベクター 1 は、最小 RHO プロモーター及び Cas9 分子をコード化する、AAV5 ゲノムを示す。ベクター 2 は、最小 RHO プロモーター、RHO cDNA 分子、U6 プロモーター、及び gRNA をコード化する AAV5 ゲノムを示す。特定の実施形態では、AAV ベクターは、網膜下注射を介して送達されてもよい。

【図 4】RHO-3、RHO-7、又は RHO-10 の各 gRNA (表 17) 及び Cas9 を含む、リボ核タンパク質 (RNP) を使用した、用量依存的遺伝子編集によって形成された HEK293 細胞中の RHO 遺伝子のインデルを示す。増加する濃度の RNP が、HEK293 細胞に送達された。RHO 遺伝子のインデルは、次世代配列決定法 (NGS) を使用して評価された。RHO-3 gRNA、RHO-10 gRNA、又は RHO-7 gRNA を含む RNP からのデータは、それぞれ丸、四角、及び三角形で表される。対照プラスミド (ヒトゲノム内の配列を標的化しないスクランブル化 gRNA によって Cas9 を発現する) からのデータは X で表される。

【図 5】RHO-3、RHO-7、又は RHO-10 の各 gRNA によって生成される、予測された gRNA RHO 対立遺伝子の特徴付ける詳細を示す (表 17)。図 5 の下部にあるヒト RHO cDNA 及び対応するエクソンの概略図に示されるように、RHO-3、RHO-10、RHO-7 gRNA は、それぞれエクソン 1、エクソン 2 / イントロン 2 の境界、エクソン 1 / イントロン 1 の境界で RHO cDNA を切断すると予測される。RHO-3、RHO-10、及び RHO-7 gRNA の標的部位の位置は、それぞれ RHO タンパク質のアミノ酸 (AA) 96、174、及び 120 をコード化する塩基にある。予測された -1、-2、及び -3 フレームシフトの結果として得られた各コンストラクトのタンパク質の長さが示される。RHO-3 では、96 位での 1 塩基の欠失は 95 アミノ酸長の短縮型タンパク質をもたらし、96 位での 2 塩基の欠失は 120 アミノ酸長の短縮型タンパク質をもたらし、96 位での 3 塩基の欠失は 347 アミノ酸長の短縮型タンパク質をもたらす。RHO-10 では、174 位での 1 塩基の欠失は 215 アミノ酸長の短縮型タンパク質をもたらし、174 位での 2 塩基の欠失は 328 アミノ酸長の短縮型タンパク質をもたらし、174 位での 3 塩基の欠失は 347 アミノ酸長の短縮型タンパク質をもたらす。RHO-7 では、120 位での 1 塩基の欠失は 142 アミノ酸長の短縮型タンパク質をもたらし、120 位での 2 塩基の欠失は 142 アミノ酸長の短縮型タンパク質をもたらし、120 位での 3 塩基の欠失は 347 アミノ酸長の短縮型タンパク質をもたらす。

【図 6】予測された短縮型タンパク質の概略図を示す。図 6 は、RHO-3、RHO-7、又は RHO-10 の各 gRNA によって生成される、予測された RHO 対立遺伝子の概略図を示す (表 17)。RHO 対立遺伝子は、RHO-3、RHO-7、又は RHO-10 の各切断部位での 1、2、又は 3 塩基対の欠失に基づいて予測された。RHO エクソンは濃い灰色で表され、停止コドンは黒で表され、ミスセンスタンパク質は縞模様で表され、欠失は薄い灰色で表される。

【図 7】野生型又は模擬編集された RHO 対立遺伝子を発現する HEK293 細胞の生存率を示す。1 塩基対 (bp)、2 bp 又は 3 bp の欠失を有する、RHO-3、RHO-7、及び RHO-10 gRNA (表 17) によって生成されると予測される RHO 対立遺伝子の概略図は、図 6 に示される。RHO-3、RHO-7、RHO-10 gRNA から生成されると予測される RHO 変異 (すなわち、模擬編集された RHO 対立遺伝子) は、WT-RHO cDNA、又は P23H RHO 変異型を発現する RHO cDNA のいずれかを使用して、生成された。野生型 RHO、模擬編集された RHO 対立遺伝子、又は P23H RHO 変異型を発現する RHO 対立遺伝子が、哺乳類発現プラスミドにクローン化され、HEK293 細胞にリポフェクトされて、Perkin Elmer による ATP Lites ルミネセンスアッセイを使用して、48 時間後の細胞生存率が評価された。図 7A は、修飾 WT RHO 対立遺伝子を有する細胞のルミネセンスによって示される生存率を示す。図 7B は、修飾 P23H RHO 対立遺伝子を有する細胞のルミネセンスによって示される生存率を示す。上の点線は WT RHO 対立遺伝子からのルミネセンスのレベルを表し、

10

20

30

40

50

下の点線は P 2 3 H R H O 対立遺伝子からのルミネセンスのレベルを表す。

【図 8】R H O - 9 g R N A を使用した非ヒト霊長類 (N H P) 外植片の桿体光受容体の編集を示す (表 1) 。桿体特異的 m R N A (神経網膜ロイシンジッパー (N R L)) からの R N A は外植片から抽出され、測定されて外植片中に存在する桿体の百分率が判定された。アクチン (A C T B) からの R N A もまた測定され、細胞の総数が判定された。x 軸は、R T - P C R によって測定された A C T B と N R L の R N A レベルの差を示し、これは、外植片を溶解した時の外植片の桿体の百分率の測定値である。R H O 遺伝子のインデルは、次世代配列決定法 (N G S) を使用して評価された。各円は、異なる外植片からのデータを表す。

【図 9】R H O 置換ベクターの最適化に使用される、二重ルシフェラーゼ系のプラスミドの概略図を示す。

【図 10】R H O 発現に対する異なる長さの R H O プロモーターの影響を試験するための、二重ルシフェラーゼ系を使用したホタル / ウミシイタケルシフェラーゼルミネセンスの比率を示す。試験された R H O プロモーターの長さは、3 . 0 K b ~ 2 5 0 b p の範囲であった。

【図 11 A】(図 11) R H O 置換ベクターへ様々な 3 ' U T R を付加することの、R H O m R N A 及び R H O タンパク質発現に対する影響を示す。H B A 1 3 ' U T R (配列番号 3 8) 、短鎖 H B A 1 3 ' U T R (配列番号 3 9) 、T H 3 ' U T R (配列番号 4 0) 、C O L 1 A 1 3 ' U T R (配列番号 4 1) 、A L O X 1 5 3 ' U T R (配列番号 4 2) 、及び m i n U T R (配列番号 5 6) が試験された。図 11 A は、R T - q P C R を使用して R H O m R N A 発現を測定した結果を示す。

【図 11 B】図 11 B は、R H O E L I S A アッセイを使用して、R H O タンパク質発現を測定した結果を示す。

【図 12】R H O 置換ベクター中で R H O c D N A へ異なる R H O イントロンを挿入することの、R H O タンパク質発現に対する影響を示す。イントロン (すなわち、イントロン 1 ~ 4) が挿入された様々な R H O c D N A 配列は、それぞれ配列番号 4 ~ 7 に示される。

【図 13】R H O 置換ベクター中で野生型又は異なるコドン最適化 R H O コンストラクトを使用することの、R H O タンパク質の発現に対する影響を示す。様々なコドン最適化 R H O c D N A 配列 (すなわち、コドン 1 ~ 6) は、それぞれ、配列番号 1 3 ~ 1 8 に示される。R H O c D N A は、C M V 又は E F S プロモーターの制御下にあった。

【図 14 A】(図 14) 自己制限型 C a s 9 ベクター系 (S D) を使用した、R H O 遺伝子の生体内編集及び C a s 9 のノックダウンを示す。図 14 A は、自己制限型 C a s 9 ベクター系 (すなわち、「S D C a s 9 + R h o」) を使用した、C a s 9 レベルの成功裏のノックダウンを示す。

【図 14 B】図 14 B は、自己制限型 C a s 9 ベクター系 (すなわち、「S D C a s 9」) を使用した、成功裏の編集を示す。

【図 15】ヒト外植片中の R H O 発現を示す。外植片は、「s h R N A」: R H O 遺伝子を標的化する s h R N A と R H O c D N A を提供する置換ベクターとによる、網膜外植片の形質導入 (Cideciyan 2018 で公開された) ; 「ベクター A」: 2 ベクター系 (最小 R H O プロモーター (2 5 0 b p) によって駆動される s a C a s 9 を含むベクター 1 、及びコドン最適化された R H O c D N A (コドン - 6) を含むベクター 2 、及び最小 2 5 0 b p R H O プロモーターの制御下にある H B A 1 3 ' U T R 、及び U 6 プロモーターの制御下にある R H O - 9 g R N A (表 1) を含む) ; 「ベクター B」: ベクター 2 が w t R H O c D N A を含むこと以外は、「ベクター A」と同一である 2 ベクター系 ; 及び「U T C」: 非形質導入対照で形質導入された。

【図 16】本開示の特定の実施形態による、例示的な A A V ベクター (配列番号 1 1) の概略図である。概略図は、A A V 5 ゲノムが、I T R (配列番号 9 2) 、第 1 の U 6 プロモーター (配列番号 7 8) 、第 1 の R H O - 7 g R N A (R H O - 7 g R N A 標的化ドメイン (配列番号 6 0 6) (D N A) と、配列番号 1 2 とを含む) 、第 2 の U 6 プロモーター

10

20

30

40

50

(配列番号78)、第2のRHO-7 gRNA (RHO-7 gRNA 標的化ドメイン (配列番号606) (DNA) と、配列番号12とを含む)、最小RHOプロモーター (250 bp) (配列番号44)、SV40イントロン (配列番号94)、コドン最適化されたRHO cDNA (配列番号18)、HBA1 3' UTR (配列番号38)、ミニポリA (配列番号56)、及び右ITR (配列番号93) を含み、それらをコード化することを示す。特定の実施形態では、AAVベクターは、網膜下注射を介して送達されてもよい。

【図17】本開示の特定の実施形態による、例示的なAAVベクター (配列番号10) の概略図である。概略図は、AAV5ゲノムが、ITR (配列番号92)、最小RHOプロモーター (250 bp) (配列番号44)、SV40イントロン (配列番号94)、NLS配列、S. アウレウス (*S. aureus*) Cas9配列、SV40 NLS、HBA1 3' UTR (配列番号38)、及び右ITR (配列番号93) を含み、それらをコード化することを示す。特定の実施形態では、AAVベクターは、網膜下注射を介して送達されてもよい。

10

【図18】本開示の特定の実施形態による、例示的なAAVベクター (配列番号9) の概略図である。概略図は、AAV5ゲノムが、ITR (配列番号92)、最小RHOプロモーター、SV40 SA/SD、NLS、S. アウレウス (*S. aureus*) Cas9配列、SV40 NLS、ミニポリA (配列番号56)、及び右ITR (配列番号93) を含み、それらをコード化することを示す。特定の実施形態では、AAVベクターは、網膜下注射を介して送達されてもよい。

【発明を実施するための形態】

20

【0129】

定義

「ドメイン」は、本明細書の用法では、タンパク質又は核酸部分を記述するために使用される。特に断りのない限り、ドメインは、任意の特定の機能特性を有する必要はない。

【0130】

2つの配列間の「相同性」又は「配列同一性」(用語は本明細書で同義的に使用される) の計算は、次のようにして実施される。配列は、最適な比較目的で整列され(例えば、最適アライメントのために、第1及び第2のアミノ酸又は核酸配列の片方又は双方にギャップが装入され得て、非相同配列は比較目的で無視され得る)。最適アライメントは、Blossum 62重み行列による、ギャップペナルティ12、ギャップ延長ペナルティ4、及びフレームシフトギャップペナルティ5で、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを使用して、最高スコアとして評価される。次に対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド配列部位にある、アミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同一のアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占有される場合、分子は、その位置において同一である。2つの配列間の同一性百分率は、配列によって共有される同一の位置数の関数である。

30

【0131】

「修飾物質」は、本明細書の用法では、例えば、対象分子又は遺伝子配列の活性(例えば、酵素活性、転写活性、又は翻訳活性)、量、分布、又は構造を改変し得る薬剤などの実体を指す。一実施形態では、調節は、例えば、共有結合又は非共有結合の破壊などの切断、又は例えば、部分の対象分子への付着などの共有結合又は非共有結合の形成を含む。一実施形態では、修飾物質は、対象分子の三次元、二次、三次、又は四次構造を変化させる。修飾物質は、対象活性を増大させ、低下させ、開始し、又は排除し得る。

40

【0132】

「ポリペプチド」は、本明細書の用法では、100個未満のアミノ酸残基を有するアミノ酸のポリマーを指す。一実施形態では、それは50、20、又は10個未満のアミノ酸残基を有する。

【0133】

「置換」又は「交換された」は、分子修飾に関連した本明細書の用法では、プロセスの制限は必要でなく、置換実体が存在することのみを示唆する。

50

【0134】

「RHO標的位置」は、本明細書での用法では、本明細書に記載の方法を使用した改変の標的とされる、RHO遺伝子内又はその近傍の、例えば、1つ又は複数のヌクレオチドなどの標的位置を指す。特定の実施形態では、例えば、置換、欠失、又は挿入によるRHO標的位置の変更は、RHO遺伝子の破壊（例えば、「ノックアウト」）をもたらしてもよい。特定の実施形態では、RHO標的位置は、RHO遺伝子の5'領域（例えば、5'UTR、エクソン1、エクソン2、イントロン1、エクソン1/イントロン1境界、又はエクソン2/イントロン1境界）、RHO遺伝子の非コード領域（例えば、エンハンサー領域、プロモーター領域、イントロン、5'UTR、3'UTR、ポリアデニル化シグナル）、又はRHO遺伝子のコード領域（例えば、RHO遺伝子の初期コード領域、エクソン（例えば、エクソン1、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5）、又はエクソン/イントロン境界（例えば、エクソン1/イントロン1、エクソン2/イントロン1）に位置してもよい。

【0135】

「小分子」は、本明細書の用法では、例えば、約2kD未満、約1.5kD未満、約1kD未満、又は約0.75kD未満などの約2kD未満の分子量を有する化合物を指す。

【0136】

「対象」は、本明細書の用法では、ヒト又は非ヒト動物のどちらを意味してもよい。用語は、哺乳類（例えば、ヒト、その他の霊長類、ブタ、齧歯類（例えば、マウス及びラット又はハムスター）、ウサギ、モルモット、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ヒツジ、及びヤギ）を含むが、これに限定されるものではない。別の実施形態では、対象はヒトである。一実施形態では、対象は家禽である。

【0137】

「治療する（treat）」、「治療する（treating）」、及び「治療（treatment）」は、本明細書の用法では、例えば、（a）疾患を阻害し、すなわち、その進行を抑止又は予防し；（b）疾患を緩和し、すなわち、疾病状態の退縮を引き起こし；又は（c）疾患を治癒させることをはじめとする、例えば、ヒトなどの哺乳類の疾患の治療を意味する。

【0138】

「X」は、アミノ酸配列の文脈で、本明細書の用法では、特に断りのない限り、任意のアミノ酸（例えば、20個の天然アミノ酸のいずれか）を指す。

【0139】

常染色体優性網膜色素変性症（adRP）

網膜色素変性症（RP）は、米国で50,000～100,000人が罹患している。RPは、光受容体と網膜色素上皮細胞に影響を与える、遺伝性網膜ジストロフィーのグループである。この疾患は網膜の劣化と萎縮を引き起こし、視力の進行性劣化を特徴とし、最終的には失明をもたらす。

【0140】

典型的な疾患発症は10代の間であるが、一部の対象では成人早期に発症することもある。対象は当初、夜間視力が低下し、周辺視野も低下する。一般に、視力喪失は、周辺視野から内側に向かって進行する。対象の大多数は40歳までに法的に盲目となる。中心視野は、疾患の後期を通して残留することもあるので、一部の対象は、70代になっても小さな視野内で正常な視力を有することもある。しかし、対象の大多数は、50歳から80歳の間に中心視野もまた失う（Berson 1990）。検査時に、対象は、1つ又は複数の骨棘色素沈着、視野狭窄、及び網膜萎縮を有してもよい。

【0141】

RPを引き起こす60を超える遺伝子と数百の変異がある。常染色体優性RP（adRP）は、RPの15～25%を占めている。常染色体性劣性RP（arRP）は、RPの5～20%を占めている。X連鎖RP（X-LRP）は、RPの5～15%を占めている（Daiger 2007）。一般に、adRPは最後に出現することが多く、arRPは中程度に出現し、X-LRPには最初に出現する。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 2 】

常染色体優性網膜色素変性症 (a d R P) は、ロドプシン (R H O) 遺伝子のヘテロ接合変異によって引き起こされる。R H O 遺伝子の変異は、a d R P の症例の 2 5 ~ 3 0 % を占める。

【 0 1 4 3 】

R H O 遺伝子は、ロドプシントタンパク質をコード化する。ロドプシンは、網膜光受容体 (P R) 桿体細胞の外節で発現される G タンパク質共役受容体であり、光伝達カスケードの重要な要素である。ロドプシンによって吸収された光により、1 1 - シスレチナールが異性化し、オールトランスレチナールになる。この立体構造変化によって、ロドプシンはトランスデューシンと共役できるようになり、これは、視覚シグナル伝達カスケードの最初のステップである。R H O 遺伝子のヘテロ接合変異は、野生型ロドプシンの産生の低下及び / 又は変異型ロドプシンの発現を引き起こす。これにより、光伝達カスケードの機能が低下し、桿体 P R 細胞の機能が低下する。時間経過と共に、桿体 P R 細胞の萎縮が起こり、最終的には錐体 P R 細胞の萎縮も起こる。これは、R P 対象が経験する累積視力喪失の典型的な表現型の進行を引き起こす。R H O 変異を有する対象は、末梢視野の進行性喪失とそれに続く中心視野の喪失を経験する (後者は視力の低下によって測定される) 。

【 0 1 4 4 】

例示的な R H O 変異は、表 A で提供される。

【 0 1 4 5 】

【 表 A - 1 】

表 A : Rho 変異(グループ A 変異)

番号	変異
1	Pro23His
2	Pro23Leu
3	Thr58Arg
4	Pro347Thr
5	Pro347Ala
6	Pro347Ser
7	Pro347Gly
8	Pro347Leu
9	Pro347Arg
10	Thr 4 Lys
11	Asn 15 Ser

【 0 1 4 6 】

10

20

30

40

50

【表 A - 2】

12	Thr 17 Met
13	Gln 28 His
14	Leu 40 Arg
15	Met 44 Thr
16	Phe 45 Leu
17	Leu 46 Arg
18	Gly 51 Arg
19	Gly 51 Val
20	Gly 51 Ala
21	Pro 53 Arg
22	Thr 58 Arg
23	Gln 64 stop
24	Val 87 Asp
25	Gly 89 Asp
26	Gly 106 Arg
27	Gly 106 Trp
28	Gly 109 Arg
29	Cys 110 Tyr
30	Cys 110 Phe
31	Gly 114 Asp
32	Gly 114 Val
33	Leu 125 Arg
34	Ser 127 Phe
35	Leu 131 Pro
36	Arg 135 Gly
37	Arg 135 Trp
38	Arg 135 Leu
39	Arg 135 Pro
40	Tyr 136 stop
41	Val 137 Met
42	Cys 140 Ser
43	Ala 164 Val
44	Ala 164 Glu
45	Cys 167 Arg
46	Cys 167 Trp
47	Pro 171 Glu
48	Pro 171 Ser
49	Pro 171 Leu
50	Pro 171 Gln
51	Tyr 178 Asn
52	Tyr 178 Cys
53	Pro 180 Ala
54	Glu 181 Lys
55	Gly 182 Ser
56	Gln 184 Pro
57	Ser 186 Pro
58	Ser 186 Trp
59	Cys 187 Tyr

10

20

30

40

【 0 1 4 7 】

50

【表 A - 3】

60	Gly 188 Arg
61	Gly 188 Glu
62	Asp 190 Asn
63	Asp 190 Tyr
64	Asp 190 Gly
65	Thr 193 Met
66	Met 207 Arg
67	Val 209 Met
68	His 211 Arg
69	His 211 Pro
70	Pro 215 Thr
71	Met 216 Arg
72	Met 216 Lys
73	Phe 220 Cys
74	Cys 222 Arg
75	Pro 267 Leu
76	Pro 267 Arg
77	Ser 270 Arg
78	Thr 289 Pro
79	Lys 296 Glu
80	Lys 296 Met
81	Ser 297 Arg
82	Gln 312 stop
83	Leu 328 Pro
84	Thr 342 Met
85	Gln 344 stop
86	Val 345 Leu
87	Val 345 Met
88	Ala 346 Pro
89	停止 349 Glu
90	Glu 150 Lys
91	Gly 174 Ser
92	Glu 249 ter
93	Gly 284 Ser

10

20

30

40

50

【0148】

R P の治療法は限られており、現在、a d R P の疾患の進行を実質的に逆転又は停止させる承認された治療法はない。一実施形態では、ビタミン A 補給が、疾患の発症を遅延させ、進行を遅くしてもよい。Argus II 網膜インプラントは、2013 年に米国での使用が承認された。Argus II 網膜インプラントは、R P を有する対象の視力に、最小の改善を提供する電気インプラントである。例えば、デバイスによる試験で達成された最高の視力は 20 / 1260 であった。しかし、法的失明は 20 / 200 の視力として定義されている。

【0149】

概要

本明細書で提供されるように、本発明者らは、以下に説明するように、RNA 誘導ヌクレアーゼ（例えば、Cas9 又は Cpf1）によって媒介される 1 つ又は複数のヌクレオチドの挿入又は欠失によって変異型 RHO 遺伝子を破壊し、機能的な RHO cDNA を提供することを含む、改変を提供する治療ストラテジーを設計した。このタイプの改変は、変異型 RHO 遺伝子の「ノックアウト」とも称され、変異型 RHO 遺伝子の機能喪失をもたらす。理論による拘束は望まないが、変異型 RHO 遺伝子をノックアウトし、機能的な外因性 RHO cDNA を提供することで、PR 桿体細胞中で適切なレベルのロドプシンタンパク質が維持される。この治療ストラテジーは、例えば、表 A の RHO 変異などの a

d R Pに関連する全ての既知の変異対立遺伝子を破壊する利点を有する。

【0150】

特定の実施形態では、変異型 R H O 遺伝子の 5' U T R 領域（例えば、5' U T R、エクソン 1、エクソン 2、イントロン 1、エクソン 1 / イントロン 1、又はエクソン 2 / イントロン 1 の境界）が標的化され、変異型 R H O 遺伝子が改変される（すなわち、ノックアウト（例えば、発現をなくす））。

【0151】

特定の実施形態では、変異型 R H O 遺伝子のコード領域（例えば、初期コード領域などのエクソン）が標的化され、変異型 R H O 遺伝子が改変される（すなわち、ノックアウト（例えば、発現をなくす））。例えば、変異型 R H O 遺伝子の初期コード領域は、開始コドンの直後、コード配列の最初のエクソン内、又は開始コドンの 500 b p 内の配列を含む（例えば、500、450、400、350、300、250、200、150、100 又は 50 b p 未満）。

【0152】

特定の実施形態では、変異型 R H O 遺伝子の非コード領域（例えば、エンハンサー領域、プロモーター領域、イントロン、5' U T R、3' U T R、ポリアデニル化シグナル）が標的化され、変異型 R H O 遺伝子が改変される（すなわち、ノックアウト（例えば、発現をなくす））。

【0153】

特定の実施形態では、変異型 R H O 遺伝子のエクソン / イントロン境界（例えば、エクソン 1 / イントロン 1、エクソン 2 / イントロン 1）が標的化され、変異型 R H O 遺伝子が改変される（すなわち、ノックアウト（例えば、発現をなくす））。特定の実施形態では、エクソン / イントロン境界を標的化することは、g R N A による切断に耐性があるようにコドン修飾されていない外因性 R H O c D N A 分子を使用できる利点を提供する。

【0154】

図 1 は、内因性 R H O 遺伝子をノックアウトし、外因性 R H O c D N A を提供するための治療戦略の一実施形態の概略図を示す。一実施形態では、C R I S P R / R N A 誘導ヌクレアーゼゲノム編集システムが使用され、R H O 遺伝子のエクソン 1 又はエクソン 2 が改変されてもよい（すなわち、ノックアウト（例えば、発現を排除する））。特定の実施形態では、R H O 遺伝子は、変異した R H O 遺伝子であってもよい。特定の実施形態では、変異した R H O 遺伝子は、表 A の 1 つ又は複数の R H O 変異を含んでもよい。R H O 遺伝子のエクソン 1 又はエクソン 2 の改変は、内在性の変異した R H O 遺伝子の破壊をもたらす。

【0155】

特定の実施形態では、治療戦略は、二重ベクター系を使用して達成されてもよい。特定の態様では、本開示は、C R I S P R / R N A 誘導ヌクレアーゼゲノム編集システム及び置換 R H O c D N A をコード化する A A V ベクター、及び a d R P 疾患を治療するためのこのようなベクターの使用に焦点を合わせている。例示的なベクターゲノムは、逆方向末端反復（I T R）、少なくとも 1 つの g R N A 配列とその発現を駆動するプロモーター配列、R N A 誘導ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9）コード配列とその発現を駆動する別のプロモーター、核局在化シグナル（N L S）配列、及び R H O c D N A 配列とその発現を促進する別のプロモーターのこれらのベクターの特定の固定要素及び可変要素を示す図 2 に図式化されている。これらの要素のそれぞれについて、本明細書で詳細に説明する。追加的な例示的なベクターゲノムは、少なくとも 1 つの g R N A 配列とその発現を駆動するプロモーター配列（例えば、U 6 プロモーター）、R N A 誘導ヌクレアーゼ（例えば、S . アウレウス（S . aureus）C a s 9）コード配列とその発現を駆動する別のプロモーター（例えば、最小 R H O プロモーター）、及び R H O c D N A 配列とその発現を駆動する別のプロモーター（例えば、最小 R H O プロモーター）のこれらのベクターの特定の固定要素及び可変要素を示す図 3 に図式化されている。本明細書に記載の戦略で使用するための追加的な例示的なベクター及び配列は、図 16 ~ 18 及び配列番

号 8 ~ 1 1 に記載される。

【 0 1 5 6 】

特定の実施形態では、本明細書で使用される A A V ベクターは、その内容全体が参照により本明細書に援用される、2018年6月14日に公開された "Systems and Methods for One-Shot guide RNA (ogRNA) Targeting of Endogenous and Source DNA" と題された国際公開第 2018/106693 号に記載されるような自己制限型ベクター系であってもよい。

【 0 1 5 7 】

図 1 に示されるように、特定の実施形態では、二重ベクター系が使用されて変異型 R H O 遺伝子の発現がノックアウトされ、外因性 R H O c D N A が送達されて野生型ロドプシンタンパク質の発現が回復されてもよい。特定の実施形態では、1つの A A V ベクターゲノムは、I T R 及び R N A 誘導ヌクレアーゼコード配列及びプロモーター配列を含み、その発現及び1つ又は複数の N L S 配列が駆動されてもよい。特定の実施形態では、第2の A A V ベクターゲノムは、I T R、R H O c D N A 配列とその発現を駆動するプロモーター、1つの g R N A 配列とその発現を駆動するプロモーター配列を含んでもよい。

10

【 0 1 5 8 】

理論による拘束は望まないが、R H O 遺伝子をノックアウトし、機能的な外因性 R H O c D N A で置換することで、P R 桿体細胞中で適切なレベルのロドプシンタンパク質が維持される。桿体 P R 細胞中で適切なレベルの機能的ロドプシンタンパク質を回復させると、光伝達カスケードが維持され、a d R P を有する対象における P R 細胞死が遅延又は予防されてもよい。

20

【 0 1 5 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法は、例えば、本明細書に記載の R H O 変異遺伝子又は対立遺伝子などの a d R P に関連する R H O 遺伝子の変異型をノックアウトするステップと、例えば、a d R P に罹患している、又はその素因がある対象などのそれを必要とする対象において、野生型 R H O タンパク質発現を回復させるステップとを特徴とする。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、変異型及び野生型 R H O 対立遺伝子を有する対象において変異型 R H O 対立遺伝子をノックアウトするステップと、桿体 P R 細胞中の野生型ロドプシンタンパク質の発現を回復させるステップとを特徴とする。いくつかの実施形態では、このような方法は、野生型対立遺伝子は無傷のままにしながら、変異対立遺伝子をノックアウトすることによって特徴付けられる。その他の実施形態では、このような方法は、変異型及び野生型対立遺伝子の双方をノックアウトすることによって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、方法は、R H O 遺伝子の変異対立遺伝子をノックアウトし、例えば、野生型 R H O タンパク質をコード化する c D N A の発現を介して、外因性野生型タンパク質を提供することとを特徴とする。いくつかの実施形態では、変異対立遺伝子（及び、任意選択的に、野生型対立遺伝子）の発現をノックアウトすること、そして例えば、a d R P に罹患している、又はその素因がある対象などの、それを必要とする対象において、例えば、外因性 R H O c D N A の発現を介して、野生型 R H O タンパク質発現を回復することは、a d R P に関連する少なくとも1つの症状を改善する。いくつかの実施形態では、このような改善としては、例えば、対象の視力を改善させることが挙げられる。いくつかの実施形態では、このような改善としては、例えば、臨床的介入なしで予想される進行と比較して、例えば、a d R P 疾患の進行を遅延させることが挙げられる。いくつかの実施形態では、このような改善としては、例えば、a d R P 疾患の進行を阻止することが挙げられる。いくつかの実施形態では、このような改善としては、例えば、対象における a d R P 疾患の発症を予防又は遅延させることが挙げられる。

30

40

【 0 1 6 0 】

一実施形態では、本明細書に記載の方法は、生体外で同種異系又は自系網膜細胞を治療することを含む。一実施形態では、生体外で処理された同種異系又は自系網膜細胞が対象に導入される。

50

【0161】

一実施形態では、本明細書に記載の方法は、胚性幹細胞；誘導万能性幹細胞；又はiPS細胞、造血幹細胞、神経細胞幹細胞又は間葉系幹細胞に由来する細胞を生体外で処理することを含む。一実施形態では、生体外で処理された胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、造血幹細胞、神経細胞幹細胞又は間葉系幹細胞が対象に導入される。一実施形態では、細胞は、人工多能性幹細胞(iPS)細胞又は例えば、対象者から生成されたiPS細胞などのiPS細胞に由来する細胞であり、1つ又は複数の変異型RHO遺伝子をノックアウトし、機能的な外因性RHO DNAを発現し、例えば、網膜光受容体細胞などの網膜前駆細胞又は網膜細胞に分化するように修飾され、例えば、網膜の黄斑下領域などの、網膜下において、対象の眼に注入される。

10

【0162】

一実施形態では、本明細書に記載の方法は、生体外で自系幹細胞を処理するステップを含む。一実施形態では、生体外で処理された自系幹細胞が対象に戻される。

【0163】

一実施形態では、対象は、例えば、眼からの細胞(例えば、網膜細胞、例えば、光受容体細胞、例えば、錐体光受容体細胞、例えば、桿体光受容体細胞、例えば、黄斑錐体光受容体細胞)を標的化するウイルス(又は他の機序)によって生体内で治療される。

【0164】

一実施形態では、対象は、例えば、幹細胞(例えば、胚性幹細胞；誘導万能性幹細胞；又はiPS細胞、造血幹細胞、神経細胞幹細胞又は間葉系幹細胞に由来する細胞)を標的化するウイルス(又はその他の機序)によって生体内で治療される。

20

【0165】

一実施形態では、治療は、疾患発症前に対象において開始される。特定の実施形態では、治療は、RHO遺伝子中の1つ又は複数の変異について陽性であると試験された対象において開始される。

【0166】

一実施形態では、治療は、疾患発症後に対象において開始される。

【0167】

一実施形態では、治療は、adRP疾患の初期段階で開始される。一実施形態では、対象が徐々に視力低下を呈した後に治療を開始する。一実施形態では、adRP発症後であるが疾患経過の初期のRHO遺伝子の修復が、疾患の進行を予防するであろう。

30

【0168】

一実施形態では、治療は、疾患の進行した段階にある対象において開始される。理論による拘束は望まないが、進行した段階における治療は、対象の視力(中心視野内)維持することが期待できると考えられ、これは、対象の日常生活動作の機能及び能力にとって重要である。

【0169】

一実施形態では、対象の治療は、疾患の進行を予防する。理論による拘束は望まないが、疾患の全ての段階(例えば、予防的治療、初期段階adRP、及び進行段階adRP)での対象の治療の開始は、RP疾患の進行を予防し、対象に恩恵をもたらすと考えられている。

40

【0170】

一実施形態では、治療は、例えば、乳児又は新生児、ティーンエイジャー、又は成人などの対象が、例えば、本明細書に記載の変異などのRHO遺伝子の変異について陽性であると判定された後に開始される。

【0171】

一実施形態では、治療は、対象が、例えば、本明細書に記載の変異などのRHO遺伝子の変異について陽性であると判定された後であるが、疾患の症状の顕在化の前に開始される。

【0172】

50

一実施形態では、治療は、対象が、例えば、本明細書に記載の変異などの R H O 遺伝子の変異について陽性であると判定された後、疾患の症状の顕在化の後に開始される。

【 0 1 7 3 】

一実施形態では、治療は、視野の低下の出現時に対象において開始される。

【 0 1 7 4 】

一実施形態では、治療は、周辺視野の低下の出現時に対象において開始される。

【 0 1 7 5 】

一実施形態では、治療は、夜間視力及び / 又は夜盲症の出現時に対象において開始される。

【 0 1 7 6 】

一実施形態では、治療は、進行性の視力喪失の出現時に対象において開始される。

【 0 1 7 7 】

一実施形態では、治療は、視野の進行性狭窄の出現時に対象において開始される。

【 0 1 7 8 】

一実施形態では、治療は、対象の検査時に a d R P と一致する 1 つ又は複数の適応症の出現時に対象において開始される。代表的適応症としては、骨棘色素沈着、視野狭窄、網膜萎縮、網膜血管系の減弱、網膜色素上皮の喪失、視神経の蒼白、及び / 又はそれらの組合せが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【 0 1 7 9 】

一実施形態では、本明細書に記載の方法は、例えば、R N A 誘導ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9 又は C p f 1 分子）及び R H O c D N A 分子などの、本明細書に記載の g R N A 又はその他の構成要素の網膜下注射、黄斑下注射、脈絡膜上注射、又は硝子体内注射を含む。

【 0 1 8 0 】

一実施形態では、例えば、R N A 誘導ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9 又は C p f 1 分子）及び R H O c D N A 分子などの、本明細書に記載の g R N A 又はその他の構成要素は、A A V ; レンチウイルス ; ナノ粒子 ; 又は例えば、眼からの細胞（例えば、網膜細胞、例えば、光受容体細胞、例えば、錐体光受容体細胞、例えば、桿体光受容体細胞、例えば、黄斑錐体光受容体細胞）を標的化するように設計された修飾パルボウイルスなどのパルボウイルスによって、例えば、対象に送達される。

【 0 1 8 1 】

一実施形態では、本明細書に記載の g R N A 又は例えば、R N A 誘導ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9 又は C p f 1 分子）及び R H O c D N A 分子などの、その他の構成要素は、A A V ; レンチウイルス ; ナノ粒子 ; 又は例えば、幹細胞（例えば、胚性幹細胞 ; 誘導万能性幹細胞 ; 又は i P S 細胞、造血幹細胞、神経細胞幹細胞又は間葉系幹細胞などに由来する細胞）を標的とするように設計された修飾パルボウイルスなどのパルボウイルスによって、例えば、対象者に送達される。

【 0 1 8 2 】

一実施形態では、本明細書に記載の g R N A 又は、例えば、R N A 誘導ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9 又は C p f 1 分子）及び R H O c D N A 分子などのその他の構成要素は、電気穿孔によって生体外で送達される。

【 0 1 8 3 】

一実施形態では、C R I S P R / R N A 誘導ヌクレアーゼ構成要素を使用して、疾患をもたらす変異型 R H O 遺伝子をノックアウトする。

【 0 1 8 4 】

I . g R N A 分子

ガイド R N A 及び g R N A という用語は、細胞内のゲノム又はエピソーム配列などの標的配列に対する、C a s 9 又は C p f 1 などの R N A 誘導ヌクレアーゼの特定の結合（又は「標的化」）を促進する、任意の核酸を指す。g R N A は、単分子（単一の R N A 分子を含み、或いはキメラとも称される）、又はモジュール型（例えば二重化によって通常互い

10

20

30

40

50

に結合する、*crRNA*及び*tracrRNA*などの2つ以上、典型的には2つの別々のRNA分子を含む)であり得る。*gRNA*とその構成要素は、文献全体を通じて説明されている(例えば、参照により援用される、Briner 2014を参照されたい; Cotta-Ramusinoもまた参照されたい)。

【0185】

細菌及び古細菌では、II型CRISPRシステムは一般に、Cas9などのRNA誘導ヌクレアーゼタンパク質; 外来配列に相補的な5'領域を含むCRISPR RNA (*crRNA*); 及び*crRNA*の3'領域に相補的でありそれと二重鎖を形成する、5'領域を含むトランス活性化*crRNA* (*tracrRNA*)を含む。いかなる理論にも拘束されることは意図されないが、この二重鎖はRNA誘導ヌクレアーゼ/*gRNA*複合体の形成を促進し、その活性に必要であると考えられる。II型CRISPRシステムを遺伝子編集における使用に適合させる間に、例えば、*crRNA*(その3'末端)及び*tracrRNA*(その5'末端)の相補的領域を架橋する、4ヌクレオチド(例えばGAAA)「テトラループ」又は「リンカー」配列の手段によって、*crRNA*及び*tracrRNA*が単一の単分子又はキメラ*gRNA*に連結され得ることが発見された(全て参照により本明細書に援用される、Mali 2013; Jiang 2013; Jinek 2012)。

【0186】

ガイドRNAは、単分又はモジュラー型を問わず、標的配列(例えば、編集が望まれる細胞のゲノム中の二本鎖DNA配列など)の中の標的ドメインに完全に又は部分的に相補的な標的化ドメインを含む。特定の実施形態では、RHO標的配列は、RHO標的位置を包含するか、それを含むか、又はそれに近接している。標的化ドメインは、限定されるものではないが、「ガイド配列」(参照により本明細書に援用される、Hsu 2013)、「相補的領域」(Cotta-Ramusino)、「スペーサー」(Briner 2014)、及び一般的には「*crRNA*」として(Jiang 2013)をはじめとする文献において、様々な名称で呼ばれている。それらに与えられた名称とはかかわりなく、標的化ドメインは、典型的には10~30ヌクレオチド長であり、好ましくは16~24ヌクレオチド長(例えば、16、17、18、19、20、21、22、23又は24ヌクレオチド長)であり、Cas9 *gRNA*の場合には5'末端又はその付近にあり、Cpf1 *gRNA*の場合には3'末端又はその付近にある。標的ドメインに相補的な核酸配列、すなわち、標的ドメインを含む二本鎖DNAの相補的DNA鎖上の核酸配列は、本明細書では「プロトスペーサー」と称される。

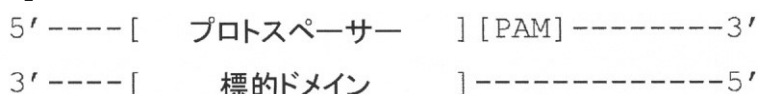
【0187】

「プロトスペーサー隣接モチーフ」(PAM)配列は、「プロトスペーサー」配列との連続的な関係からその名前が付けられている。プロトスペーサー配列と共に、PAM配列は、特異的RNA誘導ヌクレアーゼ/*gRNA*の組合せの標的配列及び/又は標的位置を定義する。様々なRNA誘導ヌクレアーゼは、PAMとプロトスペーサーの間に異なる連続関係を必要としてもよい。

【0188】

例えば、一般に、Cas9ヌクレアーゼはプロトスペーサーの3'にあるPAM配列を認識する:

【化1】



【0189】

別の例として、一般に、Cpf1はプロトスペーサーの5'にあるPAMシーケンスを認識する:

10

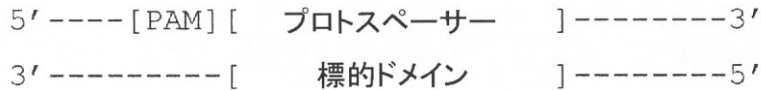
20

30

40

50

【化 2】



【0190】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、RHOプロトスペーサー及び例示的な適切な標的化ドメインが記載されている。当業者であれば、RNA誘導ヌクレアーゼを所定のプロトスペーサーに標的化するのに使用され得る、例えば、追加的なヌクレオチド又はより少ないヌクレオチドを含む標的化ドメイン、又は標的化ドメインとハイブリッド形成したときに1つ又は複数のヌクレオチドミスマッチを含む標的化ドメインなどの、追加的な適切なガイドRNA標的化ドメインを承知している。 10

【0191】

標的化ドメインに加えて、gRNAは、典型的には（下で考察されるように必ずしもそうとは限らないが）、gRNA/Cas9複合体の形成又は活性に影響を及ぼしてもよい複数のドメインを含む。例えば、上記のように、gRNAの第1及び第2の相補的ドメイン（リピート：アンチリピート二重鎖とも称される）によって形成される二重鎖構造は、Cas9の認識（REC）ローブと相互作用して、Cas9/gRNA複合体の形成を媒介してもよい（どちらも参照により本明細書に援用される、Nishimasu 2014; Nishimasu 2015）。第1及び/又は第2の相補的ドメインは、RNAポリメラーゼによって終結シグナルとして認識され得る、1つ又は複数のポリA鎖を含有してもよいことに留意すべきである。そのため、第1及び第2の相補的ドメインの配列は、例えば、Briner 2014に記載されるようなA-Gスワップの使用、あるいはA-gRNAスキャフォールドUスワップの使用を通じて任意選択的に修飾され、これらの区域が除去されてRNAの完全な生体外転写が促進される。第1及び第2の相補的ドメインに対するこれらの及びその他の類似の修飾は、本開示の範囲内である。 20

【0192】

第1及び第2の相補的ドメインと共に、Cas9 gRNAは典型的には、生体内でヌクレアーゼ活性に必要なが、生体外では必要ない、2つ以上の追加的な二重鎖領域を含む。（Nishimasu 2015）。第二の相補的ドメインの3'部分の付近にある第1のステムループは、「近位ドメイン」（Cotta-Ramusino）、「ステムループ1」（Nishimasu 2014; Nishimasu 2015）、及び「nexus」（Briner 2014）などの様々な名称で呼ばれている。1つ又は複数の追加的なステムループ構造は、一般に、gRNAの3'末端の付近に存在し、数は種によって異なり、S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）gRNAが典型的に2つの3'ステムループ（リピート：アンチリピート二重鎖を含む合計4つのステムループ構造：アンチリピート二重鎖）を含む一方で、S.アウレウス（*S. aureus*）及びその他の種は、単に1つのみ有する（合計3つ）。種ごとにまとめられた、保存的ステムループ構造（及びより一般的にはgRNA構造）の説明は、Briner 2014に提供されている。 30

【0193】

熟練した技術者は、gRNAがいくつかの様式で修飾され得ることを理解するであろうが、それらのいくつかは以下に記載されており、これらの修飾は開示の範囲内である。本開示における提示の経済性のために、gRNAは、それらの標的化ドメイン配列のみを参照することによって提示されてもよい。 40

【0194】

gRNA修飾

gRNAの活性、安定性、又はその他の特性は、化学的及び/又は連続的な修飾を組み込むことによって変更され得る。一例として、一過性に発現又は送達された核酸は、例えば、細胞ヌクレアーゼによる分解を起こし易くあり得る。したがって、本明細書に記載のgRNAは、ヌクレアーゼに対して安定性を導入する、1つ又は複数の修飾されたヌクレオチド又はヌクレオチドを含み得る。理論による拘束は望まないが、本明細書に記載の特定 50

の修飾 gRNA は、細胞集団、特に本発明の細胞に導入された場合、自然免疫応答の低下を示し得るとも考えられている。上述のように「先天性免疫応答」という用語は、一般にウイルス性又は細菌起源である、一本鎖核酸をはじめとする外来性核酸に対する細胞性応答を含み、それは、具体的にはインターフェロンであるサイトカインの発現と放出の誘導、及び細胞死を内包する。

【0195】

1つの一般的な3'末端修飾は、1つ又は複数(通常は5~200)のアデニン(A)残基を含むポリAトラクトの追加である。ポリAトラクトは、gRNAをコード化する核酸配列に含有され得るか、又は化学合成中に、又はポリアデノシンポリメラーゼ(例えば、大腸菌(E. coli)ポリ(A)ポリメラーゼ)を使用した生体外転写後に、gRNAに付加され得る。生体内では、ポリアデニル化シグナルを使用することにより、DNAベクターから転写された配列にポリAトラクトが付加され得る。このようなシグナルの例は、Maederに記載されている。

10

【0196】

本発明のRNA誘導ヌクレアーゼ技術の文脈において有用ないくつかの例示的なgRNA修飾が本明細書に提供され、熟練した技術者であれば、本開示に基づいて、本明細書で開示されるgRNA及び治療様式と併せて使用され得る追加的な適切な修飾を確認できるであろう。適切なgRNA修飾としては、限定されないが、そのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される、米国特許出願公開第2017/0073674号明細書(A1)、及び国際公開第2017/165862号(A1)に記載されているものが挙げられる。

20

【0197】

II. gRNAをデザインする方法

標的ドメインを選択し、デザインし、検証する方法をはじめとする、gRNAをデザインする方法が本明細書に記載される。代表的な標的化ドメインもまた、本明細書で提供される。本明細書で考察される標的化ドメインは、本明細書に記載されるgRNAに組み込み得る。

【0198】

標的部位の選択及び検証、並びにオフターゲット分析の方法は、例えば、Mali 2013; Hsu 2013; Fu 2014; Heigwer 2014; Bae 2014; Xiao 2014に記載される。

【0199】

例えば、ソフトウェアツールが利用されて、例えば、ゲノム全体にわたる総オフターゲット活性の最小化など、使用者の標的部位内のgRNAの選択が最適化され得る。オフターゲット活性は、切断以外であってもよい。例えば、S. pyogenes(Cas9)を使用して、想定される各gRNA選択肢について、ツールは、最高いくつかの数の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個)のミスマッチ塩基対を含有する、(NAG又はNGG PAMのどちらかに先行する)ゲノム全体にわたる全てのオフターゲット部位を同定し得る。各オフターゲット部位における切断効率は、例えば、実験的に誘導される重みづけスキームを使用して予測され得る。次に、想定される各gRNAが、その総予測オフターゲット切断に従って格付けされ; 最高位のgRNAは、最大のオンターゲットと最小のオフターゲット切断を有する可能性が高いものに相当する。例えば、CRISPR構築のための自動化された試薬デザイン、オンターゲットサーベヤーアッセイ用のプライマーデザイン、及び次世代シーケンシングを介したオフターゲット切断のハイスループット検出と定量化のためのプライマーデザインなどのその他の機能もまた、ツールに含め得る。

30

40

【0200】

本明細書で考察される標的化ドメインは、本明細書に記載のgRNAに組み込まれ得る。

【0201】

例示的なプロトスペーサー及び標的化ドメイン

S. aureus(S. aureus)Cas9で使用するために、RHO遺伝子内の様々な位置を標的化するガイドRNAが同定された。同定後、gRNAは3つの階層にランク付け

50

された。階層 1 の g R N A は、R H O 遺伝子のエクソン 1 とエクソン 2 の切断に基づいて選択された。階層 1 ガイドは、T 細胞で 9 % を超える編集を示した。選択 2 の g R N A の選択では、選択は R H O 遺伝子の 5 ' U T R の切断に基づいた。階層 2 の g R N A は、T 細胞で 1 0 % を超える編集を示した。階層 3 の g R N A は、R H O 遺伝子のイントロン 1 の切断に基づいて選択された。階層 3 の g R N A は、T 細胞で 1 0 % を超える編集を示す。

【 0 2 0 2 】

表 1 は、第 1 階層パラメーターに従って選択された、R H O 遺伝子のエクソン 1 又はエクソン 2 R H O 標的位置の標的化ドメインを提供する。標的化ドメインは、R H O 遺伝子のエクソン 1 又はエクソン 2 を切断し、T 細胞で 9 % を超える編集を示すことに基づいて選択された。本明細書では、標的化ドメインが、相補的な塩基対形成によって提供される標的ドメイン配列に相補的な鎖と、ハイブリッド形成することが想定される。表中の標的化ドメインのいずれでも、二本鎖切断を与える S . アウレウス (S . aureus) C a s 9 分子と共に使用され得る。表中の標的化ドメインのいずれでも、S . アウレウス (S . aureus) C a s 9 一本鎖切断ヌクレアーゼ (ニッカーゼ) と共に使用され得る。

【 0 2 0 3 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

階層 1				
RHO 遺伝子中の 位置	gRNA ID	インデル画分 ウィンドウ	標的化ドメイン (RNA)	標的化ドメイン (DNA)/ プロトスパーサー
utr5_0; cds_0	RHO-1	0.2284375	GUCAGCCACAAGG GCCACAGCC (配列番号 100)	GTCAGCCACAAGG GCCACAGCC (配列番号 600)
cds_0	RHO-2	0.134454179	CCGAAGACGAAGU AUCCAUGCA (配列番号 101)	CCGAAGACGAAGT ATCCATGCA (配列番号 601)
cds_0	RHO-3	0.174725089	AGUAUCCAUGCAG AGAGGUGUA (配列番号 102)	AGTATCCATGCAGA GAGGTGTA (配列番号 602)
cds_0	RHO-4	0.093809401	CUAGGUUGAGCAG GAUGUAGUU (配列番号 103)	CTAGGTTGAGCAGG ATGTAGTT (配列番号 603)
cds_0	RHO-5	0.109343522	CAUGGCUCAGCCA GGUAGUACU (配列番号 104)	CATGGCTCAGCCAG GTAGTACT (配列番号 604)
cds_0	RHO-6	0.112374147	ACGGGUGUGGUAC GCAGCCCU (配列番号 105)	ACGGGTGTGGTACG CAGCCCCT (配列番号 605)
cds_0; イントロン_0	RHO-7	0.297946972	CCCACACCCGGCUC AUACCGCC (配列番号 106)	CCCACACCCGGCTC ATACCGCC (配列番号 606)
cds_0; イン ترون_0	RHO-8	0.118235744	CCCUGGGCGGUAU GAGCCGGGU (配列番号 107)	CCCTGGGCGGTATG AGCCGGGT (配列番号 607)
cds_1	RHO-9	0.270630335	CCAUCAUGGGCGU UGCCUUCAC (配列番号 108)	CCATCATGGGCGTT GCCTTCAC (配列番号 608)
cds_1; イントロン_1	RHO-10	0.567902679	GUGCCAUUACCUG GACCAGCCG (配列番号 109)	GTGCCATTACCTGG ACCAGCCG (配列番号 609)
cds_1; イントロン_1	RHO-11	0.106516652	UUACCUGGACCAG CCGCGGAGU (配列番号 110)	TTACCTGGACCAGC CGGCGAGT (配列番号 610)

【0204】

表 2 は、第 2 階層パラメーターに従って選択された、RHO 遺伝子の 5'UTR RHO 標的位置の標的化ドメインを示す。標的化ドメインは、RHO 遺伝子の 5'UTR 領域を切断し、T 細胞で 10% を超える編集を示すことに基づいて選択された。標的化ドメインは、相補的塩基対形成を通じて標的ドメインにハイブリダイズすることが、本明細書で検討される。表中の標的化ドメインのいずれでも、二本鎖切断を与える S. アウレウス (S. aureus) Cas9 分子と共に使用され得る。表中の標的化ドメインのいずれでも、S. アウレウス (S. aureus) Cas9 一本鎖切断ヌクレアーゼ (ニックアーゼ) と共に使用され得る。

【0205】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2

階層 2				
<i>RHO</i> 遺伝子中 の位置	gRNA ID	インデル画分 ウインドウ	標的化ドメイン (RNA)	標的化ドメイン (DNA)/ プロトスペーサー
utr5_0	RHO-12	0.459024462	GCAUUCUUGGGUGG GAGCAGCC (配列番号 111)	GCATTCTTGGGTGG GAGCAGCC (配列番号 611)
utr5_0	RHO-13	0.20572897	GCUCAGCCACUCAG GGCUCCAG (配列番号 112)	GCTCAGCCACTCAG GGCTCCAG (配列番号 612)
utr5_0	RHO-14	0.409641098	UGACCCGUGGCUGC UCCACCC (配列番号 113)	TGACCCGTGGCTGC TCCACCC (配列番号 613)
utr5_0	RHO-15	0.134736551	AGCUCAGGCCUUCG CAGCAUUC (配列番号 114)	AGCTCAGGCCTTCG CAGCATTC (配列番号 614)

10

【0206】

表 3 は、第 3 階層パラメーターに従って選択された、*RHO* 遺伝子のイントロン 1 *RHO* 標的位置の標的化ドメインを示す。標的化ドメインは、*RHO* 遺伝子のイントロン 1 を切断し、T 細胞で 10 % を超える編集を示すことに基づいて選択された。標的化ドメインは、相補的塩基対形成を通じて標的ドメインにハイブリダイズすることが、本明細書で検討される。表中の標的化ドメインのいずれでも、二本鎖切断を与える *S. aureus* (*S. aureus*) *Cas9* 分子と共に使用され得る。表中の標的化ドメインのいずれでも、*S. aureus* (*S. aureus*) *Cas9* 一本鎖切断ヌクレアーゼ (ニッカーゼ) と共に使用され得る。

20

【0207】

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3

階層 3				
RHO 遺伝子中の 位置	gRNA ID	インデル画分 ウィンドウ 平均	標的化ドメイン (RNA)	標的化ドメイン/ プロトスペーサー (DNA)
イントロン_0	RHO-16	0.107449452	UAGCAGAAGAAUG CAUCCUAAU (配列番号 115)	TAGCAGAAGAATG CATCCTAAT (配列番号 615)
イントロン_0	RHO-17	0.107559427	ACACGCUGAGGAG AGCUGGGCA (配列番号 116)	ACACGCTGAGGAG AGCTGGGCA (配列番号 616)
イントロン_0	RHO-18	0.116786532	GCAAUAACUCC CCCAUCC (配列番号 117)	GCAAATAACTCC CCCATTCCC (配列番号 617)
イントロン_0	RHO-19	0.129975835	AGACCCAGGCUGG GCACUGAGG (配列番号 118)	AGACCCAGGCTGG GCACTGAGG (配列番号 618)
イントロン_0	RHO-20	0.130270513	CUAGGUCUCCUGG CUGUGAUCC (配列番号 119)	CTAGGTCTCCTGGC TGTGATCC (配列番号 619)
イントロン_0	RHO-21	0.132448578	CCAGAAGGUGGGU GUGCCACUU (配列番号 120)	CCAGAAGGTGGGT GTGCCACTT (配列番号 620)
イントロン_0	RHO-22	0.140129895	AACAAGGAACUCU GCCCCACAU (配列番号 121)	AACAAGGAACTCT GCCCCACAT (配列番号 621)
イントロン_0	RHO-23	0.142141636	CAGGAUUGAACUG GGAACCCGG (配列番号 122)	CAGGATTGAACTG GGAACCCGG (配列番号 622)
イントロン_0	RHO-24	0.147082642	GGGCGUCACACAG GGACGGGTG (配列番号 123)	GGGCGTCACACAG GGACGGGTG (配列番号 623)
イントロン_0	RHO-25	0.14820997	CUGUGAUCCAGGA AUAUCUCUG (配列番号 124)	CTGTGATCCAGGA ATATCTCTG (配列番号 624)

【 0 2 0 8 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

イントロン_0	RHO-26	0.150900653	UUGCAUUUAACAG GAAAACAGA (配列番号 125)	TTGCATTTAACAG GAAAACAGA (配列番号 625)
イントロン_0	RHO-27	0.151929784	GGAGUGCACCCUC CUUAGGCAG (配列番号 126)	GGAGTGCACCCCTC CTTAGGCAG (配列番号 626)
イントロン_0	RHO-28	0.152980769	CAUCUGUCCUGCU CACCACCCC (配列番号 127)	CATCTGTCCTGCTC ACCACCCC (配列番号 627)
イントロン_0	RHO-29	0.156913097	GAGGGGAGGCAGA GGAUGCCAG (配列番号 128)	GAGGGGAGGCAGA GGATGCCAG (配列番号 628)
イントロン_0	RHO-30	0.166237876	CUCAGGGAAUCUC UGGCCAUUG (配列番号 129)	CTCAGGGAATCTC TGGCCATTG (配列番号 629)
イントロン_0	RHO-31	0.166367333	UGCACUCCCCCUA GACAGGGA (配列番号 130)	TGCACTCCCCCTA GACAGGGA (配列番号 630)
イントロン_0	RHO-32	0.172983706	UGCUGUUUGUGCA GGGCUGGCA (配列番号 131)	TGCTGTTTGTGCAG GGCTGGCA (配列番号 631)
イントロン_0	RHO-33	0.185512517	ACUGGGACAUUCC UAACAGUGA (配列番号 132)	ACTGGGACATTCC TAACAGTGA (配列番号 632)
イントロン_0	RHO-34	0.190420346	AUCAGGGGGUCAG GAUUGAACU (配列番号 133)	ATCAGGGGGTCAG GATTGAACT (配列番号 633)
イントロン_0	RHO-35	0.194765615	CUCCUCUCUGGGG GCCCAAGCU (配列番号 134)	CTCCTCTCTGGGGG CCCAAGCT (配列番号 634)
イントロン_0	RHO-36	0.197589827	CUGCAUCUCAGCA GAGAUAUUC (配列番号 135)	CTGCATCTCAGCA GAGATATTC (配列番号 635)
イントロン_0	RHO-37	0.199499884	UGUUUCCCUUGGA GCAGCUGUG (配列番号 136)	TGTTTCCCTTGGAG CAGCTGTG (配列番号 636)
イントロン_0	RHO-38	0.212418288	GCGCUCUGGGCCC AUAAGGGAC (配列番号 137)	GCGCTCTGGGGCC ATAAGGGAC (配列番号 637)
イントロン_0	RHO-39	0.215235707	AGGAUUGAACUGG GAACCCGGU (配列番号 138)	AGGATTGAACTGG GAACCCGGT (配列番号 638)
イントロン_0	RHO-40	0.21710799	CCUAGGAGAGGCC CCCACAUGU (配列番号 139)	CCTAGGAGAGGCC CCCACATGT (配列番号 639)
イントロン_0	RHO-41	0.217881646	AUCACUCAGUUCU GGCCAGAAG (配列番号 140)	ATCACTCAGTTCTG GCCAGAAG (配列番号 640)

10

20

30

40

【 0 2 0 9 】

【表 3 - 3】

イントロン_0	RHO-42	0.227315789	AGAGCUGGGCAAA GAAAUUCCA (配列番号 141)	AGAGCTGGGCAAA GAAATTCCA (配列番号 641)
イントロン_0	RHO-43	0.230358178	CCACCCCAUGAAG UUCCAUAGG (配列番号 142)	CCACCCCATGAAG TTCCATAGG (配列番号 642)
イントロン_0	RHO-44	0.231888098	CCACCCUGAGCUU GGGCCCCCA (配列番号 143)	CCACCCTGAGCTT GGGCCCCCA (配列番号 643)
イントロン_0	RHO-45	0.234285631	CAGAGGAAGAAGA AGGAAUGA (配列番号 144)	CAGAGGAAGAAGA AGGAAATGA (配列番号 644)
イントロン_0	RHO-46	0.240341645	AAACAGCAGCCCG GCUAUCACC (配列番号 145)	AAACAGCAGCCCG GCTATCACC (配列番号 645)
イントロン_0	RHO-47	0.242233765	GGAUUGAACUGGG AACCCGGUA (配列番号 146)	GGATTGAACTGGG AACCCGGTA (配列番号 646)
イントロン_0	RHO-48	0.242660421	UGUGUGUGUGUGU GUUUAGCAG (配列番号 147)	TGTGTGTGTGTGTG TTTAGCAG (配列番号 647)
イントロン_0	RHO-49	0.251755576	UCACACAGGGACG GGUGCAGAG (配列番号 148)	TCACACAGGGACG GGTGCAGAG (配列番号 648)
イントロン_0	RHO-50	0.252241304	GUGUGUGUGUGUG UGUGUUUAG (配列番号 149)	GTGTGTGTGTGTGT GTGTTAG (配列番号 649)
イントロン_0	RHO-51	0.255029622	UGAGCUUGGGCCC CCAGAGAGG (配列番号 150)	TGAGCTTGGGCCC CCAGAGAGG (配列番号 650)
イントロン_0	RHO-52	0.263525952	AAUAUCUCUGCUG AGAUGCAGG (配列番号 151)	AATATCTCTGCTGA GATGCAGG (配列番号 651)
イントロン_0	RHO-53	0.2666129	GGAGAGGGGAAGA GACUCAUUU (配列番号 152)	GGAGAGGGGAAGA GACTCATTT (配列番号 652)
イントロン_0	RHO-54	0.287053205	AGAACUGAGUGAU CUGUGAUUA (配列番号 153)	AGAACTGAGTGAT CTGTGATTA (配列番号 653)
イントロン_0	RHO-55	0.291326632	CCACUCUCCCUAU GGAACUUCA (配列番号 154)	CCACTCTCCCTATG GAACTTCA (配列番号 654)
イントロン_0	RHO-56	0.292218928	AUAAGGGACACGA AUCAGAUCA (配列番号 155)	ATAAGGGACACGA ATCAGATCA (配列番号 655)
イントロン_0	RHO-57	0.305482452	UGGAUUUCCAUAU CUCCAGUCA (配列番号 156)	TGGATTTTCCATTC TCCAGTCA (配列番号 656)

10

20

30

40

【 0 2 1 0 】

【表 3 - 4】

イントロン_0	RHO-58	0.310447227	GUGCAGGAGCCCG GGAGCAUGG (配列番号 157)	GTGCAGGAGCCCG GGAGCATGG (配列番号 657)
イントロン_0	RHO-59	0.31581459	GGGUGGUGAGCAG GACAGAUGU (配列番号 158)	GGGTGGTGAGCAG GACAGATGT (配列番号 658)
イントロン_0	RHO-60	0.329433399	CAGCUCUCCCUCA GUGCCCAGC (配列番号 159)	CAGCTCTCCCTCAG TGCCCAGC (配列番号 659)
イントロン_0	RHO-61	0.337601649	CCUGCUGGGGCGU CACACAGGG (配列番号 160)	CCTGCTGGGGCGT CACACAGGG (配列番号 660)
イントロン_0	RHO-62	0.341369802	CACACACACACAA AACUCCCUA (配列番号 161)	CACACACACACAA AACTCCCTA (配列番号 661)
イントロン_0	RHO-63	0.342930279	ACUUACGGGUGGU UGUUCUCUG (配列番号 162)	ACTTACGGGTGGT TGTTCTCTG (配列番号 662)
イントロン_0	RHO-64	0.347123022	CACAGGGAAGACC CAAUGACUG (配列番号 163)	CACAGGGAAGACC CAATGACTG (配列番号 663)
イントロン_0	RHO-65	0.3604802	AGCACAGACCCCA CUGCCUAAG (配列番号 164)	AGCACAGACCCCA CTGCCTAAG (配列番号 664)
イントロン_0	RHO-66	0.396256305	ACCUGAGGACAGG GGCUGAGAG (配列番号 165)	ACCTGAGGACAGG GGCTGAGAG (配列番号 665)
イントロン_0	RHO-67	0.397224629	CAACAAUGGCCAG AGAUUCCCU (配列番号 166)	CAACAATGGCCAG AGATTCCCT (配列番号 666)
イントロン_0	RHO-68	0.40353484	UGCUGCCUCGGUC CCAUUCUCA (配列番号 167)	TGCTGCCTCGGTCC CATTCTCA (配列番号 667)
イントロン_0	RHO-69	0.416729506	UGCUGCCUGGCCA CAUCCCUAA (配列番号 168)	TGCTGCCTGGCCA CATCCCTAA (配列番号 668)

10

20

30

【0211】

I I I . R N A 誘導ヌクレアーゼ

本開示に従ったRNA誘導ヌクレアーゼとしては、限定されることなく、Cas9及びCpf1などの自然発生のクラス2CRISPRヌクレアーゼ、並びにそれらから誘導され又は得られるその他のヌクレアーゼが挙げられる。機能的には、RNA誘導ヌクレアーゼは、(a) gRNAと相互作用し(例えば複合体形成し); (b) gRNAと共に、(i) gRNAの標的化ドメインに相補的な配列と、任意選択的に(ii)下でより詳細に説明される「プロトスペーサー隣接モチーフ」又は「PAM」と称される追加的な配列とを含む、DNAの標的領域に結合し、任意選択的にそれを切断又は修飾するヌクレアーゼとして定義される。以下の実施例が例証するように、たとえ同一PAM特異性又は切断活性を共有する個々のRNA誘導ヌクレアーゼ間に変動が存在したとしても、RNA誘導ヌクレアーゼは、広い意味で、それらのPAM特異性及び切断活性によって定義され得る。熟練した技術者であれば、本開示のいくつかの態様が、特定のPAM特異性及び/又は切断活性を有する任意の適切なRNA誘導ヌクレアーゼを使用して実装され得るシステム、方法、及び組成物に関することを理解するであろう。この理由から、別段の指定がない限り、RNA誘導ヌクレアーゼという用語は総称として理解されるべきであり、いかなる特定の型(例えば、Cas9と対比したCpf1)、種(例えば、S.ピオゲネス(S. pyo

40

50

genes) と対比した *S. aureus* (S. aureus))、又はバリエーション (例えば、完全長と対比した短縮型又は分割 ; 天然 PAM 特異性と対比した操作された PAM 特異性) にも限定されない。

【0212】

PAM 配列に目を向けると、この構造は、gRNA 標的化ドメイン (又は「スパーサー」) に相補的な「プロトスパーサー」配列とのその配列関係からその名前が付けられている。プロトスパーサー配列と共に、PAM 配列は、特異的 RNA 誘導ヌクレアーゼ / gRNA の組合せのための標的領域又は配列を規定する。

【0213】

様々な RNA 誘導ヌクレアーゼは、PAM とプロトスパーサーの間に異なる連続関係を必要としてもよい。一般に、Cas9 は、プロトスパーサーの 5' にある PAM 配列を、最上部又は相補鎖に対して視覚化されたものとして認識する。

【0214】

PAM 及びプロトスパーサーの特定の配列の向きを認識することに加えて、一般に RNA 誘導ヌクレアーゼは、特異的 PAM 配列を認識する。例えば *S. aureus* (S. aureus) Cas9 は、NNGRR の PAM 配列を認識し、その中では N 配列が、gRNA 標的化ドメインによって認識される領域の 3' に隣接する。*S. pyogenes* (S. pyogenes) Cas9 は、NGG PAM 配列を認識する。操作された RNA 誘導ヌクレアーゼは、類似ヌクレアーゼ (RNA 誘導ヌクレアーゼがそれに由来する天然に存在する変異型、又は操作された RNA 誘導ヌクレアーゼと最大のアミノ酸配列相同性を有する天然に存在する変異型など) の PAM 特異性とは異なる PAM 特異性を有し得ることに留意すべきである。代替の PAM 配列を認識する修飾 Cas9 を以下に説明する。

【0215】

RNA 誘導ヌクレアーゼは、それらの DNA 切断活性によっても特徴付けられる : 天然に存在する RNA 誘導ヌクレアーゼは典型的には、標的核酸で DSB を形成するが、SSB のみを生成する (上で考察される ; 参照により本明細書に援用される Ran 2013 もまた参照されたい)、又は全く切断しない操作された変異体が生成されている。

【0216】

「RNA 誘導ヌクレアーゼ」及び「RNA 誘導ヌクレアーゼ分子」という用語は、本明細書では同義的に使用される。いくつかの実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼは、RNA 誘導 DNA エンドヌクレアーゼ酵素である。いくつかの実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼは CRISPR ヌクレアーゼである。本明細書で提供される方法、ストラテジー、及び治療様式の文脈における使用に適した RNA 誘導ヌクレアーゼの例は、以下の表 4 に列挙され、本明細書で開示される方法、組成物、及び治療様式は、いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるか、又は当業者に知られている RNA 誘導ヌクレアーゼの任意の組合せを利用し得る。

【0217】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. RNA 誘導ヌクレアーゼ

ヌクレアーゼ	長さ (アミノ酸)	PAM	参考文献
SpCas9	1368	NGG	Cong <i>et al.</i> , Science. 2013;339(6121):819-23
SaCas9	1053	NNGRRT	Ran <i>et al.</i> , Nature. 2015;520(7546):186-91.
(KKH) SaCas9	1067	NNNRRT	Kleinstiver <i>et al.</i> , Nat Biotechnol. 2015;33(12):1293-1298
AsCpf1 (AsCas12a)	1353	TTTV	Zetsche <i>et al.</i> , Nat Biotechnol. 2017;35(1):31-34.
LbCpf1 (LbCas12a)	1274	TTTV	Zetsche <i>et al.</i> , Cell. 2015;163(3):759-71.
CasX	980	TTC	Burstein <i>et al.</i> , Nature. 2017;542(7640):237-241.
CasY	1200	TA	Burstein <i>et al.</i> , Nature. 2017;542(7640):237-241.
Cas12h1	870	RTR	Yan <i>et al.</i> , Science. 2019;363(6422):88-91.
Cas12i1	1093	TTN	Yan <i>et al.</i> , Science. 2019;363(6422):88-91.
Cas12c1	不明	TG	Yan <i>et al.</i> , Science. 2019;363(6422):88-91.
Cas12c2	不明	TN	Yan <i>et al.</i> , Science. 2019;363(6422):88-91.
eSpCas9	1423	NGG	Chen <i>et al.</i> , Nature. 2017;550(7676):407-410.
Cas9-HF1	1367	NGG	Chen <i>et al.</i> , Nature. 2017;550(7676):407-410.
HypaCas9	1404	NGG	Chen <i>et al.</i> , Nature. 2017;550(7676):407-410.
dCas9-FokI	1623	NGG	U.S. Patent No. 9,322,037
Sniper-Cas9	1389	NGG	Lee <i>et al.</i> , Nat Commun. 2018;9(1):3048.
xCas9	1786	NGG, NG, GAA, GAT	Wang <i>et al.</i> , Plant Biotechnol J. 2018; pbi.13053.
AaCas12b	1129	TTN	Teng <i>et al.</i> Cell Discov. 2018;4:63.
evoCas9	1423	NGG	Casini <i>et al.</i> , Nat Biotechnol. 2018;36(3):265-271.
SpCas9-NG	1423	NG	Nishimasu <i>et al.</i> , Science. 2018;361(6408):1259-1262.
VRQR	1368	NGA	Li <i>et al.</i> , The CRISPR Journal, 2018; 01:01
VRER	1372	NGCG	Kleinstiver <i>et al.</i> , Nature. 2016;529(7587):490-5.
NmeCas9	1082	NNNGA TT	Amrani <i>et al.</i> , Genome Biol. 2018;19(1):214.
CjCas9	984	NNNNRY AC	Kim <i>et al.</i> , Nat Commun. 2017;8:14500.
BhCas12b	1108	ATTN	Strecker <i>et al.</i> , Nat Commun. 2019 Jan 22;10(1):212.
BhCas12b V4	1108	ATTN	Strecker <i>et al.</i> , Nat Commun. 2019 Jan 22;10(1):212.

10

20

30

40

【0218】

一実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼは、アシダミノコッカス属 (*Acidaminococcus*) 種 Cpf1RR 変異型 (AsCpf1-RR) である。別の実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼは、Cpf1RV 変異型である。

【0219】

標的化ドメイン及びガイド RNA を設計するための、並びにゲノム編集アプローチの文脈での様々な Cas ヌクレアーゼの使用のための、例示的な適切な方法は、当業者に知られている。いくつかの例示的な方法が本明細書で開示されており、追加的な適切な方法は、熟練した技術者であれば、本開示に基づいて明らかであろう。本開示は、この点において

50

限定されるものではない。

【 0 2 2 0 】

I V . R H O ゲノム配列及び相補的 D N A 配列

R H O ゲノム配列は、当業者に知られている。参照を容易にするために、例示的な R H O ゲノム配列を以下に提供する：

【 化 3 】

```
AGAGTCATCCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTGAGCTCAGGCCTTCGCAGCATTCTTGGGTGGG
AGCAGCCACGGGTGAGCCACAAGGGCCACAGCCATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTA
CGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGGTACGCAGCCCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACC
TGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCGCCTACATGTTTCTGCTGATCGTGCTGGGC
TTCCCCATCAACTTCCTCACGCTCTACGTCACCGTCCAGCACAGAAGCTGCGCACGCCTCT
CAACTACATCCTGCTCAACCTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCCTAGGTGGCTTCACCA
GCACCTCTACACCTCTCTGCATGGATACTTCGTCTTCGGGCCCCACAGGATGCAATTTGGAG
GGCTTCTTTGCCACCTGGGCGGTATGAGCCGGGTGTGGGTGGGGTGTGCAGGAGCCCGGGA
GCATGGAGGGGTCTGGGAGAGTCCCGGGCTTGGCGGTGGTGGCTGAGAGGCCTTCTCCCTTC
TCCTGTCCTGTCAATGTTATCCAAAGCCCTCATATATTCAGTCAACAAACACCATTCATGGT
GATAGCCGGGCTGCTGTTTGTGCAGGGCTGGCACTGAACACTGCCTTGATCTTATTTGGAGC
AATATGCGCTTGTCTAATTTACAGCAAGAAAAGTGAAGCTGAGGCTCAAAGAAGTCAAGCGC
CCTGCTGGGGCGTCACACAGGGACGGGTGCAGAGTTGAGTTGGAAGCCCGCATCTATCTCGG
GCCATGTTTGCAGCACCAAGCCTCTGTTTCCCTTGGAGCAGCTGTGCTGAGTCAGACCCAGG
```

10

20

30

40

50

【化 4】

CTGGGCACTGAGGGAGAGCTGGGCAAGCCAGACCCCTCCTCTCTGGGGGCCCAAGCTCAGGG
TGGGAAGTGGATTTTCCATTCTCCAGTCATTGGGTCTTCCCTGTGCTGGGCAATGGGCTCGG
TCCCCCTCTGGCATCCTCTGCCTCCCCCTCTCAGCCCCCTGTCTCAGGTGCCCCCTCCAGCCTCC
CTGCCGCGTTCCAAGTCTCCTGGTGTGAGAACCGCAAGCAGCCGCTCTGAAGCAGTTCCTT
TTTGCTTTAGAAATAATGTCTTGCAATTTAACAGGAAAACAGATGGGGTGCTGCAGGGATAACA
GATCCCACTTAACAGAGAGGAAAACTGAGGCAGGGAGAGGGGAAGAGACTCATTTAGGGATG
TGGCCAGGCAGCAACAAGAGCCTAGGTCTCCTGGCTGTGATCCAGGAATATCTCTGCTGAGA
TGCAGGAGGAGACGCTAGAAGCAGCCATTGCAAAGCTGGGTGACGGGGAGAGCTTACCGCCA
GCCACAAGCGTCTCTCTGCCAGCCTTGCCCTGTCTCCCCATGTCCAGGCTGCTGCCTCGGT
CCCATTTCTCAGGGAATCTCTGGCCATTGTTGGGTGTTTGTGTCATTCAATAATCACAGATCA
CTCAGTTCTGGCCAGAAGGTGGGTGTGCCACTTACGGGTGGTTGTTCTCTGCAGGGTCAGTC
CCAGTTTACAAATATTGTCCCTTTCACTGTTAGGAATGTCCCAGTTTGGTTGATTAATACTATA
TGGCCACTCTCCCTATGGAACCTTCATGGGGTGGTGAGCAGGACAGATGTCTGAATTCATCA
TTTCCTTCTTCTCCTCTGGGCAAAACATTGCACATTGCTTCATGGCTCCTAGGAGAGGCCC
CCACATGTCCGGGTATTTCATTTCCTCGAGAAGGGAGAGGGAGGAAGGACTGCCAATTCTGG
GTTTCCACCACCTCTGCATTCTTCCCAACAAGGAACTCTGCCCCACATTAGGATGCATTCT
TCTGCTAAAC
CACACACAAAACCTCCCTACCGGGTCCCAGTTCAATCCTGACCCCTGATCTGATTCGTGTC
CCTTATGGGCCCAGAGCGCTAAGCAAATAACTTCCCCATTCCTTGAATTTCTTTGCCAG
CTCTCCTCAGCGTGTGGTCCCTCTGCCCCCTCCCCCTCCTCCAGCACCAAGCTCTCTCCTT
CCCCAAGGCCTCCTCAAATCCCTCTCCCACTCCTGGTTGCCTTCCTAGCTACCCCTCTCCCTG
TCTAGGGGGGAGTGACCCCTCCTTAGGCAGTGGGGTCTGTGCTGACCGCCTGCTGACTGCCT
TGCAGGTGAAATTGCCCTGTGGTCTTGGTGGTCTGGCCATCGAGCGGTACGTGGTGGTGT
GTAAGCCCATGAGCAACTTCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTCACC
TGGGTCTATGGCGCTGGCCTGCGCCGACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTAATGGCACTG
AGCAGAAGGGAAGAAGCTCCGGGGGCTCTTTGTAGGGTCCCTCCAGTCAGGACTCAAACCCAG
TAGTGTCTGGTTCCAGGCACTGACCTTGTATGTCTCCTGGCCCCAAATGCCCACTCAGGGTAG
GGGTGTAGGGCAGAAGAAGAAACAGACTCTAATGTTGCTACAAGGGCTGGTCCCATCTCCTG
AGCCCCATGTCAAACAGAATCCAAGACATCCCAACCCTTCACCTTGGCTGTGCCCCAATCC
TCAACTAAGCTAGGCGCAAATTCCAATCCTCTTTGGTCTAGTACCCCGGGGGCAGCCCCCTC
TAACCTTGGGCCTCAGCAGCAGGGGAGGCCACACCTTCCTAGTGCAGGTGGCCATATTGTGG
CCCCTTGGAACTGGGTCCCCTCAGCCTCTAGGCGATTGTCTCCTAATGGGGCTGAGATGAG
ACACAGTGGGGACAGTGGTTTGGACAATAGGACTGGTGACTCTGGTCCCCAGAGGCCTCATG
TCCCTCTGTCTCCAGAAAATCCCCTCTCACTTCCCTTTCTCCTCAGTCTTGCTAGGGTC

10

20

30

40

50

【化 5】

CATTTCTTACCCCTTGCTGAATTTGAGCCACCCCTGGACTTTTTCCCATCTTCTCCAAT
CTGGCCTAGTTCTATCCTCTGGAAGCAGAGCCGCTGGACGCTCTGGGTTTCTGAGGCCCCGT
CCACTGTCACCAATATCAGGAACCATTGCCACGTCTAATGACGTGCGCTGGAAGCCTCTAG
TTTCCAGAAGCTGCACAAAGATCCCTTAGATACTCTGTGTGTCCATCTTTGGCCTGGAAAAT
ACTCTCACCCCTGGGGCTAGGAAGACCTCGGTTTGTACAAACTTCCTCAAATGCAGAGCCTGA
GGGCTCTCCCCACCTCCTCACCAACCCCTCTGCGTGGCATAGCCCTAGCCTCAGCGGGCAGTG
GATGCTGGGGCTGGGCATGCAGGGAGAGGCTGGGTGGTGTCTCTGGTAACGCAGCCACCAA
ACAATGAAGCGACACTGATTCCACAAGGTGCATCTGCATCCCCATCTGATCCATTCCATCCT
GTCACCCAGCCATGCAGACGTTTATGATCCCCCTTTCCAGGGAGGGAATGTGAAGCCCCAGA
AAGGGCCAGCGCTCGGCAGCCACCTTGGCTGTTCCCAAGTCCCTCACAGGCAGGGTCTCCCT
ACCTGCCTGTCTCAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGCTCGTGTGGAATCGACTACTAC
ACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTCTCTACATGTTCTGTTGGTCCACTTCAC
CATCCCCATGATTATCATCTTTTCTGCTATGGGCAGCTCGTCTTACCCTCAAGGAGGTAC
GGGCCGGGGGTGGGCGGCCTCACGGCTCTGAGGGTCCAGCCCCAGCATGCATCTGCGGCT
CCTGCTCCCTGGAGGAGCCATGGTCTGGACCCGGGTCCCGTGTCTTGCAGGCCGCTGCCCAG
CAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAGGAGGTCAACCCGATGGTCTATCAT
GGTCTCGCTTTCTGATCTGCTGGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCATTCTACATCTTACCCC
ACCAGGGCTCCAACCTCGGTCCCATCTTCTATGACCATCCCAGCGTTCTTTGCCAAGAGCGCC
GCCATCTACAACCCTGTCTATATCATGATGAACAAGCAGGTGCCTACTGCGGGTGGGAG
GGCCCCAGTGCCCCAGGCCACAGGCGCTGCCTGCCAAGGACAAGCTACTTCCCAGGGCAGGG
GAGGGGGCTCCATCAGGGTTACTGGCAGCAGTCTTGGGTGAGCAGTCCCAATGGGGAGTGTG
TGAGAAATGCAGATTCTTGGCCCCACTCAGAACTGCTGAATCTCAGGGTGGGGCCAGGAACC
TGCATTTCCAGCAAGCCCTCCACAGGTGGCTCAGATGCTCACTCAGGTGGGAGAAGCTCCAG
TCAGCTAGTTCTGGAAGCCCAATGTCAAAGTCAGAAGGACCCAAGTCGGGAATGGGATGGGC
CAGTCTCCATAAAGCTGAATAAGGAGCTAAAAAGTCTTATTCTGAGGGGTAAAGGGGTAAAG
GGTTCCTCGGAGAGGTACCTCCGAGGGGTAAACAGTTGGGTAAACAGTCTCTGAAGTCAGCT
CTGCCATTTTCTAGCTGTATGGCCCTGGGCAAGTCAATTTCTTCTCTGTGCTTTGGTTTCC
TCATCCATAGAAAGGTAGAAAGGGCAAAACACCAAACTCTTGGATTACAAGAGATAATTTAC
AGAACACCCTTGGCACACAGAGGGCACCATGAAATGTCACGGGTGACACAGCCCCCTTGTGC
TCAGTCCCTGGCATCTCTAGGGGTGAGGAGCGTCTGCCTAGCAGGTTCCCTCCAGGAAGCTG
GATTTGAGTGGATGGGGCGCTGGAATCGTGAGGGGCAGAAGCAGGCAAAGGGTCGGGGCGAA
CCTCACTAACGTGCCAGTTCCAAGCACACTGTGGGCAGCCCTGGCCCTGACTCAAGCCTCTT
GCCTTCCAGTTCCGGAACCTGCATGCTCACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCACTGGGTGA
CGATGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCCTAAGACC

10

20

30

40

50

【化 6】

TGCCTAGGACTCTGTGGCCGACTATAGGCGTCTCCCATCCCCTACACCTTCCCCCAGCCACA
 GCCATCCCACCAGGAGCAGCGCCTGTGCAGAATGAACGAAGTCACATAGGCTCCTTAATTTT
 TTTTTTTTTTTTAAAGAAATAATTAATGAGGCTCCTCACTCACCTGGGACAGCCTGAGAAGGG
 ACATCCACCAAGACCTACTGATCTGGAGTCCCACGTTCCCCAAGGCCAGCGGGATGTGTGCC
 CCTCCTCCTCCCAACTCATCTTTCAGGAACACGAGGATTCTTGCTTTCTGGAAAAGTGTCCC
 AGCTTAGGGATAAGTGTCTAGCACAGAATGGGGCACACAGTAGGTGCTTAATAAATGCTGGA
 TGGATGCAGGAAGGAATGGAGGAATGAATGGGAAGGGAGAACATATCTATCCTCTCAGACCC
 TCGCAGCAGCAGCAACTCATACTTGGCTAATGATATGGAGCAGTTGTTTTTCCCTCCCTGGG
 CCTCACTTTTCTTCTCCTATAAAATGGAAATCCCAGATCCCTGGTCCTGCCGACACGCAGCTA
 CTGAGAAGACCAAAAGAGGTGTGTGTGTGTCTATGTGTGTGTTTCAGCACTTTGTAAATAGC
 AAGAAGCTGTACAGATTCTAGTTAATGTTGTGAATAACATCAATTAATGTAAGTAGTTAATT
 ACTATGATTATCACCTCCTGATAGTGAACATTTTGAGATTGGGCATTGAGATGATGGGGTTT
 CACCCAACCTTGGGGCAGGTTTTTAAAAATTAGCTAGGCATCAAGGCCAGACCAGGGCTGGG
 GGTGGGCTGTAGGCAGGGACAGTCACAGGAATGCAGAATGCAGTCATCAGACCTGAAAAAA
 CAACACTGGGGGAGGGGGACGGTGAAGGCCAAGTTCCCAATGAGGGTGAGATTGGGCCTGGG
 GTCTCACCCCTAGTGTGGGGCCCCAGGTCCCGTGCCCTCCCTTCCCAATGTGGCCTATGGAG
 AGACAGGCCTTTCTCTCAGCCTCTGGAAGCCACCTGCTCTTTTGCTCTAGCACCTGGGTCCC
 AGCATCTAGAGCATGGAGCCTCTAGAAGCCATGCTCACCCGCCCACATTTAATTAACAGCTG
 AGTCCCTGATGTCATCCTTATCTCGAAGAGCTTAGAAACAAAGAGTGGGAAATTCCACTGGG
 CCTACCTTCCTTGGGGATGTTTCATGGGCCCCAGTTTCCAGTTTCCCTTGCCAGACAAGCCCA
 TCTTCAGCAGTTGCTAGTCCATTCTCCATTCTGGAGAATCTGCTCCAAAAAGCTGGCCACAT
 CTCTGAGGTGTCAGAAATTAAGCTGCCTCAGTAACTGCTCCCCCTTCTCCATATAAGCAAAGC
 CAGAAGCTCTAGCTTTACCCAGCTCTGCCTGGAGACTAAGGCCAAATTGGGGCCATTAAAAGCT
 CAGCTCCTATGTTGGTATTAACGGTGGTGGGTTTTGTTGCTTTCACACTCTATCCACAGGAT
 AGATTGAAACTGCCAGCTTCCACCTGATCCCTGACCCTGGGATGGCTGGATTGAGCAATGAG
 CAGAGCCAAGCAGCACAGAGTCCCCTGGGGCTAGAGGTGGAGGAGGCAGTCCTGGGAATGGG
 AAAAACCCCA (配列番号1)

10

20

30

【0221】

RHOゲノム配列には、次のように注釈を付け得る。

mRNA 1..456,2238..2406,3613..3778,3895..4134,4970..6706

CDS 96..456,2238..2406,3613..3778,3895..4134,4970..5080

40

【0222】

本明細書の他の箇所でより詳細に記載される例示的な標的ドメインは、例証の目的で以下の表5に提供される。

【0223】

【表 5】

表 5

参考文献番号	<i>RHO</i> ゲノム配列(配列番号 1)中の 標的ドメインの位置
RHO-1	74..95
RHO-2	391..412
RHO-3	381..402
RHO-4	312..333
RHO-5	178..199
RHO-6	144..165
RHO-7	453..474
RHO-8	448..469
RHO-9	2334..2355
RHO-10	2395..2416
RHO-11	2389..2410

10

20

【0224】

様々な *RHO* cDNA 配列が、本明細書で使用されてもよい。特定の実施形態では、*RHO* cDNA が送達され、外因性の機能的 *RHO* cDNA が提供されてもよい。

【0225】

以下に提供されるのは、野生型 *RHO* cDNA の例示的な核酸配列である：

【化 7】

ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGGTACG
CAGCCCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCG
CCTACATGTTTCTGCTGATCGTGCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTCACGCTCTACGTCACC
GTCCAGCACAGAAGCTGCGCACGCCTCTCAACTACATCCTGCTCAACCTAGCCGTGGCTGA
CCTCTTCATGGTCCTAGGTGGCTTCACCAGCACCCCTCTACACCTCTCTGCATGGATACTTCG
TCTTCGGGCCCACAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTTGCCACCCTGGGCGGTGAAATTGCC
CTGTGGTCCTTGGTGGTCCTGGCCATCGAGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAA
CTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTCACCTGGGTTCATGGCGCTGG
CCTGCGCCGCACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGCTCG
TGTGGAATCGACTACTACACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTCTATCTACAT
GTTCTGTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTTCTGCTATGGGCAGCTCGTCT
TCACCGTCAAGGAGGCCGCTGCCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAG
GAGGTCACCCGCATGGTCATCATCATGGTCATCGCTTTCCTGATCTGCTGGGTGCCCTACGC
CAGCGTGGCATTCTACATCTTCACCCACCAGGGCTCCAACCTTCGGTCCCATCTTCATGACCA
TCCCAGCGTTCTTTGCCAAGAGCGCCGCCATCTACAACCCTGTCTATATCATGATGAAC
AAGCAGTTCGGAACTGCATGCTCACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCTGGGTGACGA
TGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCCTAA (配列
番号2)

30

40

【0226】

特定の実施形態では、*RHO* cDNA はコドン最適化され、発現が増加されてもよい。
特定の実施形態では、*RHO* cDNA は、gRNA 標的化ドメインとのハイブリッド形
成に耐性があるようにコドン修飾されてもよい。特定の実施形態では、*RHO* cDNA
は、gRNA 標的化ドメインとのハイブリッド形成に耐性があるようにコドン修飾されて
いない。

【0227】

50

以下に提供されるのは、コドン最適化された R H O c D N A の例示的な核酸配列である：
コドン最適化された R H O をコード化する配列 1（コドン 1）：

【化 8】

ATGAACGGCACCGAGGGCCCCAACTTCTACGTCCCCTTCAGCAACGCCACCGGCGTGGTCCG
CAGCCCCCTTCGAGTACCCCCAGTACTACCTGGCCGAGCCCTGGCAGTTTCAGCATGCTGGCCG
CCTACATGTTTCCTGCTGATCGTCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTGACCCTGTACGTACCC
GTCCAGCACAGAAGCTGCGCACCCCCCTGAACTACATCCTGCTGAACCTGGCCGTGCGCGA
CCTGTTTCATGGTCTGGGCGGCTTCACCAGCACCTGTACACCAGCCTGCACGGCTACTTCG
TCTTCGGCCCCACCGGCTGCAACCTGGAGGGCTTCTTCGCCACCCTGGGCGGCGAGATCGCC
CTGTGGAGCCTGGTCTGCTGCTGCGCATCGAGCGCTACGTCTGCTGCTGCAAGCCCATGAGCAA
CTTCCGCTTCGGCGAGAACCACGCCATCATGGGCGTGGCCTTCACCTGGGTTCATGGCCCTGG
CCTGCGCCGCCCCCCCCCTGGCCGGCTGGAGCGGCTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGCAGC
TGCGGCATCGACTACTACACCCTGAAGCCCGAGGTCAACAACGAGAGCTTCGTTCATCTACAT
GTTTCGTCTGTCACCTTCACCATCCCCATGATCATCATCTTCTTCTGCTACGGCCAGCTGGTCT
TCACCGTCAAGGAGGCGCGCCGCCAGCAGCAGGAGAGCGCCACCACCCAGAAGGCCGAGAAG
GAGGTCAACCGCATGGTTCATCATCATGGTTCATCGCCTTCCTGATCTGCTGGGTCCCCCTACGC
CAGCGTCGCCTTCTACATCTTCACCCACCAGGGCAGCAACTTCGGCCCCATCTTCATGACCA
TCCCCGCCTTCTTCGCCAAGAGCGCCGCCATCTACAACCCCGTCATCTACATCATGATGAAC
AAGCAGTTCCGCAACTGCATGCTGACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCCTGGGCGACGA
CGAGGCCAGCGCCACCGTCAGCAAGACCGAGACCAGCCAGGTGCCCCCGCCTAA (配列番号13)

10

コドン最適化された R H O をコード化する配列 2（コドン 2）：

20

【化 9】

ATGAACGGCACCGAGGGCCCCAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAACGCCACCGGCGTGGTGGC
CTCCCCCTTCGAGTACCCCCAGTACTACCTGGCCGAGCCCTGGCAGTTCTCCATGCTGGCCG
CCTACATGTTTCCTGCTGATCGTCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTGACCCTGTACGTGACC
GTGCAGCACAGAAGCTGCGCACCCCCCTGAACTACATCCTGCTGAACCTGGCCGTGGCCGA
CCTGTTTCATGGTCTGGGCGGCTTCACCTCCACCCTGTACACCTCCCTGCACGGCTACTTCG
TGTTTCGGCCCCACCGGCTGCAACCTGGAGGGCTTCTTCGCCACCCTGGGCGGCGAGATCGCC
CTGTGGTCCCTGGTGGTCTGCTGGCCATCGAGCGCTACGTGGTGGTGTGCAAGCCCATGTCCAA
CTTCCGCTTCGGCGAGAACCACGCCATCATGGGCGTGGCCTTCACCTGGGTGATGGCCCTGG
CCTGCGCCGCCCCCCCCCTGGCCGGCTGGTCCCGCTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGTCTCC
TGCGGCATCGACTACTACACCCTGAAGCCCGAGGTGAACAACGAGTCCCTTCGTGATCTACAT
GTTTCGTGGTGCACCTTCACCATCCCCATGATCATCATCTTCTTCTGCTACGGCCAGCTGGTGT
TCACCGTGAAGGAGGCGCGCCGCCAGCAGCAGGAGTCCGCCACCACCCAGAAGGCCGAGAAG
GAGGTGACCCGCATGGTTCATCATCATGGTTCATCGCCTTCCTGATCTGCTGGGTGCCCTACGC
CTCCGTGGCCTTCTACATCTTCACCCACCAGGGCTCCAACCTTCGGCCCCATCTTCATGACCA
TCCCCGCCTTCTTCGCCAAGTCCGCCGCCATCTACAACCCCGTCATCTACATCATGATGAAC
AAGCAGTTCCGCAACTGCATGCTGACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCCTGGGCGACGA
CGAGGCCCTCCGCCACCGTGTCCAAGACCGAGACCTCCAGGTGGCCCCCGCCTAA (配列番号14)

30

コドン最適化された R H O をコード化する配列 3（コドン 3）：

40

50

【化 1 0】

ATGAACGGGCACCGAGGGCCCCAACTTCTACGTCCCCTTCAGCAACGCCACCGGCGTCTGTCGG
CAGCCCCCTTCGAGTACCCCCAGTACTACCTGGCCGAGCCCTGGCAGTTCTCTATGCTGGCCG
CCTACATGTTCTTGCTGATCGTCCTGGGCTTCCCTATCAACTTCCTCACCCTCTACGTCACC
GTCCAGCACAGAAGCTCCGCACCCCTCTCAACTACATCCTCCTTAACCTTGCCGTCGCCGA
CCTTTTCATGGTCCTTGGCGGCTTCACCTCTACTCTTTACACTTCTTTGCACGGGTACTTCG
TGTTCCGGTCCCTACTGGTTGCAACTTGGAGGGTTTCTTCGCCACTTTGGGTGGTGAGATCGCC
TTGTGGTTCGTTGGTGGTGTAGCTATCGAGCGATACGTGGTGGTGTGCAAGCCTATGTCGAA
CTTCCGGTTCGGTGAGAATCATGCTATCATGGGAGTGGCTTTTACTTGGGTGATGGCTTTAG
CTTGCGCTGCTCCTCCGTTAGCTGGATGGTCGCGTTATATCCCGGAGGGATTACAGTGCTCA
TGCGGAATCGACTATTATACTCTAAAGCCGGAAGTTAATAATGAATCATTTGTTATTTATAT
GTTTGTGTTGTTCAATTTTACAATTCCGATGATTATTATTTTTTTTTTGTATGGACAGCTAGTTT
TTACAGTTAAGGAAGCAGCAGCACAGCAACAAGAATCAGCAACAACACAAAAGGCAGAAAAA
GAAGTTACAAGGATGGTTATTATTATGGTAATTGCATTTCTAATATGTTGGGTACCGTATGC
ATCCGTAGCATTTTATATATTTACACATCAAGGGTCCAATTTTGGGCCAATATTTATGACGA
TACCAGCGTTTTTTTGGCAAATCCGCGGCGATATATAATCCAGTAATATATATAATGATGAAT
AAACAATTTAGAAATTGTATGCTAACGACGATATGTTGTGGGAAAAATCCACTAGGGGGATGA
TGAAGCGAGTGCACGGTAAGTAAAACGGAAACGAGTCAAGTAGCGCCAGCGTAA (配列番号15)

10

コドン最適化された R H O をコード化する配列 4 (コドン 4) :

【化 1 1】

ATGAACGGGCACCGAGGGTCCCAATTTCTACGTCCCATTTTCCAACGCCACGGGGGTGGTACG
CAGCCCTTTTGAATATCCGCAGTACTATCTGGCTGAGCCCTGGCAGTTTCTATGCTCGCAG
CGTACATGTTCTTGCTAATCGTTCTGGGATTTCCAATTAATTTCCCTCACATTGTATGTCACC
GTGCAGCACAGAAGCTACGGACGCCTCTGAACTACATCCTCTTGAATCTAGCCGTCGCTGA
CCTGTTTATGGTTCTCGGCGGTTTTCACATCGACCTTGTATACGTCACTACATGGGTACTTTG
TCTTCGGACCGACAGGCTGCAACCTGGAAGGTTTTTTCGCAACCCTCGGGGGAGAGATTGCG
TTGTGGTCCCTAGTGGTACTGGCCATCGAAAGGTATGTTGTCTGTGTGAAGCCCATGAGCAA
TTTTTCGCTTCGGCGAGAACCACGCTATTATGGGTGTAGCATTACGTGGGTATGGCGCTCG
CCTGCGCTGCACCACCTTTGGCGGGGTGGTCTCGGTACATCCCGGAAGGACTACAGTGTTTCG
TGCGGCATTGATTATTACACACTGAAGCCCGAGGTCAATAACGAATCATTCGTGATCTATAT
GTTTGTAGTTCAATTCACCATTCCAATGATCATTATCTTTTTCTGTTACGGTCAGCTCGTCT
TTACGGTGAAGGAGGCCGCTGCACAGCAGCAGGAATCCGCGACAACCCAGAAGGCCGAGAAG
GAAGTAACGAGGATGGTTATTATCATGGTCATTGCTTTCTTGATCTGCTGGGTGCCTTATGC
AAGCGTAGCGTTTTACATTTTACACACCAGGGGTCTAATTTTGGACCGATCTTCATGACCA
TTCCCGCCTTTTTTCGCTAAGTCGGCAGCGATCTATAACCCAGTTATTTACATCATGATGAAT
AAGCAGTTTCGCAACTGTATGCTAACGACAATTTGCTGTGGCAAGAATCCTCTGGGTGACGA
TGAGGCCTCAGCTACCGTCTCCAAGACGGAAACAAGCCAGGTGGCACCGGCGTAA (配列番号16)

20

30

コドン最適化された R H O をコード化する配列 5 (コドン 5) :

40

50

【化 1 2】

ATGAATGGGACTGAAGGACCTAATTTCTATGTGCCATTTAGCAATGCTACTGGCGTTGTCAG
 AAGCCCCCTTGAATATCCACAATACTATCTGGCCGAACCTTGGCAGTTTCAGCATGCTCGCTG
 CCTATATGTTTCTGCTGATTGTGCTGGGCTTTCCATAAATTTCTCACCCTGTATGTTACT
 GTTCAACACAAAAAGCTGCGGACGCCTCTGAACTACATACTGCTGAACCTGGCCGTCGCCGA
 CCTGTTTATGGTCCTGGGAGGCTTTACAAGCACTCTGTATACAAGCCTGCACGGCTACTTCG
 TGTTTCGGCCCCACAGGCTGCAACCTCGAAGGCTTCTTTGCCACCCTCGGAGGAGAGATTGCC
 CTGTGGAGCCTGGTGGTGCTGGCCATCGAAAGGTATGTGGTGGTGTGTAAACCCATGTCCAA
 TTTTCGGTTCGGCGAGAACCACGCTATTATGGGAGTGGCTTTCACTTGGGTGATGGCCCTGG
 CCTGCGCCGCCCCACCACTGGCCGGGTGGAGCCGGTACATCCCAGAGGGGCTGCAATGTAGC
 TGCGGAATCGACTATTATACCCTGAAACCAGAGGTGAACAACGAGAGCTTTGTGATTTATAT
 GTTTGTGGTGCATTTTACAATTCCTATGATTATCATTTTCTTCTGTACGGGCAACTGGTGT
 TTACCGTGAAGGAAGCCGCCGCTCAACAGCAGGAGAGCGCCACAACCCAAAAGGCCGAGAAG
 GAGGTGACCAGAATGGTGATTATTATGGTGATCGCTTTTCTGATTTGCTGGGTGCCATACGC
 TAGCGTCGCTTTCTATATTTTCACTCACCAGGGGAGCAACTTCGGCCCCATTTTCATGACAA
 TCCCTGCCTTTTTTGTAAAAGCGCCGCCATCTATAACCCAGTGATCTACATCATGATGAAC
 AAACAGTTTtaggaactgtatgctcacaacaatctgctgtggaaagaacccctcggcgatga
 CGAAGCCAGCGCCACCGTCAGCAAGACAGAAACAAGCCAGGTGGCCCCCTGCCTAA (配列番号17)

10

コドン最適化された RHO をコード化する配列 6 (コドン 6) :

【化 1 3】

ATGAATGGCACAGAGGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTTAGCAATGCCACAGGCGTCGTGCG
 GAGCCCTTTTGTAGTACCCTCAGTACTATCTGGCCGAGCCTTGGCAGTTTAGCATGCTGGCCG
 CCTACATGTTCTGCTGATCGTGCTGGGCTTCCCCATCAACTTTCTGACCCTGTACGTGACC
 GTGCAGCACAAGAAGCTGCGGACCCCTCTGAACTACATCCTGCTGAATCTGGCCGTGGCCGA
 CCTGTTTATGGTGCTCGGCGGCTTTACCAGCACACTGTACACAAGCCTGCACGGCTACTTCG
 TGTTTGGCCCCACCGGCTGCAATCTGGAAGGCTTTTTTGGCACACTCGGCGGCGAAATTGCT
 CTGTGGTCACTGGTGGTGCTGGCCATCGAGAGATACGTGGTTCGTGTGCAAGCCCATGAGCAA
 CTTTCAGATTGCGCGAGAACCACGCCATCATGGGCGTCGCCTTTACATGGGTATGGCCCTGG
 CTTGTGCAGCTCCTCCTTGTCCGGCTGGTCCAGATATATTCCTGAGGGCCTGCAGTGCAGC
 TGCGGCATCGATTACTACACCCTGAAGCCTGAAGTGAACAACGAGAGCTTCGTGATCTACAT
 GTTTGTGGTGCATTCACGATCCCCATGATCATCATATTTCTTTTGTACGGCCAGCTGGTGT
 TCACCGTGAAGAAGCCGCTGCTCAGCAGCAAGAGAGCGCCACAACACAGAAAGCCGAGAAA
 GAAGTGACCCGGATGGTCATTATCATGGTTATCGCCTTTCTGATCTGTTGGGTGCCCTACGC
 CAGCGTGGCCTTCTACATCTTTACCCACCAAGGCAGCAACTTCGGCCCCATCTTTATGACAA
 TCCCCGCCTTCTTTGCCAAGAGCGCCGCCATCTACAACCCCGTGATCTATATCATGATGAAC
 AAGCAGTTCGCAACTGCATGCTGACCACCATCTGCTGCGGAAAGAACCCTCTGGGAGATGA
 TGAGGCCAGCGCCACCGTGTCTAAGACCGAAACATCTCAGGTGGCCCCCTGCATGA (配列番号18)

20

30

【0 2 2 8】

特定の実施形態では、RHO cDNA は、修飾 5' UTR、修飾 3' UTR、又はそれらの組合せを含んでもよい。例えば、特定の実施形態では、RHO cDNA は、短縮型 5' UTR、短縮型 3' UTR、又はそれらの組合せを含んでもよい。特定の実施形態では、RHO cDNA は、既知の安定なメッセンジャー RNA (mRNA) からの 3' UTR を含んでもよい。例えば、特定の実施形態では、RHO cDNA は、RHO コード配列の下流に異種 3' -UTR を含んでもよい。例えば、いくつかの実施形態では、RHO cDNA は、
 - グロビン 3' UTR を含んでもよい。特定の実施形態では、RHO cDNA は、
 - グロビン 3' UTR を含んでもよい。特定の実施形態では、RHO cDNA は、
 1 つ又は複数のイントロンを含んでもよい。特定の実施形態では、RHO cDNA は、
 1 つ又は複数のイントロンのランケーションを含んでもよい。

40

【0 2 2 9】

RHO cDNA の転写物を安定化するために使用され得る例示的な適切な異種 3' -UT

50

Rとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

H B A 1 3 ' U T R :

【化 1 4】

GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTT
CCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCA (配列番号38)

短鎖 H B A 1 3 ' U T R :

【化 1 5】

GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTT
CCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGA (配列番号39)

10

T H 3 ' U T R :

【化 1 6】

GTGCACGGCGTCCCTGAGGGGCCCTTCCCAACCTCCCCTGGTCCTGCACTGTCCCGGAGCTCA
GGCCCTGGTGAGGGGCTGGGTCCCGGGTGCCCCCATGCCCTCCCTGCTGCCAGGCTCCAC
TGCCCCGTGCACCTGCTTCTCAGCGCAACAGCTGTGTGTGCCCCGTGGTGAGGTTGTGCTGCCT
GTGGTGAGGTCTGTCTGGCTCCCAGGGTCTGGGGGCTGCTGCACTGCCCTCCGCCCTTC
CCTGACACTGTCTGCTGCCCAATCACCGTCACAATAAAAGAACTGTGGTCTCTA
(配列番号40)

C O L 1 A 1 3 ' U T R :

20

【化 1 7】

ACTCCCTCCATCCCAACCTGGCTCCCTCCCACCCAACCAACTTTCCCCCAACCCGGAAACA
GACAAGCAACCCAACTGAACCCCTCAAAAGCCAAAAAATGGGAGACAATTTACATGGAC
TTTGGAATAATTTTTTTCCTTTGCATTCTCTCAAACCTTAGTTTTATCTTTGACCAAC
CGAACATGACCAAAAACCAAAAGTGCATTCAACCTTACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAT
AAATAATAACTTTTTAAAAAAGGAAGCTTGGTCCACTTGCTTGAAGACCCATGCGGGGGTA
AGTCCCTTTCTGCCCCGTGGGCTTATGAAACCCCAATGCTGCCCTTTCTGCTCCTTTCTCCA
CACCCCTTTGGGGCTCCCTCCACTCCTTCCCAAATCTGTCTCCCAGAAGACACAGGAA
ACAATGTATTGTCTGCCAGCAATCAAAGGCAATGCTCAAACACCCAAGTGGCCCCCACCCT
CAGCCCGCTCCTGCCCCGCCAGCACCCCGAGGCCCTGGGGGACCTGGGGTTCTCAGACTGCC
AAAGAAGCCTTGCCATCTGGCGCTCCCATGGCTCTTGCAACATCTCCCTTCGTTTTTGAGG
GGGTATGCCGGGGGAGCCACCAGCCCTCACTGGGTTCGGAGGAGAGTCAGGAAGGGCCAC
GACAAAGCAGAAACATCGGATTTGGGGAACGCGTGTCAATCCCTTGTGCCGCAGGGCTGGGC
GGGAGAGACTGTTCTGTTCCTTGTGTAACCTGTGTGCTGAAAGACTACCTCGTTCTTGTCTT
GATGTGTCACCGGGGCAACTGCCTGGGGGCGGGGATGGGGGCAGGGTGAAGCGGCTCCCCA
TTTTATACCAAAGGTGCTACATCTATGTGATGGGTGGGGTGGGGAGGGAATCACTGGTGCTA
TAGAAATTGAGATGCCCCCCCAGGCCAGCAAATGTTCCCTTTTGTTCAAAGTCTATTTTTAT
TCCTTGATAATTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGGATGGGGACTTGTGAATTTTTCTAA
AGGTGCTATTTAACATGGGAGGAGAGCGTGTGCGGCTCCAGCCCAGCCCGCTGCTCACTTTC
CACCTCTCTCCACCTGCCTCTGGCTTCTCAGGCCTCTGCTCTCCGACCTCTCTCCTCTGAA
ACCCTCCTCCACAGCTGCAGCCCATCCTCCCGGCTCCCTCCTAGTCTGTCTGCGTCTCTG
TCCCCGGGTTTCAGAGACAACTTCCCAAAGCACAAAGCAGTTTTTCCCCTAGGGGTGGGAG
GAAGCAAAGACTCTGTACCTATTTTGTATGTGTATAATAATTTGAGATGTTTTTAATTATT
TTGATTGCTGGAATAAAGCATGTGGAAATGACCCAAACATAA (配列番号41)

30

40

A L O X 1 5 3 ' U T R :

【化 1 8】

GCGTCGCCACCCTTTGGTTATTTTCAGCCCCCATCACCCAAGCCACAAGCTGACCCCTTCGTG
GTTATAGCCCTGCCCTCCCAAGTCCCACCCTCTTCCCATGTCCCACCCTCCCTAGAGGGGCA
CCTTTTCATGGTCTCTGCACCCAGTGAACACATTTTACTCTAGAGGCATCACCTGGGACCTT
ACTCCTCTTTCCCTTCCTTCCTTTCCTATCTTCCTTCCTCTCTCTCTCCTCCTTTCTTCA
TTCAGATCTATATGGCAAATAGCCACAATTATATAAAATCATTTCAAGACTAGAATAGGGGGA
TATAATACATATTACTCCACACCTTTTATGAATCAAATATGATTTTTTTTGTGTTGTTAAGA
CAGAGTCTCACTTTGACACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGCCATCACACGGCTCACTGCAG
CCTCAGCGTCCTGGGCTCAAATGATCCTCCCACCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAG
GCTCATGCCATCATGCCCAGCTAATATTTTTTTTATTTTCGTGGAGACGGGGCCTCACTATGT
TGCCTAGGCTGGAAATAGGATTTTGAACCCAAATTGAGTTTAAACAATAATAAAAAGTTGTTT
TACGCTAAAGATGGAAAAGAAGTACTAGGACTGAAGTATTTTAAATAAAATATTGGCAAAAGAA
(配列番号42)

10

【0 2 3 0】

特定の実施形態では、RHO cDNAは、1つ又は複数のイントロンを含んでもよい。
特定の実施形態では、RHO cDNAは、1つ又は複数のイントロンのランケーションを含んでもよい。

【0 2 3 1】

以下の表6は、イントロンを含有するRHO cDNAの例示的な配列を提供する。

【0 2 3 2】

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表6

cDNA識別子	RHO cDNA配列
イントロン1を 有する RHO cDNA	<p>ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGG TACGCAGCCCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCAT GCTGGCCGCCCTACATGTTTCTGCTGATCGTGCTGGGCTTCCCCATCAACTTCTCTCAGC CTCTACGTCAACGCTCCAGCACAAGAAGCTGCCGACGCCTCTCAACTACATCCTGCTCA ACCTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCCCTAGGTGGCTTACCAGCACCCTCTACAC CTCTCTGCATGGATACTTCGTCTTCGGGCCCCACAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTT GCCACCCTGGGCGGTATGAGCCGGGTGTGGGTGGGGTGTGCAGGAGCCCGGAGCATG GAGGGGTCTGGGAGAGTCCCGGGCTTGGCGGTGGTGGCTGAGAGGCTTCTCCCTTCT CCTGTCTGTCAATGTTATCCAAAGCCCTCATATATTCACTCAACAAACACCATTTCAT GGTGATAGCCGGGCTGCTGTTTGTGAGGGCTGGCACTGAACACTGCCCTTGATCTTAT TTGGAGCAATATGCGCTTGTCTAATTTACAGCAAGAAAAGTGGCTGAGGCTCAAAG AAGTCAAGCGCCCTGCTGGGGCTGCACAGGGACGGGTGCAGAGTTGAGTTGGAAGC CCGCATCTATCTCGGGCCATGTTTGCAGCACCAGCCTCTGTTTCCCTTGGAGCAGCT GTGCTGAGTCAGACCCAGGCTGGGCACTGAGGGAGAGCTGGGCAAGCCAGACCCCTCC TCTCTGGGGGCCCAAGCTCAGGGTGGGAAGTGGATTTTCCATTCTCCAGTCATTGGGT CTTCCCTGTGCTGGGCAATGGGCTCGGTCCCTCTGGCATCCTCTGCCCTCCCTCTCA GCCCCTGTCTCAGGTGCCCTCCAGCCTCCCTGCCGCGTTCCAAGTCTCCTGGTGT GAGAACCAGCAAGCAGCCGCTCTGAAGCAGTTCTTTTGGCTTTAGAATAATGTCTTGC ATTTAACAGGAAAACAGATGGGGTGTGTCAGGGATAACAGATCCCACTTAACAGAGAG GAAACTGAGGCAGGGAGAGGGGAAGAGACTCATTTAGGGATGTGGCCAGGCAGCAAC AAGAGCCTAGGTCTCCTGGCTGTGATCCAGGAATATCTCTGCTGAGATGCAGGAGGAG ACGCTAGAAGCAGCCATTGCAAAGCTGGGTGACGGGGAGAGCTTACCGCCAGCCACAA GCGTCTCTCTGCCAGCCTTGGCTGTCTCCCCATGTCCAGGCTGCTGCCCTCGGTCCC ATTTCTCAGGGAATCTCTGGCCATTGTTGGGTGTTGTGTCATTCAATAATCACAGATC ACTCAGTTCTGGCCAGAAGGTGGGTGTGCCACTTACGGGTGGTTGTTCTCTGCAGGGT CAGTCCCAGTTTACAAATATTGTCCCTTTCACTGTTAGGAATGTCCCAGTTTGGTTGA TTAACTATATGGCCACTCTCCCTATGGAACCTCATGGGGTGGTGAGCAGGACAGATGT CTGAATTCCATCATTTCTCTTCTTCTCTCTGGGCAAAACATTGCACATTGCTTCATG GCTCCTAGGAGAGGCCCCACATGTCCGGGTATTTTCATTTCCCGAGAAGGGAGAGGG AGGAAGGACTGCCAATTCTGGGTTTCCACCACCTCTGCATTCTTCCCAACAAGGAAC TCTGCCCCACATTAGGATGCATTCTCTGCTAAACACACACACACACACACACACACA CAACACACACACACACACACACACACACACACACAAAACCTCCCTACCGGGTTCCTCA GTTCAATCCTGACCCCTGATCTGATTGCTGTCCCTTATGGGCCAGAGCGCTAAGCA AATAACTTCCCCCATTCCTGGAATTTCTTTGCCAGCTCTCCTCAGCGTGTGGTCCC TCTGCCCCCTTCCCCCTCCTCCAGCACCAAGCTCTCTCCTTCCCAAGGCCCTCCTCAA ATCCCTCTCCCACTCCTGGTTGCCTTCTTAGCTACCCCTCTCCTGTCTAGGGGGGAGT GCACCCTCCTTAGGCAGTGGGGTCTGTGCTGACCGCTGTGACTGCCCTGCAGGTGA AATTGCCCTGTGGTCCTTGGTGGTCCTGGCCATCGAGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAG CCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTCACT GGGTGATGGCGCTGGCCTGCGCCGCACCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCC CGAGGGCCTGCAGTGTCTGTGGAATCGACTACTACACGCTCAAGCCGGAGGTCAAC AACGAGTCTTTTGTCTATCATGTTCGTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCA TCTTTTCTGCTATGGGCAGCTCGTCTTACCGTCAAGGAGGCCGTGCCAGCAGCA GGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAGGAGTCAACCGCATGGTTCATCATCATG</p>

10

20

30

40

50

【 0 2 3 3 】

【表 6 - 2】

	<p>GTCATCGCTTTCCTGATCTGCTGGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCATTTCTACATCTTCA CCCACCAGGGCTCCAACTTCGGTCCCATCTTCATGACCATCCCAGCGTTCTTTGCCAA GAGCGCCGCCATCTACAACCTGTCTATATCATGATGAACAAGCAGTTCCGGAAC TGCATGCTCACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCTGCGTGACGATGAGGCCTCTG CTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCTAA (配列番号4)</p>
イントロン2を 有する RHO cDNA	<p>ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTG GTACGCAGCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCC ATGCTGGCCGCTACATGTTTCTGCTGATCGTGTGGGCTTCCCACATCAACTTCCTC ACGCTCTACGTCACCGTCCAGCACAAGAAGCTGCGCACGCCTCTCAACTACATCTG CTCAACCTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCTAGGTGGCTTCACCAGCACCTC TACACCTCTCTGCATGGATACTTCGTCTTCGGGCCACAGGATGCAATTTGGAGGGC TTCTTTGCCACCCTGGGCGGTGAAATTGCCCTGTGGTCTTGGTGGTCTGGCCATC GAGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTCCGCTTCGGGGAGAACCAT GCCATCATGGCGTTGCCTTCACCTGGGTCTGGCGCTGGCTGCGCCGACCCCCA CTGCGCGGCTGGTCCAGGTAATGGCACTGAGCAGAAGGGAAGAGCTCCGGGGGCTC TTTGTAGGGTCTCCAGTCAAGTCAAAACCAGTAGTGTCTGGTCCAGGCACTGA CCTTGTATGTCTCCTGGCCAAATGCCCACTCAGGGTAGGGGTAGGGGAGAAAGAA GAAACAGACTCTAATGTTGCTACAAGGGCTGGTCCCCTCTCTGAGCCCCATGTCAA ACAGAAATCCAAGACATCCCAACCTTCACCTTGGCTGTGCCCTAATCTCAACTAA GCTAGGCGCAAATTCGAATCTCTTTGGTCTAGTACCCCGGGGGCAGCCCCCTCTAA CCTTGGGCTCAGCAGCAGGGGAGGCCACACCTTCCTAGTGCAGGTGGCATATTTGT GGCCCTTGGAACTGGGTCCCACTCAGCCTCTAGGCGATTGTCTCCTAATGGGGCTG AGATGAGACACAGTGGGGACAGTGGTTTGGACAATAGGACTGGTGAATCTGGTCCCC AGAGGCTCATGTCCCTCTGTCTCCAGAAAATCCCACTCTCACTTCCCTTTCTCTCC TCAGTCTTGTAGGGTCCATTTCTTACCCCTTGTGAATTTGAGCCCAACCCCTGGA CTTTTTCCCCATCTTCTCCAATCTGGCCTAGTTCTATCTCTGGAAGCAGAGCCGCT GGACGCTCTGGGTTTCTGAGGCCCTCCACTGTCAACCAATATCAGGAACCATTGCC ACGTCTAATGACGTGCGCTGGAAGCCTCTAGTTTCCAGAAGCTGCACAAAGATCCC TTAGATACTCTGTGTCTCCATCTTTGGCTGGAAAATACTCTCACCCTGGGGCTAGG AAGACCTCGGTTTGTACAACTTCTCAAATGCAGAGCCTGAGGGCTCTCCCCACCT CCTCACCAACCTCTGCGTGGCATAGCCCTAGCCTCAGCGGGCAGTGGATGCTGGGG CTGGGCATGCAGGGAGAGGCTGGGTGGTGTCTGTTAACGCAGCCACCAACAAAT GAAGCGACACTGATTCACAAGGTGCATCTGCATCCCCATCTGATCCATTCCATCCT GTCAACCCAGCCATGCAGACGTTTATGATCCCTTTTCCAGGGAGGGAATGTGAAGCC CCAGAAAGGGCCAGCGCTCGGCAGCCACCTTGGCTGTTCCCAAGTCCCTCACAGGCA GGGTCTCCCTACCTGCTGTCTCAGGTACATCCCCGAGGGCTGCAGTGTCTGCTGT GGAATCGACTACTACAGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTCTATCTAC ATGTTCTGTGGTCCACTTCACCATCCCATGATTATCATCTTTTCTGCTATGGGCAG CTGCTCTTACCCGTCAAGGAGGCGCTGCCCAGCAGCAGGAGTCAAGCCACACAG AAGGCAGAGAAGGAGGTCAACCGCATGGTCTCATCATGATGCTATCGCTTTCCTGATC TGCTGGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCATTCTACATCTTCAACCCAGGGCTCCAAC TTCGGTCCCATCTTCTGACCATCCAGCGTTCTTTGCCAAGAGCGCCGCCATCTAC AACCCTGTCTATATCATGATGAACAAGCAGTTCCGGAAGTGCATGCTCACCACC ATCTGCTGCGCAAGAACCCTGCGGTGACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAG ACCGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCTAA (配列番号5)</p>
イントロン3を 有する RHO cDNA	<p>ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTG GTACGCAGCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCC ATGCTGGCCGCTACATGTTTCTGCTGATCGTGTGGGCTTCCCACATCAACTTCCTC ACGCTCTACGTCACCGTCCAGCACAAGAAGCTGCGCACGCCTCTCAACTACATCTG CTCAACCTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCTAGGTGGCTTCACCAGCACCTC TACACCTCTCTGCATGGATACTTCGTCTTCGGGCCACAGGATGCAATTTGGAGGGC TTCTTTGCCACCCTGGGCGGTGAAATTGCCCTGTGGTCTTGGTGGTCTGGCCATC GAGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTCCGCTTCGGGGAGAACCAT GCCATCATGGCGTTGCCTTCACCTGGGTCTGGCGCTGGCCTGCGCCGACCCCCA CTGCGCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCTGCAGTGTCTGTTGGAATCGAC TACTACAGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTCTATCATGTTCTGTG GTCCACTTCACCATCCCATGATTATCATCTTTTCTGCTATGGGCAGTCTGCTTTC ACCGTCAAGGAGGTACGGGCCGGGGGTGGGCGGCTCACGGCTCTGAGGGTCCAGC</p>

10

20

30

40

【 0 2 3 4 】

【表 6 - 3】

	CCCCAGCATGCATCTGCGGCTCCTGCTCCCTGGAGGAGCCATGGTCTGGACCCGGGT CCCGTGCTCCTGCAGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAAGCCACACAGAAGGCAG AGAAGGAGGTCAACCGCATGGTCATCATCATGGTCATCGCTTTCCTGATCTGCTGGG TGCCCTACGCCAGCGTGGCATTCTACATCTTCAACCCAGGCGTCCAACTTCGGTC CCATCTTCATGACCATCCAGCGTTCCTTGGCAAGAGCGCCGATCTACAACCCGTG TCATCTATATCATGATGAACAAGCAGTTCCGGAAGTGCATGCTCACCACCATCTGCT GCGGCAAGAACCCACTGGGTGACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGA CGAGCCAGGTGGCCCCGGCCTAA (配列番号6)
イントロン4を 有する RHO cDNA	ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTG GTACGCAGCCCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCC ATGCTGGCCGCTACATGTTTCTGCTGATCGTGGTGGCTTCCCCATCAACTTCTCTC ACGCTCTACGTCAACGTCCAGCACAAGAAGCTGCGCAGCCCTCTCAACTACATCCTG CTCAACCTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCCCTAGGTGGCTTCAACGACCCCTC TACACCTCTCTGCATGGATACTTCGTCTTCGGGCCCCAGGATGCAATTTGGAGGGC TTCTTTGCCACCCCTGGGCGGTGAAATTGCCCTGTGGTCTTGGTGGTCTGGCCATC GAGCGGTACGTGGTGGTGTGAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCAT GCCATCATGGGCGTTGCCTTCACCTGGGTGATGGCGCTGGCTGCGCCGACCCCCA CTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCAGGGCCTGCAGTGTCTGTGGAATCGAC TACTACAGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTGTCTATCTACATGTTCTGTG GTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTTCTGCTATGGGCAGCTCGTCTTC ACCGTCAAGGAGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAAGCCACACAGAAGGCAGAG AAGGAGGTCAACCGCATGGTCATCATCATGGTCATCGCTTTCCTGATCTGCTGGGTG CCCTACGCCAGCGTGGCATTCTACATCTTCACCCACAGGGCTCCAACCTCGGTCCC ATCTTCATGACCATCCAGCGTTCTTTGCCAAGAGCGCCGCTCTACAACCCCTGTC ATCTATATCATGATGAACAAGCAGGTGCCTACTGCGGGTGGGAGGGCCCCAGTGCCC CAGGCCACAGGCGCTGCCTGCCAAGGACAAGCTACTTCCAGGGCAGGGGAGGGGGC TCCATCAGGGTTACTGGCAGCAGTCTTGGGTGAGCAGTCCCAATGGGGAGTGTGTGA GAAATGCAGATTCTTGCCCCACTCAGAACTGCTGAATCTCAGGGTGGGCCCAGGAA CCTGCATTTCCAGCAAGCCCTCCACAGGTGGTCTGATGCTCACTCAGGTGGGAGAA GCTCCAGTCAGCTAGTTCTGGAAGCCCAATGTCAAAGTCAAGAGGACCCAGTCGGG AATGGGATGGGCCAGTCTCCATAAAGCTGAATAAGGAGCTAAAAAGTCTTATTCTGA GGGGTAAAGGGGTAAAGGGTTCTCGGAGAGGTACCTCCAGGGGTAAACAGTTGGG TAAACAGTCTCTGAAGTCAGCTCTGCCATTTTCTAGCTGTATGGCCCTGGGCAAGTC AATTTCTTCTCTGTGCTTTGGTTTCTCATCCATAGAAAGGTAGAAAGGGCAAAAC ACCAACTCTTGGATTACAAGAGATAATTTACAGAACCCCTTGGCACACAGAGGGC ACCATGAAATGTCAGGGGTGACACAGCCCCCTTGTGCTCAGTCCCTGGCATCTCTAG GGGTGAGGAGCGTCTGCCTAGCAGGTTCCTCCAGGAAGCTGGATTGAGTGGATGG GGCGCTGGAATCGTGAGGGGCAGAAGCAGGCAAGGGTGGGGCGAACCTCACTAAC GTGCCAGTTCGAAGCACACTGTGGGCAGCCCTGGCCCTGACTCAAGCCTCTTGCCCT CCAGTTCGGAAGTGCATGCTCACCACATCTGCTGCGGCAAGAACCCATGGGTGA CGATGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCCTA A (配列番号7)

10

20

30

【0235】

V. ゲノム編集アプローチ

いくつかの実施形態では、RHO遺伝子は、本明細書で考察されるアプローチの1つを使用して改変される。

【0236】

RHOのNHEJ媒介性ノックアウト

本開示のいくつかの態様は、例えば、本明細書に記載の標的配列などの、例えば、RHO標的配列に対するCas9又はCpf1ヌクレアーゼなどの、RNA誘導ヌクレアーゼを標的化すること、及び/又は本明細書に記載のガイドRNAを使用することを特徴とする、ストラテジー、方法、組成物、及び治療様式を提供し、ここで、RNA誘導ヌクレアーゼは、RHO標的配列又はその近傍でRHOゲノムDNAを切断し、切断されたゲノムDNAのNHEJ媒介修復をもたらす。NHEJを媒介修復の結果は、典型的には、切断部位でのインデル生成であり、それは次に、切断されたRHO遺伝子の機能喪失をもたらす。機能喪失は、例えば、RHO遺伝子の場合：例えば、RHO転写物又はRHOタンパク質などのRHO遺伝子産物などの遺伝子産物の発現の減少又は完全消失によって、又は野生型遺伝子産物の機能を示さない遺伝子産物の発現によって特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、RHO遺伝子の機能喪失は、より低いレベルの機能的RHOタンパク質の発現によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、RHO遺伝子の機能喪失は、

40

50

RHO遺伝子からのRHOタンパク質の発現の消失によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、変異型RHO遺伝子又は対立遺伝子の機能喪失は、コード化された変異型RHOタンパク質の発現減少又は発現消失によって特徴付けられる。

【0237】

本明細書に記載されるように、ヌクレアーゼ誘導非相同末端結合(NHEJ)を使用して、標的位置にインデルが導入され得る。ヌクレアーゼ誘導NHEJもまた使用して、目的の遺伝子の標的位置での変異を含むゲノム配列を除去(例えば、欠失)させ得る。

【0238】

理論による拘束は望まないが、一実施形態では、本明細書に記載の方法に関連するゲノムの改変は、ヌクレアーゼ誘導NHEJと、NHEJ修復経路の誤りがちな性質とに依存すると考えられる。NHEJは、2つの末端を共に連結することで、DNA中の二本鎖切断を修復する;しかし、通常、元の配列は、それらが二本鎖切断によって形成された真にそのとおりの2つの適合性末端が、完璧にライゲートされた場合に限り、復元される。二本鎖切断のDNA末端は、しばしば酵素的プロセッシングの対象であり、末端の再結合に先だって、片方又は双方の鎖に、ヌクレオチドの付加又は除去がもたらされる。これは、NHEJ修復部位におけるDNA配列の挿入及び/又は欠失(インデル)変異の存在をもたらす。

【0239】

NHEJによって生成されるインデル変異は、自然界では予測不可能である;しかし、所与の切断部位では、おそらく小規模なマイクロホモロジー領域のために、特定のインデル配列が好まれ、母集団中で大きな比率を占める。欠失の長さは、幅広く変動し得て;最も一般的には、1~50bpの範囲であるが、それらは100~200bpを超える範囲に容易に達し得る。挿入はより短い傾向があり、多くの場合、切断部位に隣接して取り囲む、短い配列重複を含む。しかし、大きな挿入を得ることが可能であり、これらの場合、挿入配列は、しばしば、ゲノムのその他の領域に、又は細胞内に存在するプラスミドDNAに由来が突き止められている。

【0240】

NHEJは変異原性過程であるので、特異的な最終配列の生成が要求されない限り、それはまた小規模な配列モチーフを欠失させるのにも使用され得る。二本鎖切断が、特異的配列モチーフの近くで標的化される場合、NHEJ修復によって引き起こされる欠失変異は、望まれないヌクレオチドに及ぶことが多く、その結果それ除去する。より大型のDNAセグメントの欠失では、配列の両側に1つずつ2つの二本鎖切断が導入されて、介在配列全体が除去され、末端の間にNHEJがもたらされ得る。これらのアプローチの双方を使用して、特異的DNA配列が欠失され得る;しかし、NHEJの誤りがちな性質は、欠失部位にインデル変異をなおも生じてよい。

【0241】

二本鎖切断RNA誘導ヌクレアーゼと、一本鎖RNA誘導ヌクレアーゼ(又はニッカーゼ)の双方が、本明細書に記載される方法及び組成物で使用され、切断誘導インデルが生成され得る。

【0242】

RHO遺伝子のNHEJ媒介ノックアウトを特徴とするいくつかの例示的な方法が、本明細書で提供され、いくつかの例示的な適切なガイドRNA、RNA誘導ヌクレアーゼ、送達方法、及びそのような方法に関連するその他の態様についても同様である。追加的な適切な方法、ガイドRNA、RNA誘導ヌクレアーゼ、送達方法などは、本開示に基づいて当業者には明らかであろう。

【0243】

HDR修復及びテンプレート核酸

本明細書に記載されるように、特定の実施形態では、ヌクレアーゼ誘導相同指向修復(HDR)を使用して、変異型RHO遺伝子の標的位置が変更され(例えば、ノックアウト)、変異型RHO遺伝子が野生型RHO配列で置換され得る。理論による拘束は望まないが

10

20

30

40

50

、標的位置の改変は、ドナーテンプレート又はテンプレート核酸による相同指向修復（H D R）によって起きると考えられる。例えば、ドナーテンプレート又はテンプレート核酸は、標的位置の改変を提供する。プラスミドドナーは、相同組換えのためのテンプレートとして利用され得ることが検討される。一本鎖ドナーテンプレートが、切断配列とドナーテンプレート間で、代案の相同指向修復（例えば、一本鎖アニーリング）方法による標的位置の改変のためのテンプレートとして、使用され得ることがさらに検討される。ドナーテンプレートがもたらす標的配列の変更は、RNA誘導ヌクレアーゼ分子による切断に依存する。RNA誘導ヌクレアーゼ分子による切断は、二本鎖切断又は2つの一本鎖切断を含み得る。

【0244】

10

テンプレート核酸を使用して、H D Rによって野生型R H Oで置換され得る変異型R H O遺伝子としては、点変異、変異ホットスポット、又は配列挿入を含む変異型R H O遺伝子が挙げられる。一実施形態では、1つの二本鎖切断又は2つの一本鎖切断のいずれかによって、点変異又は変異ホットスポット（例えば、25、20、15、10又は5 b p未満などの約30 b p未満の変異ホットスポット）を有する変異型R H O遺伝子が改変（例えば、ロックアウト）され得る。一実施形態では、変異型R H O遺伝子は、点変異又は変異ホットスポット（例えば、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、400又は500 b pを超えるなどの、約30 b pを超える変異ホットスポット）を有し、又は挿入は、（1）単一の二本鎖切断、（2）2つの一本鎖切断、（3）切断が標的位置の両側で起こる2つの二本鎖切断、又は（4）1対の一本鎖切断が標的位置の両側で起こる4つの一本鎖切断によって改変（例えば、ロックアウト）され得る。

20

【0245】

H D Rによって改変（例えば、ロックアウト）され、テンプレート核酸で置換される変異型R H O遺伝子としては、例えば、P 2 3 H又はP 2 3 LなどのP 2 3、例えば、T 5 8 RなどのT 5 8、及び、例えば、P 3 4 7 T、P 3 4 7 A、P 3 4 7 S、P 3 4 7 G、P 3 4 7 L又はP 3 4 7 RなどのP 3 4 7などの表Aのものが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0246】

二本鎖切断媒介改変

一実施形態では、二本鎖切断は、RNA誘導ヌクレアーゼによって影響を受ける。特定の
実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼは、H N H様ドメインに関連する切断活性と、例えば、N - 末端R u v C様ドメインなどのR u v C様ドメインに関連する切断活性とを有する、例えば、野生型C a s 9などのC a s 9分子であってもよい。このような実施形態は、単一のg R N Aのみを必要とする。

30

【0247】

一本鎖切断媒介改変

別の実施形態では、2つの一本鎖切断、又はニックは、例えば、H N H様ドメインに関連した切断活性又はN末端R u v C様ドメインに関連した切断活性などのニッカーゼ活性を有する、C a s 9分子によって影響を受ける。このような実施形態は、各一本鎖切断の配置のために、2つのg R N Aを必要とする。一実施形態では、ニッカーゼ活性を有するC a s 9分子は、それにg R N Aがハイブリダイズする鎖を切断するが、それにg R N Aハイブリダイズする鎖と相補的な鎖は切断しない。一実施形態では、ニッカーゼ活性を有するC a s 9分子は、それにg R N Aがハイブリダイズする鎖を切断せず、むしろそれにg R N Aがハイブリダイズする鎖と相補的な鎖を切断する。

40

【0248】

一実施形態では、ニッカーゼはH N H活性を有し、例えば、R u v C活性を有するC a s 9分子、例えば、D 1 0 A変異などの変異をD 1 0に有するC a s 9分子が、不活性化される。D 1 0 AはR u v Cを不活性化し；したがって、C a s 9ニッカーゼはH N H活性（のみ）を有して、それにg R N Aがハイブリダイズする鎖（その上にN G G P A Mを有しない相補鎖）を切断する。別の実施形態では、例えば、H 8 4 0 AなどのH 8 4 0

50

変異を有する Cas 9 分子が、ニッカーゼとして使用され得る。H840A は HNH を不活性化し；したがって、Cas 9 ニッカーゼは RuvC 活性（のみ）を有して、非相補鎖（NGG PAM を有して、その配列が gRNA と同一である鎖）を切断する。

【0249】

ニッカーゼ及び2つの gRNA が使用されて、2つの一本鎖ニックが配置される一実施形態では、1つのニックは標的核酸の + 鎖上に、もう1つのニックは - 鎖上に配置される。PAM は、外側を向く。gRNA は、gRNA が、約 0 ~ 50、0 ~ 100、又は 0 ~ 200 ヌクレオチドによって隔てられるように、選択され得る。一実施形態では、2つの gRNA の標的化ドメインと相補的な標的ドメイン間には、重複がない。一実施形態では、gRNA は重複せず、50、100、又は 200 個程度のヌクレオチドによって隔てられる。一実施形態では、2つの gRNA の使用は、例えば、オフターゲット結合低下させることで、特異性を増大させ得る（Ran 2013）。

10

【0250】

一実施形態では、単一ニックを使用して、HDR が誘発され得る。単一ニックを使用して、所与の切断部位における HR と NHEJ との比率が増大され得ることが、本明細書で検討される。

【0251】

標的位置に対する二本鎖切断又は一本鎖切断の配置

鎖の1つ中の二本鎖切断又は一本鎖切断は、改変が起こるように、標的位置と十分に近くあるべきである。一実施形態では、距離は、50、100、200、300、350 又は 400 ヌクレオチド以下である。理論による拘束は望まないが、切断は、末端切除中にエキソヌクレアーゼ媒介除去を受ける領域内にあるように、標的位置と十分に近くあるべきであると考えられる。

20

【0252】

HDR 媒介置換を誘導する目的で、gRNA（単分子の（又はキメラ）又はモジュラー gRNA）及び gRNA 誘導ヌクレアーゼが二本鎖切断を誘導する一実施形態では、切断部位は、標的位置から 0 ~ 200 bp（例えば、0 ~ 175、0 ~ 150、0 ~ 125、0 ~ 100、0 ~ 75、0 ~ 50、0 ~ 25、25 ~ 200、25 ~ 175、25 ~ 150、25 ~ 125、25 ~ 100、25 ~ 75、25 ~ 50、50 ~ 200、50 ~ 175、50 ~ 150、50 ~ 125、50 ~ 100、50 ~ 75、75 ~ 200、75 ~ 175、75 ~ 150、75 ~ 125、75 ~ 100 bp）離れている。一実施形態では、切断部位は、標的位置から 0 ~ 100 bp（例えば、0 ~ 75、0 ~ 50、0 ~ 25、25 ~ 100、25 ~ 75、25 ~ 50、50 ~ 100、50 ~ 75 又は 75 ~ 100 bp）離れている。

30

【0253】

HDR 媒介置換を誘導する目的で、Cas 9 ニッカーゼと複合体形成する2つの gRNA（独立して、単分子（又はキメラ）又はモジュラー gRNA）が、2つの一本鎖切断を誘導する一実施形態では、より近いニックは、標的位置から 0 ~ 200 bp（例えば、0 ~ 175、0 ~ 150、0 ~ 125、0 ~ 100、0 ~ 75、0 ~ 50、0 ~ 25、25 ~ 200、25 ~ 175、25 ~ 150、25 ~ 125、25 ~ 100、25 ~ 75、25 ~ 50、50 ~ 200、50 ~ 175、50 ~ 150、50 ~ 125、50 ~ 100、50 ~ 75、75 ~ 200、75 ~ 175、75 ~ 150、75 ~ 125、75 ~ 100 bp）離れており、2つのニックは、理想的には、互いに 25 ~ 55 bp（例えば、25 ~ 50、25 ~ 45、25 ~ 40、25 ~ 35、25 ~ 30、30 ~ 55、30 ~ 50、30 ~ 45、30 ~ 40、30 ~ 35、35 ~ 55、35 ~ 50、35 ~ 45、35 ~ 40、40 ~ 55、40 ~ 50、40 ~ 45 bp）以内にあり、互いに 100 bp 以下離れている（例えば、互いに 90、80、70、60、50、40、30、20、10 又は 5 bp 以下離れている）。一実施形態では、切断部位は、標的位置から 0 ~ 100 bp（例えば、0 ~ 75、0 ~ 50、0 ~ 25、25 ~ 100、25 ~ 75、25 ~ 50、50 ~ 100、50 ~ 75 又は 75 ~ 100 bp）離れている。

40

50

【0254】

一実施形態では、例えば、独立して、単分子（又はキメラ）又はモジュラー gRNA である 2 つの gRNA は、二本鎖切断を標的位置の両側に配置させるように構成される。交互の実施形態では、例えば、独立して、単分子（又はキメラ）又はモジュラー gRNA である 3 つの gRNA は、二本鎖切断（すなわち、1 つの gRNA が Cas9 ヌクレアーゼと複合体形成する）と、2 つの一本鎖切断又は対での一本鎖切断（すなわち、2 つの gRNA が Cas9 ニッカーゼと複合体形成する）とが、標的位置の両側に配置されるように構成される。別の実施形態では、例えば、独立して、単分子（又はキメラ）又はモジュラー gRNA である 4 つの gRNA は、2 対の一本鎖切断（すなわち、2 対の 2 つの gRNA が Cas9 ニッカーゼと複合体形成する）が、標的位置の両側に生じるように構成される。二本鎖切断、又は対の 2 つの一本鎖ニックのより近い方は、理想的には、標的位置の 0 ~ 500 bp 以内（例えば、標的位置から 450、400、350、300、250、200、150、100、50 又は 25 bp 以下）にある。ニッカーゼが使用される場合、対の 2 つのニックは、互いに 25 ~ 55 bp 以内（例えば、25 ~ 50、25 ~ 45、25 ~ 40、25 ~ 35、25 ~ 30、50 ~ 55、45 ~ 55、40 ~ 55、35 ~ 55、30 ~ 55、30 ~ 50、35 ~ 50、40 ~ 50、45 ~ 50、35 ~ 45、又は 40 ~ 45 bp の間）であり、互いに 100 bp 以下（例えば、90、80、70、60、50、40、30、20 又は 10 bp 以下）離れている。

10

【0255】

相同性アームの長さ

20

相同性アームは、例えば、切除された一本鎖オーバーハングが、ドナーテンプレート内に相補領域を見つけられるように、少なくとも末端切除が起こってもよい領域にまで伸びるべきである。全長は、プラスミドサイズ又はウイルスパッケージング限界などのパラメータによって制限され得る。一実施形態では、相同性アームは、例えば、ALU 反復、LINE 反復などの反復要素中には及ばない。

【0256】

代表的な相同性アーム長としては、少なくとも 50、100、250、500、750 又は 1000 ヌクレオチドが挙げられる。

【0257】

標的位置は、本明細書の用法では、Cas9 分子依存過程によって修飾される、標的核酸（例えば、RHO 遺伝子）上の部位を指す。例えば、標的位置は、例えば、標的位置の改変などの標的核酸の修飾 Cas9 分子切断、及びテンプレート核酸指向修飾であり得る。一実施形態では、標的位置は、例えば、その中に 1 つ又は複数のヌクレオチドが付加される、標的核酸上の隣接するヌクレオチドなどの 2 ヌクレオチド間の部位であり得る。標的位置は、テンプレート核酸によって、例えば、ロックアウトなどの改変を受けた 1 つ又は複数のヌクレオチドを含んでもよい。一実施形態では、標的位置は、標的ドメイン（例えば、それに gRNA が結合する配列）内にある。一実施形態では、標的位置は、標的ドメイン（例えば、gRNA が結合する配列）の上流又は下流にある。

30

【0258】

テンプレート核酸は、本明細書での用法では、gRNA 誘導ヌクレアーゼ分子及び gRNA 分子と併用して、標的位置の構造が改変され得る核酸配列を指す。一実施形態では、標的核酸は、典型的に、切断部位の又はその近くのテンプレート核酸配列の一部又は全部を有するように修飾される。一実施形態では、テンプレート核酸は一本鎖である。交互の実施形態では、テンプレート核酸は二本鎖である。一実施形態では、テンプレート核酸は、例えば、二本鎖 DNA などの DNA である。交互の実施形態では、テンプレート核酸は一本鎖 DNA である。一実施形態では、テンプレート核酸は、例えば、AAV ゲノム、プラスミド DNA などの、Cas9 及び gRNA と同じベクター骨格上でコード化されている。一実施形態では、テンプレート核酸は、生体内でベクター骨格から切除され、例えば、それは、gRNA 認識配列で挟まれている。

40

【0259】

50

一実施形態では、テンプレート核酸は、相同指向修復事象に関与することで、標的位置の構造を変化させる。一実施形態では、テンプレート核酸は、標的位置の配列を変化させる。一実施形態では、テンプレート核酸は、標的核酸への修飾された又は非天然起源の塩基の組み込みをもたらす。

【0260】

典型的に、テンプレート配列は、標的配列との切断媒介組換え又は触媒組換えを受ける。一実施形態では、テンプレート核酸は、e a C a s 9 媒介切断事象によって切断される、標的配列上の部位に対応する配列を含む。一実施形態では、テンプレート核酸は、第1のC a s 9 媒介事象において切断される標的配列上の第1の部位と、第2のC a s 9 媒介事象において切断される標的配列上の第2の部位との双方に対応する配列を含む。

10

【0261】

一実施形態では、テンプレート核酸は、翻訳配列のコード配列に改変をもたらす配列、例えば、タンパク質生成物中の1つのアミノ酸の別のアミノ酸による置換をもたらすもの、例えば、変異対立遺伝子を野生型対立遺伝子に形質転換する、野生型対立遺伝子を変異対立遺伝子に形質転換する、及び/又は停止コドン、アミノ酸残基挿入、アミノ酸残基の欠失、又はナンセンス変異を導入する配列を含み得る。

【0262】

別の実施形態では、テンプレート核酸は、例えば、エクソンの改変、又は5'又は3'非翻訳又は非転写領域の改変などの改変を非コード配列にもたらす配列を含み得る。このような変更としては、例えば、プロモーター、エンハンサーなどの制御要素の改変、及びシス作用性又はトランス作用性制御要素の改変が挙げられる。

20

【0263】

R H O 遺伝子中の標的位置と相同性を有するテンプレート核酸を使用して、標的配列の構造が改変され得る。テンプレート配列を使用して、例えば、望まれない又は変異ヌクレオチドなどの望まれない構造が改変され得る。

【0264】

テンプレート核酸は、以下の構成要素を含む。

[5' 相同性アーム] - [置換配列] - [3' 相同性アーム]

【0265】

相同性アームは、染色体中への組換えを提供し、したがって例えば、シグネチャの変異などの望まれない要素を、置換配列で置換する。一実施形態では、相同性アームは、ほとんどの遠位切断部位の側面に位置する。

30

【0266】

一実施形態では、5' 相同性アームの3' 末端は、置換配列の5' 末端の隣の位置である。

一実施形態では、5' 相同性アームは、置換配列5' 末端から5' に少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、又は2000ヌクレオチドにわたり延長し得る。

【0267】

一実施形態では、3' 相同性アームの5' 末端は、置換配列の3' 末端の隣の位置である。

一実施形態では、3' 相同性アームは、置換配列3' 末端から3' に少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、又は2000ヌクレオチドにわたり延長され得る。

40

【0268】

例示的なテンプレート核酸

例示的なテンプレート核酸（本明細書ではドナーコンストラクトとも称される）は、R H O 遺伝子の1つ又は複数のヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、テンプレート核酸は、R H O c D N A 分子を含む。特定の実施形態では、テンプレート核酸配列は、g R N A 分子とのハイブリッド形成に耐性があるようにコドン修飾されてもよい。

【0269】

以下の表7は、例示的なテンプレート核酸を提供する。一実施形態では、テンプレート核

50

酸は、表 7 からの行の 5' 相同性アーム及び 3' 相同性アームを含む。その他の実施形態では、第 1 列からの 5' 相同性アームは、表 7 からの 3' 相同性アームと組み合わせられ得る。各実施形態において、5' 及び 3' 相同性アームの組合せは、例えば、シトシン (C) 残基などの置換配列を含む。

【 0 2 7 0 】

【 表 7 - 1 】

表 7

5'相同性アーム(配列番号 5'Hからのヌクレオチドの数、配列番号 5'Hの 3'末端から始まる)	置換配列=C	3' 相同性アーム(配列番号 3'Hからのヌクレオチドの数、配列番号 3'Hの 5'末端から始まる)
10 以上		10 以上
20 以上		20 以上
50 以上		50 以上
100 以上		100 以上
150 以上		150 以上
200 以上		200 以上
250 以上		250 以上
300 以上		300 以上
350 以上		350 以上
400 以上		400 以上
450 以上		450 以上
500 以上		500 以上
550 以上		550 以上
600 以上		600 以上
650 以上		650 以上
700 以上		700 以上
750 以上		750 以上
800 以上		800 以上
850 以上		850 以上
900 以上		900 以上

【 0 2 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

1000 以上		1000 以上
1100 以上		1100 以上
1200 以上		1200 以上
1300 以上		1300 以上
1400 以上		1400 以上
1500 以上		1500 以上
1600 以上		1600 以上
1700 以上		1700 以上
1800 以上		1800 以上
1900 以上		1900 以上
1200 以上		1200 以上
少なくとも 50 であるが、繰り返される要素を含むほどの長さではない。		少なくとも 50 であるが、繰り返される要素を含むほどの長さではない。
少なくとも 100 であるが、繰り返される要素を含むほどの長さではない。		少なくとも 100 であるが、繰り返される要素を含むほどの長さではない。
少なくとも 150 であるが、繰り返される要素を含むほどの長さではない。		少なくとも 150 であるが、繰り返される要素を含むほどの長さではない。
5～100 ヌクレオチド		5～100 ヌクレオチド
10～150 ヌクレオチド		10～150 ヌクレオチド
20～150 ヌクレオチド		20～150 ヌクレオチド

10

20

30

【 0 2 7 2 】

ゲノム編集法における gRNA の例

本明細書に記載されるような gRNA 分子を二本鎖切断又は一本鎖切断を生成する RNA 誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、Cas9 又は Cpf1 分子）と共に使用して、例えば、標的位置又は標的遺伝子シグネチャなどの標的核酸の配列が改変され得る。熟練した技術者であれば、本開示に基づいて本明細書で開示される方法及び治療様式と併せて使用され得る、追加的な適切な gRNA 分子を確認できるであろう。適切な gRNA 分子としては、限定されないが、そのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される、米国特許出願公開第 2017/0073674 号明細書（A1）、及び国際公開第 2017/165862 号（A1）に記載されているものが挙げられる。

40

【 0 2 7 3 】

VI. 標的細胞

RNA 誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、Cas9 分子又は Cpf1 分子）と、例えば、Cas9 分子又は Cpf1 分子 / gRNA 分子などの gRNA 分子との複合体を使用して、多種多様な細胞において、例えば、標的核酸を編集するなど、細胞が操作され得る。

【 0 2 7 4 】

50

いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、本明細書に記載されるように、1つ又は複数の標的遺伝子を編集する（例えば、改変する）ことによって操作される。いくつかの実施形態では、1つ又は複数の標的遺伝子（例えば、本明細書に記載される1つ又は複数の標的遺伝子）の発現が、例えば、生体内で調節される。その他の実施形態では、1つ又は複数の標的遺伝子（例えば、本明細書に記載される1つ又は複数の標的遺伝子）の発現が、例えば、生体外で調節される。

【0275】

本明細書に記載のRNA誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、Cas9又はCpf1分子）、gRNA分子、及びRHO cDNA分子は、標的細胞に送達され得る。一実施形態では、標的細胞は、例えば、光受容体細胞などの、例えば、網膜細胞などの、眼からの細胞である。一実施形態では、標的細胞は、錐体光受容体細胞又は円錐細胞である。一実施形態では、標的細胞は、桿体光受容体細胞又は桿体細胞である。一実施形態では、標的細胞は、黄斑錐体光受容体細胞である。例示的な実施形態では、網膜黄斑中の錐体光受容体が標的化され、すなわち、網膜黄斑中の錐体光受容体が標的細胞である。

10

【0276】

適切な細胞としてはまた、例として、胚性幹細胞、誘導万能性幹細胞、造血幹細胞、神経細胞幹細胞、及び間葉系幹細胞などの幹細胞も挙げられ得る。一実施形態では、細胞は、変異型RHO遺伝子を改変（例えば、ノックアウト）し、外因性RHO cDNAを細胞に送達し、例えば、網膜光受容体などの、網膜前駆細胞又は網膜細胞に分化するように修飾された、誘導多能性幹細胞（iPS）細胞、又は例えば、対象から生成されたiPS細胞などのiPS細胞に由来する細胞であり、例えば、網膜の黄斑下領域などの、例えば、網膜下において、対象の眼に注射される。

20

【0277】

VII. 送達、調合、及び投与経路

例えば、RNA誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、Cas9又はCpf1分子）、gRNA分子、及びRHO cDNA分子などの構成要素は、様々な形態で送達又は製剤化され得て、例えば、表8～9を参照されたい。一実施形態では、1つのRNA誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、Cas9又はCpf1分子）、1つ又は複数の（例えば、1、2、3、4つ以上の）gRNA分子、及びRHO cDNA分子の配列が、AAVベクターによって送達される。一実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、Cas9又はCpf1分子）をコード化する配列、1つ又は複数の（例えば、1、2、3、4つ以上の）gRNA分子をコード化する配列、及びRHO cDNA分子の配列は、例えば、AAVベクターなどの同一核酸分子上に存在する。一実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、Cas9又はCpf1分子）をコード化する配列は、例えば、AAVベクターなどの第1の核酸分子上に存在し、1つ又は複数の（例えば、1、2、3、4つ以上の）gRNA分子をコード化する配列、及びRHO cDNA分子の配列は、例えば、AAVベクターなどの第2の核酸分子上に存在する。一実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、Cas9又はCpf1分子）をコード化する配列は、例えば、AAVベクターなどの第1の核酸分子上に存在し、1つ又は複数の（例えば、1、2、3、4つ以上の）gRNA分子をコード化する配列は、例えば、AAVベクターなどの第2の核酸分子上に存在し、RHO cDNA分子の配列は、例えば、AAVベクターなどの第3の核酸分子上に存在する。

30

40

【0278】

RNA誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、Cas9又はCpf1分子）、gRNA、又はRHO cDNA構成要素がDNA中にコード化されて送達される場合、DNAは典型的に例えば、プロモーターを含む制御領域を含み、発現をもたらす。RNA誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、Cas9又はCpf1分子）配列のための有用なプロモーターとしては、CMV、EF5、EF-1a、MSCV、PGK、CAG、hGRK1、hCRX、hNRL、及びhRCVRN対照プロモーターが挙げられる。gRNAのための有用なプロモーターとしては、H1、EF-1a、及びU6プロモーターが挙げられる。RHO cD

50

NA配列のための有用なプロモーターとしては、CMV、EF5、EF-1a、MSCV、PGK、CAG、hGRK1、hCRX、hNRL、及びhRCVRN対照プロモーターが挙げられる。特定の実施形態では、RHO cDNA及びRNA誘導ヌクレアーゼ分子配列のための有用なプロモーターとしては、RHOプロモーター配列が挙げられる。特定の実施形態では、RHOプロモーター配列は、最小RHOプロモーター配列であってもよい。特定の実施形態では、最小RHOプロモーター配列は、配列番号44に記載される配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、最小RHOプロモーターは、例えば、RHO転写開始部位から最大3000bp上流の領域などの、100bp以下、200bp以下、250bp以下、300bp以下、400bp以下、500bp以下、600bp以下、700bp以下、800bp以下、900bp以下、又は1000bp以下の内在性RHOプロモーター領域を含む。いくつかの実施形態では、最小RHOプロモーターは、内在性RHO遺伝子の転写開始部位に近接する、100bp以下、200bp以下、250bp以下、300bp以下、400bp以下、500bp以下、又は600bp以下の配列と、RHOプロモーターの遠位エンハンサー領域、又はその断片とを含む。特定の実施形態では、最小RHO cDNAプロモーターは、桿体特異的プロモーターであってもよい。特定の実施形態では、RHO cDNAプロモーターは、ヒトオプシンプロモーターであってもよい。本明細書で提供される方法、組成物、及び治療様式の文脈での使用に適したRHOプロモーター、及び操作されたプロモーター変異型としては、例えば、そのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される、Pellissier 2014に記載されるもの；及び国際特許出願第PCT/NL2014/050549号明細書、同第PCT/US2016/050809号明細書、及び同第PCT/US2016/019725号明細書に記載されるものが挙げられる。

【0279】

一実施形態では、プロモーターは、構成的プロモーターである。別の実施形態では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。同様の又は異なる強度があるプロモーターを選択して、構成要素の発現が調整され得る。RNA誘導ヌクレアーゼ分子をコード化する配列は、例えば、SV40 NLSなどの核局在化シグナル(NLS)を含み得る。一実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼ分子をコード化する配列は、少なくとも2つの核局在化シグナルを含む。一実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼ分子、gRNA分子、又はRHO cDNA分子のためのプロモーターは、独立して、誘導性、組織特異的、又は細胞特異的であり得る。RNA誘導ヌクレアーゼの発現を検出するために、アフィニティタグが使用され得る。有用なアフィニティタグ配列としては、これらに限定されるものではないが、3xFLAGタグ、単一FLAGタグ、HAタグ、Mycタグ又はHISタグが挙げられる。例示的なアフィニティタグ配列は、表12で開示される。例えば、哺乳類細胞においてRNA誘導ヌクレアーゼ発現を調節するために、ポリアデニル化シグナル(ポリ(A)シグナル)が使用され得る。例示的なポリアデニル化シグナルは、表13で開示される。

【0280】

表8は、構成要素が標的細胞に送達され得る形態の例を提供する。

【0281】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表 8

要素			
RNA 誘導 ヌクレアーゼ 分子	gRNA 分子	<i>RHO</i> cDNA	コメント
DNA	DNA	DNA	この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼ及び gRNA は、DNA から転写される。この実施形態では、それらは別個の分子上でコード化される。この実施形態では、 <i>RHO</i> cDNA は別個の DNA 分子として提供される。
DNA	DNA		この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼ及び gRNA は、DNA から転写される。この実施形態では、それらは別個の分子上でコード化される。この実施形態では、gRNA をコードするのと同じ DNA 分子上に、 <i>RHO</i> cDNA が提供される。
DNA		DNA	この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼ及び gRNA は、DNA から、ここでは単一分子から転写される。この実施形態では、 <i>RHO</i> cDNA は別個の DNA 分子として提供される。
DNA	DNA	DNA	この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼ及び gRNA は、DNA から転写される。この実施形態では、それらは別個の分子上でコード化される。この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼをコードするのと同じ DNA 分子上に、 <i>RHO</i> cDNA が提供される。
DNA	RNA	DNA	この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼは DNA から転写され、gRNA は生体外で転写又は合成された RNA として提供される。この実施形態では、 <i>RHO</i> cDNA は別個の DNA 分子として提供される。

10

20

30

【 0 2 8 2 】

40

50

【表 8 - 2】

DNA	RNA	DNA	この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼは DNA から転写され、gRNA は生体外で転写又は合成された RNA として提供される。この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼをコードするのと同じ DNA 分子上に、 <i>RHO</i> cDNA が提供される。
mRNA	RNA	DNA	この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼは生体外で転写された mRNA から翻訳され、gRNA は生体外で転写又は合成された RNA として提供される。この実施形態では、 <i>RHO</i> cDNA は DNA 分子として提供される。
mRNA	DNA	DNA	この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼは生体外で転写された mRNA から翻訳され、gRNA は DNA から転写される。この実施形態では、 <i>RHO</i> cDNA は別個の DNA 分子として提供される。
mRNA	DNA		この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼは生体外で転写された mRNA から翻訳され、gRNA は DNA から転写される。この実施形態では、gRNA をコードするのと同じ DNA 分子上に、 <i>RHO</i> cDNA が提供される。
タンパク質	DNA	DNA	この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼはタンパク質として提供され、gRNA は DNA から転写される。この実施形態では、 <i>RHO</i> cDNA は別個の DNA 分子として提供される。
タンパク質	DNA		この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼはタンパク質として提供され、gRNA は DNA から転写される。この実施形態では、gRNA をコードするのと同じ DNA 分子上に、 <i>RHO</i> cDNA が提供される。
タンパク質	RNA	DNA	この実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼはタンパク質として提供され、gRNA は転写又は合成 RNA として提供される。この実施形態では、 <i>RHO</i> cDNA は DNA 分子として提供される。

10

20

30

【0283】

表 9 は、例えば、Cas9 又は Cpf1 分子構成要素、gRNA 分子構成要素、及び本明細書に記載の *RHO* cDNA 分子構成要素などの、RNA 誘導ヌクレアーゼシステムの構成要素のための様々な送達方法を要約する。

【0284】

40

50

【表 9】

表 9

送達ベクター/様式		非分裂細胞内への送達	発現持続時間	ゲノム組み込み	送達分子のタイプ
物理的 (例えば、電気穿孔、粒子銃、リン酸カルシウム形質移入)		あり	一過性	なし	核酸及びタンパク質
ウイルス	レトロウイルス	なし	安定	あり	RNA
	レンチウイルス	あり	安定	修飾あり/なし	RNA
	アデノウイルス	あり	一過性	なし	DNA
	アデノ随伴ウイルス(AAV)	あり	安定	なし	DNA
	ワクシニアウイルス	あり	非常に一過性	なし	DNA
	単純ヘルペスウイルス	あり	安定	なし	DNA
非ウイルス	カチオン性リボソーム	あり	一過性	送達物に依存する	核酸及びタンパク質
	ポリマーナノ粒子	あり	一過性	送達物に依存する	核酸及びタンパク質
生物学的非ウイルス送達 ビヒクル	弱毒化細菌	あり	一過性	なし	核酸
	操作されたバクテリオファージ	あり	一過性	なし	核酸
	哺乳類ウイルス様粒子	あり	一過性	なし	核酸
	生物学的リボソーム: 赤血球ゴースト及びエキソソーム	あり	一過性	なし	核酸

10

20

30

【0285】

表10は、RNA誘導ヌクレアーゼ(例えば、Cas9又はCpf1)発現のために、AAVベクターで使用され得る、例示的なプロモーター配列を記載する。

【0286】

40

50

【表 10 - 1】

表 10 RNA 誘導ヌクレアーゼプロモーター配列

プロモーター	長さ(bp)	DNA 配列
CMV	617	CATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCT GGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTC AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAG GGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTA CGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTA TCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTAC ATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGC GGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG TTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT TGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATC AACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCC CCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTG GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACC GTCAGATCCGCTAGAGATCCGC (配列番号 45)
EFS	252	TCGAGTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG CACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAG GGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGG CGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTG GCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGT ATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTCTTTTT CGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTGTCGTG ACCGCGG (配列番号 46)
ヒト GRK1 (ロドブシンキナーゼ)	292	GGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCTTCTC AGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGAGGAAGGGG CCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCCAAGCAGCT CAGGGGATTGTCTTTTTCTAGCACCTTCTTGCCAC TCCTAAGCGTCCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTTT GCCTGGTGCTGTGTCAGCCCCGGTCTCCAGGGGC TTCCCAGTGGTCCCCAGGAACCTCGACAGGGCCC GGTCTCTCTCGTCCAGCAAGGGCAGGGACGGGCCA CAGGCCAAGGGC (配列番号 47)
ヒト CRX (錐体桿体 ホメオボックス転写 因子)	113	GCCTGTAGCC TTAATCTCTC CTAGCAGGGG GTTTGGGGGA GGGAGGAGGA GAAAGAAAGG GCCCCTTATG GCTGAGACAC AATGACCCAG CCACAAGGAG GGATTACCGG GCG (配列番号 48)

【0287】

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 2】

ヒト NRL (神経網膜ロイシンジッパー転写因子は、ヒト TK 末端プロモーターの上流を増強する)	281	AGGTAGGAAG TGGCCTTTAA CTCCATAGAC CCTATTTTAAA CAGCTTCGGA CAGGTTTAAA CATCTCCTTG GATAATTCCT AGTATCCCTG TTCCCACTCC TACTCAGGGA TGATAGCTCT AAGAGGTGTT AGGGGATTAG GCTGAAAATG TAGGTCACCC CTCAGCCATC TGGGAACTAG AATGAGTGAG AGAGGAGAGA GGGGCAGAGA CACACACATT CGCATATTAA GGTGACGCGT GTGGCCTCGA ACACCGAGCG ACCCTGCAGC GACCCGCTTA A (配列番号 49)
ヒト RCVRN (リカバリン)	235	ATTTTAAATCT CACTAGGGTT CTGGGAGCAC CCCCCCCCAC CGCTCCCGCC CTCCACAAAG CTCCTGGGCC CCTCCTCCCT TCAAGGATTG CGAAGAGCTG GTCGCAAATC CTCCTAAGCC ACCAGCATCT CGGTCTTCAG CTCACACCAG CCTTGAGCCC AGCCTGCGGC CAGGGGACCA CGCACGTCCC ACCCACCAG CGACTCCCCA GCCGCTGCCC ACTCTTCCTC ACTCA (配列番号 50)
ヒトロドプシンプロモーター	516	CCACGTCAGA ATCAAACCCT CACCTTAACC TCATTAGCGT TGGGCATAAT CACCAGGCCA AGCGCCTTAA ACTACGAGAG GCCCATCCCC ACCCGCCCTG CCTTAGCCCT GCCACGTGTG CCAAACGCTG TTAGACCCAA CACCACCCAG GCCAGGTAGG GGGCTGGAGC CCAGGTGGGC ATTTGAGTCA CCAACCCCCA GGCAGTCTCC CTTTTCCTGG ATCCTGAGTA CCTCTCCTCC CTGACCTCAG GCTTCCTCCT AGTGTACACT TGGCCCTCT TAGAAGCCAA TTAGGCCCTC AGTTTCTGCA GCGGGGATTA ATATGATTAT GAACACCCCC AATCTCCAG ATGCTGATTG AGCCAGGAGC TTAGGAGGGG GAGGTCACTT TATAAGGGTC TGGGGGGGTC AGAACCAGAG GTCATCCAGC TGGAGCCCTG AGTGGCTGAG CTCAGGCCTT CGCAGCATTC TTGGGTGGGA GCAGCCACGG GTCAGCCACA AGGGCCACCA CCATGG (配列番号 43)
最小ヒトロドプシンプロモーター	249	GTCACCTTGGCCCCCTCTTAGAAGCCAATTAGGCC TCAGTTTCTGCAGCGGGGATTAATATGATTATGAA CACCCCCAATCTCCAGATGCTGATTAGCCAGGA GCTTAGGAGGGGAGGTCACTTTATAAGGGTCTGG GGGGGTCAGAACCCAGAGTCATCCAGCTGGAGCCC TGAGTGGCTGAGCTCAGGCCTTCGCAGCATTCCTG GGTGGGAGCAGCCACGGGTCAGCCACAAGGGCCAC AGCC (配列番号 44)

10

20

30

40

【0288】

表 1 1 は、RHO cDNA の AAV ベクターで使用され得る、例示的なプロモーター配列を記載する。

【0289】

50

【表 1 1 - 1】

表 11 *RHO* cDNA プロモーター配列

プロモーター	長さ(bp)	DNA 配列
CMV	617	CATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTA CGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCG CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGA CCGCCCAACGACCCCGCCCATGACGTCAATAATGA CGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCA TTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCC CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA TTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG GCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGT CTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGC ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTGAACAA CTCGCCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTA CGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGA ACCGTCAGATCCGCTAGAGATCCGC (配列番号 45)
EFS	252	TCGAGTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCA CATCGCCACAGTCCCGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGT CGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGG GTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCC TTTTTCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGC AGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTT GCCGCCAGAACACAGGTGTCGTGACCGCGG (配列番号 46)
ヒト GRK1 (ロド プシンキナーゼ)	292	GGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCTTCTCAG GGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGGAGGAAGGGGCCGG GCAGAATGATCTAATCGGATTCCAAGCAGCTCAGGGG ATTGTCTTTTTCTAGCACCTTCTTGCCACTCCTAAGC GTCCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTTGCGCTGGTGCT GTGTGAGCCCCGGTCTCCAGGGGCTTCCAGTGCTG CCCAGGAACCCTCGACAGGGCCCGGTCTCTCTCGTCC AGCAAGGGCAGGGACGGGCCACAGGCCAAGGGC (配列番号 47)
ヒト CRX (錐体 桿体ホメオボックス 転写因子)	113	GCCTGTAGCC TTAATCTCTC CTAGCAGGGG GTTTGGGGGA GGGAGGAGGA GAAAGAAAGG GCCCCTTATG GCTGAGACAC AATGACCCAG CCACAAGGAG GGATTACCGG GCG (配列番号 48)
ヒト NRL (神経 網膜ロイシンジッ パー転写因子 は、ヒト TK 末端 プロモーターの 上流を増強 する)	281	AGGTAGGAAG TGGCCTTTAA CTCCATAGAC CCTATTTAAA CAGCTTCGGA CAGGTTTAAA CATCTCCTTG GATAATTCCT AGTATCCCTG TTCCCACTCC TACTCAGGGA TGATAGCTCT AAGAGGTGTT AGGGGATTAG GCTGAAAATG TAGGTCACCC CTCAGCCATC TGGGAACCTAG AATGAGTGAG AGAGGAGAGA GGGGCAGAGA CACACACATT CGCATATTAA GGTGACGCGT GTGGCCTCGA ACACCGAGCG ACCCTGCAGC GACCCGCTTA A (配列番号 49)

【 0 2 9 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

ヒト RCVRN (リカバリン)	235	ATTTTAATCT CACTAGGGTT CTGGGAGCAC CCCCCCCCAC CGCTCCCGCC CTCCACAAAG CTCCTGGGCC CCTCCTCCCT TCAAGGATTG CGAAGAGCTG GTCGCAAATC CTCCTAAGCC ACCAGCATCT CGGTCTTCAG CTCACACCAG CCTTGAGCCC AGCCTGCGGC CAGGGGACCA CGCACGTCCC ACCCACCCAG CGACTCCCCA GCCGCTGCCC ACTCTTCCTC ACTCA (配列番号 50)
ヒトロドプシン プロモーター	516	CCACGTCAGA ATCAAACCCT CACCTTAACC TCATTAGCGT TGGGCATAAT CACCAGGCCA AGCGCCTTAA ACTACGAGAG GCCCCATCCC ACCCGCCCTG CCTTAGCCCT GCCACGTGTG CCAAACGCTG TTAGACCCAA CACCACCCAG GCCAGGTAGG GGGCTGGAGC CCAGGTGGGC ATTTGAGTCA CCAACCCCCA GGCAGTCTCC CTTTTCCTGG ATCCTGAGTA CCTCTCCTCC CTGACCTCAG GCTTCCTCCT AGTGTACCT TGGCCCCCTCT TAGAAGCCAA TTAGGCCCTC AGTTTCTGCA GCGGGGATTA ATATGATTAT GAACACCCCC AATCTCCCAG ATGCTGATT AGCCAGGAGC TTAGGAGGGG GAGGTCATT TATAAGGGTC TGGGGGGGTC AGAACCCAGA GTCATCCAGC TGGAGCCCTG AGTGGCTGAG CTCAGGCCTT CGCAGCATTC TTGGGTGGGA GCAGCCACGG GTCAGCCACA AGGGCCACCA CCATGG (配列番号 43)
最小ヒトロドプシ ンプロモーター	249	GTCACCTTGCCCCCTCTTAGAAGCCAATTAGGCCCTC AGTTTCTGCAGCGGGGATTAATATGATTATGAACACC CCCAATCTCCCAGATGCTGATTAGCCAGGAGCTTAG GAGGGGGAGGTCACCTTTATAAGGGTCTGGGGGGGTCA GAACCCAGAGTCATCCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTG AGCTCAGGCCTTCGCAGCATTCCTTGGGTGGGAGCAGC CACGGGTCAGCCACAAGGGCCACAGCC (配列番号 44)

10

20

30

【 0 2 9 1 】

表 1 2 は、RNA 誘導ヌクレアーゼ（例えば、Cas9 又は Cpf1）発現のために、AAV ベクターで使用され得る、例示的なアフィニティタグ配列を記載する。

【 0 2 9 2 】

【表 1 2】

表 12 例示的なアフィニティタグ配列

アフィニティタグ	アミノ酸配列
3XFlag タグ	DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK (配列番号 51)
Flag タグ (単一)	DYKDDDDK (配列番号 52)
HA タグ	YPYDVPDYA (配列番号 53)
Myc タグ	EQKLISEEDL (配列番号 54)
HIS タグ	HHHHHH (配列番号 55)

40

【 0 2 9 3 】

表 1 3 は、例えば、RNA 誘導ヌクレアーゼ（例えば、Cas9 又は Cpf1）発現のために、AAV ベクターで使用され得る、例示的なポリアデニル化（ポリ A）配列を記載する。

【 0 2 9 4 】

50

【表 13】

表 13 例示的なポリ A 配列

ポリ A	DNA 配列
ミニポリ A	TAGCAATAAA GGATCGTTTA TTTTCATTGG AAGCGTGTGT TGGTTTTTTG ATCAGGCGCG (配列番号 56)
bGH ポリ A	GCTGCAGGAT GACCGGTCAT CATCACCATC ACCATTGAGT TTAAACCCGC TGATCAGCCT CGACTGTGCC TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCCC CTCCCCCGTG CCTTCCTTGA CCCTGGAAGG TGCCACTCCC ACTGTCCTTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACA (配列番号 57)
SV40 ポリ A	ATGCTTTATT TGTGAAATTT GTGATGCTAT TGCTTTATTT GTAACCATTA TAAGCTGCAA TAAACAAGTT AACAACAACA ATTGCATTCA TTTTATGTTT CAGGTTTCAGG GGGAGGTGTG GGAGGTTTTT TAAA (配列番号 58)

10

20

【0295】

表 14 は、AAV ベクターで使用され得る例示的な逆方向末端反復 (ITR) 配列を記載する。

【0296】

30

40

50

【表 14 - 1】

表 14 例示的な AAV 血清型からの ITR の配列

AAV 血清型	左 ITR 配列	右 ITR 配列
AAV1	TTGCCCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG CTCGGTGGGG CCTGCGGACC AAAGGTCCGC AGACGGCAGA GCTCTGCTCT GCCGGCCCCA CCGAGCGAGC GAGCGCGCAG AGAGGGAGTG GGCAACTCCA TCACTAGGGG TAA (配列番号 59)	TTACCCCTAG TGATGGAGTT GCCCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT CGGTGGGGCC GGCAGAGCAG AGCTCTGCCG TCTGCGGACC TTTGGTCCGC AGGCCCCACC GAGCGAGCGA GCGCGCAGAG AGGGAGTGCG CAA (配列番号 68)
AAV2	TTGGCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG CTCACTGAGG CCGGGCGACC AAAGGTGCGC CGACGCCCCG GCTTTGCCCC GGCGGCCTCA GTGAGCGAGC GAGCGCGCAG AGAGGGAGTG GCCAACTCCA TCACTAGGGG TTCCT (配列番号 60)	AGGAACCCCT AGTGATGGAG TTGGCCACTC CCTCTCTGCG CGCTCGCTCG CTCACTGAGG CCGCCCCGGC AAAGCCCCGG CGTCGGGCGA CCTTTGGTCC CCCGGCCCTCA GTGAGCGAGC GAGCGCGCAG AGAGGGAGTG GCCAA (配列番号 69)
AAV3B	TGGCCACTCC CTCTATGCGC ACTCGCTCGC TCGGTGGGGC CTGGCGACCA AAGGTCGCCA GACGGACGTG CTTTGCACGT CCGGCCCCAC CGAGCGAGCG AGTGCGCATA GAGGGAGTGG CCAACTCCAT CACTAGAGGT AT (配列番号 61)	ATACCTCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTATGCGCA CTCGCTCGCT CGGTGGGGCC GGACGTGCAA AGCACGTCCG TCTGGCGACC TTTGGTCCGC AGGCCCCACC GAGCGAGCGA GTGCGCATAG AGGGAGTGCG CA (配列番号 70)
AAV4	TTGGCCACTC CCTCTATGCG CGCTCGCTCA CTCACTCGGC CCTGGAGACC AAAGGTCTCC AGACTGCCGG CCTCTGGCCG GCAGGGCCGA GTGAGTGAGC GAGCGCGCAT AGAGGGAGTG GCCAACTCCA TCATCTAGGT TTGCCC (配列番号 62)	GGGCAAACCT AGATGATGGA GTTGGCCACT CCCTCTATGC GCGCTCGCTC ACTCACTCGG CCCTGCCGGC CAGAGGCCGG CAGTCTGGAG ACCTTTGGTC TCCAGGGCCG AGTGAGTGAG CGAGCGCGCA TAGAGGGAGT GGCCAA (配列番号 71)
AAV5	CTCTCCCCC TGTCGCGTTC GCTCGCTCGC TGGCTCGTTT GGGGGGGTGG CAGCTCAAAG AGCTGCCAGA CGACGGCCCT CTGGCCGTCG CCCCCCAA CGAGCCAGCG AGCGAGCGAA CGCGACAGGG GGGAGAGTGC CACACTCTCA AGCAA (配列番号 63)	TTGCTTGAGA GTGTGGCACT CTCCCCCCTG TCGCGTTCGC TCGCTCGCTG GCTCGTTTGG GGGGGCGACG GCCAGAGGGC CGTCGTCTGG CAGCTCTTTG AGCTGCCACC CCCCCAAACG AGCCAGCGAG CGAGCGAACG CGACAGGGGG GAGAG (配列番号 72)

10

20

30

40

【 0 2 9 7 】

50

【表 1 4 - 2】

AAV6	ATACCCCTAG TGATGGAGTT GCCCACTCCC TCTATGCGCG CTCGCTCGCT CGGTGGGGCC GGCAGAGCAG AGCTCTGCCG TCTGCGGACC TTTGGTCCGC AGGCCCCACC GAGCGAGCGA GCGCGCATAG AGGGAGTGGG CAA (配列番号 64)	TTGCCCACTC CCTCTATGCG CGCTCGCTCG CTCGGTGGGG CCTGCGGACC AAAGGTCCGC AGACGGCAGA GCTCTGCTCT GCCGGCCCCA CCGAGCGAGC GAGCGCGCAT AGAGGGAGTG GGCAACTCCA TCACTAGGGG TAT (配列番号 73)
AAV7	TTGGCCACTC CCTCTATGCG CGCTCGCTCG CTCGGTGGGG CCTGCGGACC AAAGGTCCGC AGACGGCAGA GCTCTGCTCT GCCGGCCCCA CCGAGCGAGC GAGCGCGCAT AGAGGGAGTG GCCAACTCCA TCACTAGGGG TACCG (配列番号 65)	CGGTACCCCT AGTGATGGAG TTGGCCACTC CCTCTATGCG CGCTCGCTCG CTCGGTGGGG CCGGCAGAGC AGAGCTCTGC CGTCTGCGGA CCTTTGGTCC GCAGGCCCCA CCGAGCGAGC GAGCGCGCAT AGAGGGAGTG GCCAA (配列番号 74)
AAV8	CAGAGAGGGA GTGGCCAACT CCATCACTAG GGGTAGCGCG AAGCGCCTCC CACGCTGCCG CGTCAGCGCT GACGTAAATT ACGTCATAGG GGAGTGGTCC TGTATTAGCT GTCACGTGAG TGCTTTTGCG GCATTTTGCG ACACC (配列番号 66)	GGTGTGCGAA AATGCCGCAA AAGCACTCAC GTGACAGCTA ATACAGGACC ACTCCCCTAT GACGTAAATT ACGTCAGCGC TGACGCGGCA GCGTGGGAGG CGCTTCGCGC TACCCCTAGT GATGGAGTTG GCCACTCCCT CTCTG (配列番号 75)
AAV9	CAGAGAGGGA GTGGCCAACT CCATCACTAG GGGTAATCGC GAAGCGCCTC CCACGCTGCC GCGTCAGCGC TGACGTAGAT TACGTCATAG GGGAGTGGTC CTGTATTAGC TGTCACGTGA GTGCTTTTGC GACATTTTGC GACAC (配列番号 67)	GTGTCGCAAA ATGTCGCAAA AGCACTCACG TGACAGCTAA TACAGGACCA CTCCCCTATG ACGTAATCTA CGTCAGCGCT GACGCGGCAG CGTGGGAGGC GCTTCGCGAT TACCCCTAGT GATGGAGTTG GCCACTCCCT CTCTG (配列番号 76)
AAV	TGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCCGGGC AAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC TTTGGTCGCCCGGCCCTCAGTGA GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG AGTGGCCAACTCCATCACTAGG GGTTCCT (配列番号 92)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGT TGGCCACTCCCTCTCTGCGCG CTCGCTCGCTCACTGAGGCCG GGCGACCAAAGGTCGCCCGAC GCCCGGGCTTTGCCCGGGCGG CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGCTGCCTGCA (配列番号 93)

10

20

30

40

【0298】

本明細書に記載の組換え A A V ゲノム構成要素の追加的な例示的な配列は、以下に提供される。

【0299】

例示的な U 6 プロモーター配列：

50

【化 1 9】

AAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAA
 GGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATA
 CGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAATG
 GACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTG
 GAAAGGACGAAACACC (配列番号78)

【0300】

例示的な gRNA 標的化ドメイン配列は、例えば、表 1 ~ 3、及び 18 など、本明細書に記載されている。 10

【0301】

熟練した技術者であれば、いくつかの実施形態では、例えば、gRNA が U6 プロモーターによって駆動される場合、gRNA 標的化ドメイン配列に 5' G を付加することが有利であってもよいことを理解するであろう。

【0302】

例示的な gRNA スキャフォールドドメイン配列：

【化 2 0】

GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCA
 ACTTGTTGGCGAGATTTTTT (配列番号79);
 GTTATAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTATAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCA
 ACTTGTTGGCGAGA (配列番号12)

20

【0303】

例示的な N-ter NLSヌクレオチド配列：

CCGAAGAAAAAGCGCAAGGTCGAAGCGTCC (配列番号81)。

【0304】

例示的な N-ter NLS アミノ酸配列：PKKKRKV (配列番号82)。

【0305】

本明細書に記載の例示的な Cas9ヌクレオチド配列。

【0306】

本明細書に記載の例示的な Cas9 アミノ酸配列。

【0307】

本明細書に記載の例示的な Cpf1ヌクレオチド配列。

【0308】

本明細書に記載の例示的な Cpf1 アミノ酸配列。

【0309】

例示的な C-ter NLS 配列：CCCCAAGAAAGAGAGGAAGAGTC (配列番号83)。

40

【0310】

例示的な C-ter NLS アミノ酸配列：PKKKRKV (配列番号84)。

【0311】

例示的なポリ(A)シグナル配列：

TAGCAATAAAGGATCGTTTATTTTTCATTGGGAAGCGTGTTGT
 TGGTTTTTTGATCAGGCGCG (配列番号56)。

【0312】

例示的な 3xFLAGヌクレオチド配列：

50

【化 2 1】

GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGA
CAAG (配列番号86)

【0 3 1 3】

例示的な 3 × F L A G アミノ酸配列：

D Y K D H D G D Y K D H D I D Y K D D D D K (配列番号 5 1)。

【0 3 1 4】

例示的なスパーサー配列：

C A G A T C T G A A T T C G G T A C C (配列番号 7 7)；

G G T A C C G C T A G C G C T T A A G T C G C G A T G T A C G G G C C A G A T A
T A C G C G T T G A (配列番号 8 0)；

【化 2 2】

TCCAAGCTTCGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCGTTAACTCTAGATT
TAAATGCATGCTGGGGAGAGATCT (配列番号85)

；

C G A C T T A G T T C G A T C G A A G G (配列番号 8 7)。

【0 3 1 5】

例示的な S V 4 0 イントロン配列：

【化 2 3】

TCTAGAGGATCCGGTACTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTT
TTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGT
GGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTAC (配列番号94)

【0 3 1 6】

特定の態様では、本開示は、C R I S P R / R N A 誘導ヌクレアーゼゲノム編集システム及び R H O c D N A 分子をコード化する A A V ベクター、並びに a d R P を治療するためのこのようなベクターの使用に焦点を合わせている。例示的な A A V ベクターゲノムは、I T R、R N A 誘導ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9）コード配列とその発現を駆動するプロモーターを含み、R N A 誘導ヌクレアーゼコード配列が N L S 配列で挟まれている、第 1 の A A V ベクター；並びに I T R、1 つの R H O c D N A 配列とその発現を駆動する最小の R H O プロモーター、及び 1 つの g R N A 配列とその発現を駆動するプロモーター配列を含む、第 2 の A A V ベクターのこれらのベクターの特定の固定要素及び可変要素を説明する図 2 に図式化されている。追加的な例示的な A A V ベクターゲノムもまた、図 3 及び 1 6 ~ 1 8 に記載されている。例示的な A A V ベクターゲノム配列は、配列番号 8 ~ 1 1 に記載されている。

【0 3 1 7】

最初に、本開示の核酸又は A A V ベクターで利用される g R N A に目を向けると、1 つ又は複数の g R N A を使用して、変異型 R H O 遺伝子の 5' 領域（例えば、5' U T R、エクソン 1、エクソン 2、イントロン 1、エクソン 1 / イントロン境界）が切断されてもよい。特定の実施形態では、変異型 R H O 遺伝子の 5' 領域での切断は、変異型 R H O 遺伝子のノックアウト又は機能喪失をもたらす。特定の実施形態では、1 つ又は複数の g R N A を使用して、変異型 R H O 遺伝子のコード領域（例えば、エクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5）又は変異型 R H O 遺伝子の非コード領域（例えば、5' U T R、イントロン、3' U T R）が切断されてもよい。特定の実施形態では、変異型 R H O 遺伝子のコード領域又は非コード領域の切断は、変異型 R H O 遺伝子のノックアウト又は機能喪失をもたらしてもよい。

【0 3 1 8】

10

20

30

40

50

例示的なガイドの標的化ドメイン配列（DNA及びRNA配列の双方）は、表1～3及び18に示される。

【0319】

いくつかの実施形態では、本開示で使用されるgRNAは、S. アウレウス（*S. aureus*）gRNAに由来してもよく、以下に記載されるように、単分子又はモジュール型であり得る。単分子S. アウレウス（*S. aureus*）gRNAに対応する例示的なDNA及びRNA配列は、以下に示される：

【化24】

DNA: [N]₁₆₋

24 GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAACTCTACTAAAACAAGGCCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTC
AACTTGTTGGCGAGATTTTTT (配列番号88)

10

及び

【化25】

RNA: [N]₁₆₋

24 GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCCAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUC
AACUUGUUGGCGAGAUUUUUU (配列番号89)

20

【化26】

DNA: [N]₁₆₋

24 GTTATAGTACTCTGGAAACAGAACTCTACTATAACAAGGCCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTC
AACTTGTTGGCGAGATTTTTT (配列番号90)

及び

【化27】

RNA: [N]₁₆₋

24 GUUAUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUUAACAAGGCCAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUC
AACUUGUUGGCGAGAUUUUUU (配列番号91)

30

【0320】

標的化ドメインは、任意の適切な長さを有し得ることに留意すべきである。本開示の様々な実施形態で使用されるgRNAは、好ましくは、図示されるように、それらの5'末端に16～24塩基長（両端を含む）の標的化ドメインを含み、任意選択的に、3'U6終止配列を含む。

【0321】

場合によっては、モジュラーガイドが使用され得る。上記の例示的な単分子gRNA配列において、crRNA（下線が引かれている）に対応する5'部分は、GAAAリンカーによって、tracrRNA（二重下線が引かれている）に対応する3'部分に連結されている。熟練した技術者であれば、下線部と二重下線部に対応する2つの部分からなるモジュラーgRNAが使用され得ることを理解するであろう。

40

【0322】

熟練した技術者であれば、本明細書に記載の例示的なgRNA設計が、以下に記載されるか、又は当該技術分野で公知の様々な方法で修飾され得ることを理解するであろう；このような修飾の組み込みは、本開示の範囲内である。

【0323】

AAVベクターにおける1つ又は複数のgRNAの発現は、ヒトU6プロモーターなどの

50

U 6 プロモーターの対によって駆動されてもよい。Maederに記載されている例示的なU 6 プロモーター配列は、配列番号 7 8 である。

【0324】

次にRNA誘導ヌクレアーゼに目を向けると、いくつかの実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼは、Cas 9又はCpf 1タンパク質であってもよい。特定の実施形態では、Cas 9タンパク質は、S.ピオゲネス(S. pyogenes) Cas 9である。特定の実施形態では、Cas 9タンパク質は、S.アウレウス(S. aureus) Cas 9である。本開示のさらなる実施形態では、Cas 9配列は、Cas 9タンパク質のC末端及びN末端に2つの核局在化配列(NLS)、及びミニポリアデニル化シグナル(又はポリA配列)を含むように修飾される。例示的なCas 9配列及びCpf 1配列は、本明細書で提供される。これらの配列は本質的に例示的なものであり、制限は意図されない。熟練した技術者であれば、これらの配列の修正が特定の用途において、可能であっても又は望ましくあってもよいことを理解するであろう；このような修飾は、以下に記載されるか、又は当該技術分野で公知であり、本開示の範囲内である。

【0325】

また熟練した技術者であれば、ポリアデニル化シグナルが当該技術分野で広く使用されて公知であり、任意の適切なポリアデニル化シグナルが、本開示の実施形態で使用され得ることも理解するであろう。例示的なポリアデニル化シグナルは、配列番号 5 6 ~ 5 8 に記載されている。

【0326】

Cas 9発現は、本開示の特定のベクターにおいて、サイトメガロウイルス(CMV)(すなわち、配列番号 4 5)、伸長因子-1(EFS)(すなわち、配列番号 4 6)、又は網膜光受容体細胞で特異的に発現されるヒトGタンパク質受容体共役キナーゼ-1(hGRK1)(すなわち、配列番号 4 7)の3つのプロモーターの1つによって駆動されてもよい。プロモーターの配列の修飾は、特定の用途において、可能であっても又は望ましくあってもよく、このような修飾は、本開示の範囲内である。特定の実施形態では、Cas 9発現は、本明細書に記載されるRHOプロモーター(例えば、最小RHOプロモーター(250bp)配列番号 4 4)によって駆動されてもよい。

【0327】

次にRHO cDNAに目を向けると、いくつかの実施形態では、RHO cDNA分子は、野生型RHO cDNA(例えば、配列番号 2)であってもよい。特定の実施形態では、RHO cDNA分子は、gRNAとのハイブリッド形成に耐性があるようにコドン修飾されたcDNAであってもよい。特定の実施形態では、RHO cDNA分子は、gRNAとのハイブリッド形成に耐性があるようにコドン修飾されていない。特定の実施形態では、RHO cDNA分子はコドン最適化cDNAであり、ロドプシンタンパク質(例えば、配列番号 1 3 ~ 1 8)の発現の増加が提供されてもよい。特定の実施形態では、RHO cDNAは、例えば、 β -globinなどの高度に発現された安定した転写物からの3'UTRなどの修飾3'UTRを含んでもよい。例として(Exemplary)、3'UTRは配列番号 3 8 ~ 4 2 に記載されている。特定の実施形態では、RHO cDNAは、1つ又は複数のイントロン(例えば、配列番号 4 ~ 7)を含んでもよい。特定の実施形態では、RHO cDNAは、1つ又は複数のイントロンのランケーションを含んでもよい。

【0328】

特定の実施形態では、RHO cDNA発現は、桿体特異的プロモーターによって駆動されてもよい。特定の実施形態では、RHO cDNA発現は、本明細書に記載されるRHOプロモーター(例えば、最小RHOプロモーター(250bp)配列番号 4 4)によって駆動されてもよい。

【0329】

本開示によるAAVゲノムは、一般に、AAV5血清型に由来する逆方向末端反復(ITR)を組み込んでいる。例示的な左右のITRは、それぞれ、配列番号 6 3 (AAV5左

10

20

30

40

50

ITR) 及び配列番号 72 (AAV5 右 ITR) である。特定の実施形態では、例示的な左右の ITR は、それぞれ、配列番号 92 (AAV 左 ITR) 及び配列番号 93 (AAV 右 ITR) である。しかし、AAV5 ITR の多数の修正されたバージョンが当該技術分野で使用されており、本明細書で示される ITR 配列は例示的なものであり、制限は意図されないことに留意されたい。これらの配列の修正は当該技術分野で公知であるか、又は熟練した技術者であれば明らかであり、したがって本開示の範囲に含まれる。

【0330】

gRNA、RNA 誘導ヌクレアーゼ、及び RHO cDNA プロモーターは可変性であり、本明細書に提示されるリストから選択され得る。明確さのために、本開示は、これらの要素の任意の組合せを含む核酸及び / 又は AAV ベクターを包含するが、特定の組合せが特定の用途で好ましくあってもよい。

10

【0331】

様々な実施形態では、第 1 の核酸又は AAV ベクターは、左右 AAV ITR 配列 (例えば、AAV5 ITR)、RNA 誘導ヌクレアーゼの発現を駆動するプロモーター (例えば、CMV、hGRK1、EFS、RHO プロモーター) (例えば、Cas9 核酸分子によってコード化される Cas9、又は Cpf1 核酸によってコード化される Cpf1)、RNA 誘導ヌクレアーゼ核酸分子を挟む NLS 配列をコード化してもよく、第 2 の核酸又は AAV ベクターは、左右 AAV ITR 配列 (例えば、AAV5 ITR)、標的化ドメイン配列を含むガイド RNA の発現を駆動する U6 プロモーター (例えば、表 1 ~ 3 又は 18 の配列に従った配列)、及び RHO cDNA 分子の発現を駆動する RHO プロモーター (例えば、最小 RHO プロモーター) をコード化してもよい。

20

【0332】

核酸又は AAV ベクターは、シミアンウイルス 40 (SV40) スプライスドナー / スプライスアクセプター (SD / SA) 配列要素もまた含んでもよい。特定の実施形態では、SV40 SD / SA 要素は、プロモーターと RNA 誘導ヌクレアーゼ遺伝子 (例えば、Cas9 又は Cpf1 遺伝子) との間に配置されてもよい。特定の実施形態では、コザックコンセンサス配列は、RNA 誘導ヌクレアーゼ (例えば、Cas9 又は Cpf1) の開始コドンに先行して、堅牢な RNA 誘導ヌクレアーゼ (例えば、Cas9 又は Cpf1) の発現を確実にしてもよい。

【0333】

いくつかの実施形態では、核酸又は AAV ベクターは、上記の核酸又は AAV ベクターの 1 つと、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又はそれ以上の配列同一性を共有する。

30

【0334】

上記のこれらの配列は例示的なものであり、それらがコード化する要素の動作原理を乱さない様式で修正され得ることに留意されたい。その一部が以下に説明されるこのような修正は、本開示の範囲内である。上記を限定することなく、熟練した技術者であれば、本開示の要素の DNA、RNA 又はタンパク質配列が、それらの機能を中断しない様式で変動してもよく、実質的に類似している様々な類似配列 (例えば、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % を超える配列類似性、又は gRNA 標的化ドメインなどの短い配列の場合、1、2、又は 3 ヌクレオチド以下が異なる配列) が、本明細書に記載の様々なシステム、方法、及び AAV ベクターで利用され得ることを理解するであろう。このような修飾配列は、本開示の範囲内である。

40

【0335】

上記の AAV ゲノムは、AAV カプシド (例えば、AAV5 カプシド) にパッケージ化され得て、このカプシドは、組成物 (医薬組成物など) に含まれ得て、及び / 又は対象に投与され得る。本開示による AAV カプシドを含む例示的な医薬組成物は、平衡塩類溶液 (BSS) 及び 1 つ又は複数の界面活性剤 (例えば、Tween20) 及び / 又は熱感受性の又は逆熱感受性のポリマー (例えば、プルロニック (登録商標)) などの薬学的に許容し得るキャリアを含み得る。当該技術分野で公知のその他の医薬製剤要素もまた、本明細書に

50

記載の組成物での使用に適していてもよい。

【0336】

本開示によるAAVベクターを含む組成物は、例えば、網膜下注射などの注射をはじめとするがこれに限定されない、任意の適切な手段によって対象に投与され得る。組成物内のAAVベクターの濃度は、とりわけ、注射装置内の死容積と、網膜に安全に投与され得る比較的限られた容積とを考慮して、対照の網膜に十分な量のAAVが確実に投与されるように選択される。適切な用量は、例えば、 1×10^{11} ウイルスゲノム(vg)/mL、 2×10^{11} ウイルスゲノム(vg)/mL、 3×10^{11} ウイルスゲノム(vg)/mL、 4×10^{11} ウイルスゲノム(vg)/mL、 5×10^{11} ウイルスゲノム(vg)/mL、 6×10^{11} ウイルスゲノム(vg)/mL、 7×10^{11} ウイルスゲノム(vg)/mL、 8×10^{11} ウイルスゲノム(vg)/mL、 9×10^{11} ウイルスゲノム(vg)/mL、 1×10^{12} vg/mL、 2×10^{12} ウイルスゲノム(vg)/mL、 3×10^{12} ウイルスゲノム(vg)/mL、 4×10^{12} ウイルスゲノム(vg)/mL、 5×10^{12} ウイルスゲノム(vg)/mL、 6×10^{12} ウイルスゲノム(vg)/mL、 7×10^{12} ウイルスゲノム(vg)/mL、 8×10^{12} ウイルスゲノム(vg)/mL、 9×10^{12} ウイルスゲノム(vg)/mL、 1×10^{13} vg/mL、 2×10^{13} ウイルスゲノム(vg)/mL、 3×10^{13} ウイルスゲノム(vg)/mL、 4×10^{13} ウイルスゲノム(vg)/mL、 5×10^{13} ウイルスゲノム(vg)/mL、 6×10^{13} ウイルスゲノム(vg)/mL、 7×10^{13} ウイルスゲノム(vg)/mL、 8×10^{13} ウイルスゲノム(vg)/mL、又は 9×10^{13} ウイルスゲノム(vg)/mLを含んでもよい。任意の適切な量の組成物が網膜下腔に送達されてもよい。場合によっては、体積は、網膜下腔に小水疱を形成するように選択され、例えば、1 mL、10 mL、50 mL、100 mL、150 mL、200 mL、250 mL、300 mLなどである。

【0337】

網膜の任意の領域が標的化されてもよいが、中心窩(眼の中心からおよそ1度延びる)が、中心視力におけるその役割と、網膜の周辺領域に比べて錐体光受容体が比較的高濃度であることから、特定の例において好ましくあってもよい。代案としては又はそれに加えて、注射は、桿体及び錐体光受容体細胞の両方の存在を特徴とする傍中心窩領域(中心からおよそ2~10度の範囲で延びる)を標的化してもよい。さらに、傍中心窩領域への注射は、網膜の正中線を横切る針経路を使用して、比較的鋭角で行われてもよい。例えば、注射経路は、強膜の側頭面から鼻側の傍中心窩網膜まで、角膜より上に位置する強膜の一部から下傍中心窩位置まで、及び/又は強膜の下部分から上傍中心窩位置まで、角膜輪部近くの強膜の鼻側から、硝子体腔を通して側頭側の傍中心窩網膜に延びてもよい。網膜表面に対して比較的小さな注入角度を使用すると、小水疱から硝子体内へのベクターの溢流の可能性が有利に低減又は制限され、その結果、送達中のベクターの損失が低減されてもよい。その他の場合には、網膜黄斑(中心窩を含む)が標的化され得て、その他の場合には、追加的な網膜領域が標的化され得て、又は溢流投与が与えられ得る。

【0338】

眼の炎症及び関連する不快感を軽減するために、AAVベクターを含む組成物の投与前、投与中、及び/又は投与後に、1つ又は複数のコルチコステロイドが投与されてもよい。特定の実施形態では、コルチコステロイドは、経口コルチコステロイドであってもよい。特定の実施形態では、経口コルチコステロイドは、プレドニゾンであってもよい。特定の実施形態では、コルチコステロイドは、AAVベクターを含む組成物の投与の前に、予防薬として投与されてもよい。例えば、コルチコステロイドは、AAVベクターを含む組成物の投与の前日に、又は投与の2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、又は14日前に、投与されてもよい。特定の実施形態では、コルチコステロイドは、AAVベクターを含む組成物の投与後1週間~10週間にわたり(例えば、AAVベクターを含む組成物の投与の1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、又は10週間後に)投与されてもよい。特定の

実施形態では、コルチコステロイド治療は、A A Vベクターを含む組成物の投与前に（例えば、投与の前日に、又は投与の2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、又は14日前に）、A A Vベクターを含む組成物の投与後に（例えば、投与の1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、又は10週間後に）投与されてもよい。例えば、コルチコステロイド治療は、A A Vベクターの投与の3日前から開始して6週間後まで投与されてもよい。

【0339】

コルチコステロイドの適切な用量は、例えば、 $0.1 \text{ mg/kg/day} \sim 10 \text{ mg/kg/day}$ （例えば、 0.1 mg/kg/day 、 0.2 mg/kg/day 、 0.3 mg/kg/day 、 0.4 mg/kg/day 、 0.5 mg/kg/day 、 0.6 mg/kg/day 、 0.7 mg/kg/day 、 0.8 mg/kg/day 、 0.9 mg/kg/day 、又は 1.0 mg/kg/day ）を含んでもよい。特定の実施形態では、コルチコステロイドは、コルチコステロイド治療中に高用量で投与されてもよく、コルチコステロイドの漸減用量がそれに続く。例えば、 0.5 mg/kg/day のコルチコステロイドが4週間にわたり投与されてもよく、15日間の漸減用量（ 0.4 mg/kg/day 5日間、次に 0.2 mg/kg/day 5日間、次に 0.1 mg/kg/day 5日間）がそれに続く。手術後（例えば、手術後4週間以内）に硝子体の炎症が評価尺度1+に増加した場合、コルチコステロイドの投与量が増加されてもよい。例えば、患者が 0.5 mg/kg/day の投与を受けている間（例えば、手術後4週間以内）に硝子体の炎症が評価尺度で1+に増加した場合、コルチコステロイドの投与量が 1 mg/kg/day に増量されてもよい。手術後4週間以内に炎症が現れた場合は、漸減が遅延されてもよい。

【0340】

前臨床開発の目的で、本開示によるシステム、組成物、ヌクレオチド、及びベクターは、網膜外植片システムを使用して生体外で、又はマウス、ウサギ、ブタ、非ヒト霊長類などの動物モデルを使用して生体内で評価され得る。網膜外植片は、任意選択的に支持マトリックス上に維持され、A A Vベクターは、網膜下注射を模倣するために、光受容体層と支持マトリックスとの間の空間への注射によって送達され得る。網膜外植用の組織は、ヒト又は例えば、マウスなどの動物対象から得られ得る。

【0341】

外植片は、ウイルス形質導入後のgRNA、RNA誘導ヌクレアーゼ、及びロドプシンタンパク質の発現を研究するため、及び比較的短い間隔でゲノム編集を研究するために、特に有用である。これらのモデルはまた、動物モデルで可能であるよりも高いスループットを可能にし、動物モデル及び対象における発現及びゲノム編集が予測され得る。小型（マウス、ラット）及び大型（ウサギ、ブタ、非ヒト霊長類など）の動物モデルは、薬理学的及び/又は毒性学的研究、及び本開示のシステム、ヌクレオチド、ベクター、及び組成物を、臨床で使用するものに近い条件と体積で試験するために使用され得る。モデルシステムは、ヒトの解剖学的構造及び/又は生理学の関連する態様を再現するように選択されるため、これらのシステムで取得されたデータは、一般に（必ずしもそうではないが）、ヒト及び動物の対象における本開示によるA A Vベクター及び組成物の挙動を予測するであろう。

【0342】

RNA誘導ヌクレアーゼ分子、gRNA分子、及び/又はRHO発現カセットのDNAベースの送達

RNA誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、Cas9又はCpf1分子）をコード化するDNA、gRNA分子、及び/又はRHO cDNA分子は、対象に投与されるか、又は当該技術分野で公知の方法によって、又は本明細書に記載されるように、細胞に送達され得る。例えば、RNA誘導ヌクレアーゼ（例えば、Cas9又はCpf1）をコード化するDNA、gRNAをコード化するDNA、及び/又はRHO cDNAは、例えば、ベクター（例えば、ウイルスベクター又は非ウイルスベクター）、非ベクターベースの方法（例えば、裸のDNA又はDNA複合体を使用する）、又はそれらの組合せによって送達され

得る。

【0343】

いくつかの実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼ（例えば、Cas9又はCpf1）をコード化するDNA、gRNAをコード化するDNA、及び/又はRHOC DNAは、ベクター（例えば、ウイルスベクター/ウイルス又はプラスミド）によって送達される。

【0344】

ベクターは、RNA誘導ヌクレアーゼをコード化するDNA、gRNAをコード化するDNA、及び/又はRHOC DNA分子をコード化する配列を含み得る。ベクターはまた、例えば、RNA誘導ヌクレアーゼ配列と融合した、（例えば、核局在化、核小体局在化、ミトコンドリア局在化のための）シグナルペプチドをコード化する配列を含み得る。例えば、ベクターは、核局在化配列（例えば、SV40由来）に融合された、RNA誘導ヌクレアーゼ（例えば、Cas9又はCpf1）分子をコード化する配列を含み得る。

【0345】

例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、ポリアデニル化シグナル、コザックコンセンサス配列、内部リボソーム侵入部位（IRES）、2A配列、及びスプライス受容体又はドナーなどの1つ又は複数の調節的/制御要素が、ベクターに包含され得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、RNAポリメラーゼII（例えば、CMVプロモーター）によって認識される。別の実施形態では、プロモーターは、RNAポリメラーゼIII（例えば、U6プロモーター）によって認識される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、調節プロモーター（例えば、誘導性プロモーター）である。別の実施形態では、プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ウイルスプロモーターである。別の実施形態では、プロモーターは、非ウイルスプロモーターである。

【0346】

いくつかの実施形態では、ベクター又は送達ビヒクルは、ウイルスベクター（例えば、組換えウイルス生成のための）である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、DNAウイルス（例えば、dsDNA又はssDNAウイルス）である。別の実施形態では、ウイルスは、RNAウイルス（例えば、ssRNAウイルス）である。代表的なウイルスベクター/ウイルスとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、及び単純ヘルペスウイルスが挙げられる。

【0347】

いくつかの実施形態では、ウイルスは分裂細胞に感染する。その他の実施形態では、ウイルスは非分裂細胞に感染する。いくつかの実施形態では、ウイルスは、分裂及び非分裂細胞の双方に感染する。いくつかの実施形態では、ウイルスは、宿主ゲノムに組み込まれ得る。いくつかの実施形態では、ウイルスは、例えば、ヒトにおいて免疫力が低下するように操作される。いくつかの実施形態では、ウイルスは複製能を有する。その他の実施形態では、ウイルスは複製欠陥であり、例えば、ビリオン複製及び/又はパッケージングの追加的なラウンドに必要な遺伝子のための1つ又は複数のコード領域が、その他の遺伝子で置換されるか、又は消去される。いくつかの実施形態では、ウイルスは、RNA誘導ヌクレアーゼ分子、gRNA分子、及び/又はRHOC DNA分子の一過性発現をもたらす。その他の実施形態では、ウイルスは、例えば、少なくとも1週間、2週間、1月、2月、3月、6月、9月、1年、2年、又は恒久的など、RNA誘導ヌクレアーゼ分子、gRNA分子、及び/又はRHOC DNA分子の長期持続的発現を引き起こす。ウイルスのパッケージング能力は、例えば、少なくとも約5 kb、10 kb、15 kb、20 kb、25 kb、30 kb、35 kb、40 kb、45 kb、又は50 kbなど、少なくとも約4 kbから少なくとも約30 kbまでなど、変動してもよい。

【0348】

いくつかの実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼをコード化するDNA、gRNAをコ

10

20

30

40

50

ード化するDNA、及び/又はRHO cDNAは、組換えレトロウイルスによって送達される。いくつかの実施形態では、レトロウイルス（例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス）は、例えば、宿主ゲノムへの組み込みを可能にするものなどの逆転写酵素を含む。いくつかの実施形態では、レトロウイルスは複製能を有する。その他の実施形態では、レトロウイルスは複製欠陥であり、例えば、ビリオン複製及びパッケージングの追加的なラウンドに必要な遺伝子のための1つ又は複数の（one of more）コード領域が、その他の遺伝子で置換されるか、又は消去される。

【0349】

いくつかの実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼをコード化するDNA、gRNAをコード化するDNA、及び/又はRHO cDNAは、組換えレンチウイルスによって送達される。例えば、レンチウイルスは、例えば、ウイルス複製に必要な1つ又は複数の遺伝子を含まないなど、複製欠陥である。

10

【0350】

いくつかの実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼをコード化するDNA、gRNAをコード化するDNA、及び/又はRHO cDNAは、組換えアデノウイルスによって送達される。いくつかの実施形態では、アデノウイルスは、ヒトにおいて免疫力が低下するように操作される。

【0351】

いくつかの実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼをコード化するDNA、gRNAをコード化するDNA、及び/又はRHO cDNAは、組換えAAVによって送達される。

20

いくつかの実施形態では、AAVは、例えば、本明細書に記載されるような標的細胞などの宿主細胞に、そのゲノムを組み込み得る。いくつかの実施形態では、AAVは、例えば、共にアニールされて二本鎖DNAを形成する双方の鎖をパッケージする自己相補的アデノ随伴ウイルス（scAAV）などの、scAAVである。開示された方法で使用されてもよいAAV血清型としては、AAV1、AAV2、修飾AAV2（例えば、Y444F、Y500F、Y730F及び/又はS662Vでの修飾）、AAV3、修飾AAV3（例えば、Y705F、Y731F及び/又はT492Vでの修飾）、AAV4、AAV5、AAV6、修飾AAV6（例えば、S663V及び/又はT492Vでの修飾）、AAV8、AAV8.2、AAV9、AAVrh10が挙げられ、AAV2/8、AAV2/5、AAV2/6などの偽型AAVもまた、開示された方法で使用され得る。

30

【0352】

いくつかの実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼをコード化するDNA、gRNAをコード化するDNA、及び/又はRHO cDNAは、例えば、本明細書に記載のウイルスの1つ又は複数のハイブリッドなどのハイブリッドウイルスによって送達される。

【0353】

パッケージング細胞が使用されて、宿主又は標的細胞を感染させる能力があるウイルス粒子が形成される。このような細胞としては、アデノウイルスをパッケージし得る293細胞、及びレトロウイルスをパッケージし得る2細胞又はPA317細胞が挙げられる。遺伝子治療で使用されるウイルスベクターは、通常は、核酸ベクターをウイルス粒子内にパッケージする産生細胞株によって生成される。ベクターは、典型的に、パッケージングと（妥当な場合）引き続く宿主又は標的細胞への組み込みに必要な最小のウイルス配列を含有し、その他のウイルス配列は、発現されるタンパク質をコードする発現カセットによって置換される。例えば、遺伝子治療で使用されるAAVベクターは、典型的に、パッケージング及び宿主又は標的細胞内の遺伝子発現に必要なAAVゲノムからの逆方向末端反復（ITR）配列のみを有する。欠損しているウイルス機能は、パッケージング細胞株によってトランスに提供される。この後、ウイルスDNAは、他のAAV遺伝子、すなわちrep及びcapをコードするが、ITR配列が欠如しているヘルパープラスミドを含有する、細胞株内にパッケージされる。細胞株はまた、ヘルパーとしてのアデノウイルスに感染する。ヘルパーウイルスは、ヘルパープラスミドからのAAVベクター複製とAAV遺伝子発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ITR配列の欠如のために、顕著な量で

40

50

パッケージされない。アデノウイルスの混入は、例えば、それに対してアデノウイルスが A A V よりも感受性が高い、加熱処理によって低下させ得る。

【 0 3 5 4 】

一実施形態では、ウイルスベクターは、細胞型及び／又は組織型の認識能力を有する。例えば、ウイルスベクターは、異なる／代案のウイルス外被糖タンパク質による偽型であり得て；細胞型特異的受容体によって改変され（例えば、ペプチドリガンド、一本鎖抗体、成長因子などの標的化リガンドに組み込むためのウイルス外被糖タンパク質の遺伝子修飾）；及び／又は改変されて、一端がウイルス糖タンパク質を認識して、もう一方の末端が標的細胞表面部分を認識する、二重特異性がある分子ブリッジを有する（例えば、リガンド受容体、モノクローナル抗体、アビジン - ビオチン、及び化学的結合）。

10

【 0 3 5 5 】

一実施形態では、ウイルスベクターは、細胞型特異的発現を達成する。例えば、組織特異的プロモーターが構築されて、標的細胞のみで導入遺伝子（C a s 9 及び g R N A ）の発現が制限され得る。ベクターの特異性はまた、導入遺伝子発現のマイクロ R N A 依存性調節によって媒介され得る。一実施形態では、ウイルスベクターは、ウイルスベクターと標的細胞膜との融合効率の増大を有する。例えば、融合能力がある赤血球凝集素（H A ）などが組み込まれて、細胞内へのウイルス取り込みが増大され得る。一実施形態では、ウイルスベクターは、核局在化能力を有する。例えば、（細胞分裂中に）細胞壁の分解を要し、したがって非分裂細胞に感染しない特定のウイルスは、ウイルスのマトリックスタンパク質に核局在化ペプチドを組み込むように改変され得て、それによって非増殖性細胞への形質導入が可能になる。

20

【 0 3 5 6 】

いくつかの実施形態では、R N A 誘導ヌクレアーゼをコード化する D N A 、 g R N A をコード化する D N A 、及び／又は R H O c D N A は、非ベクターベースの方法によって（例えば、裸の D N A 又は D N A 複合体を使用して）送達される。例えば、D N A は、例えば、有機修飾シリカ又はケイ酸塩（Ormosil）、電気穿孔、遺伝子銃、ソノポレーション、マグネトフェクション、脂質媒介形質移入、デンドリマー、無機ナノ粒子、カルシウムリン酸塩、又はそれらの組合せによって送達され得る。

【 0 3 5 7 】

いくつかの実施形態では、R N A 誘導ヌクレアーゼをコード化する D N A 、 g R N A をコード化する D N A 、及び／又は R H O c D N A は、ベクター及び非ベクターベースの方法の組合せによって送達される。例えば、ピロソームは、不活性化ウイルス（例えば、H I V 又はインフルエンザウイルス）と組み合わせられたリポソームを構成し、それは、ウイルス法単独又はリポソーム法単独のいずれよりも効率的な遺伝子移入を例えば、呼吸器上皮細胞内にもたらし得る。

30

【 0 3 5 8 】

一実施形態では、送達ビヒクルは、非ウイルスベクターである。一実施形態では、非ウイルスベクターは、無機ナノ粒子である（例えば、ナノ粒子表面へのペイロードに付着する）。代表的な無機ナノ粒子としては、例えば、磁性ナノ粒子（例えば、F e ₃ M n O ₂ ）、又はシリカが挙げられる。ナノ粒子の外面は、ペイロードの付着（例えば、コンジュゲーション又は捕捉）を可能にする正荷電ポリマー（例えば、ポリエチレンイミン、ポリリジン、ポリセリン）にコンジュゲートされ得る。一実施形態では、非ウイルスベクターは、有機ナノ粒子である（例えば、ナノ粒子内部のペイロード捕捉）。代表的な有機ナノ粒子としては、例えば、ポリエチレングリコール（P E G ）で被覆されている中性ヘルパー脂質に加えてカチオン性脂質を含有する、S N A L P リポソーム；及び脂質コーティングで被覆されている、プロタミン及び核酸複合体が挙げられる。

40

【 0 3 5 9 】

遺伝子移入のための代表的な脂質は、以下の表 1 5 に示される。

【 0 3 6 0 】

50

【表 15】

表 15: 遺伝子移入のために使用される脂質

脂質	略称	特徴
1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	DOPC	ヘルパー
1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン	DOPE	ヘルパー
コレステロール		ヘルパー
<i>N</i> -[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル] <i>N,N,N</i> -トリメチルアンモニウムクロリド	DOTMA	カチオン性
1,2-ジオレオイルオキシ-3-トリメチルアンモニウム-プロパン	DOTAP	カチオン性
ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン	DOGS	カチオン性
<i>N</i> -(3-アミノプロピル)- <i>N,N</i> -ジメチル-2,3-ビス(ドデシルオキシ)-1-プロパンアミニウムブロミド	GAP-DLRIE	カチオン性
臭化セチルトリメチルアンモニウム	CTAB	カチオン性
6-ラウロキシヘキシルオルニチネート	LHON	カチオン性
1-(2,3-ジオレオイルオキシプロピル)-2,4,6-トリメチルピリジニウム	2Oc	カチオン性
2,3-ジオレイルオキシ- <i>N</i> -[2(スベルミンカルボキサミド-エチル)- <i>N,N</i> -ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロ酢酸	DOSPA	カチオン性
1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン	DOPA	カチオン性
<i>N</i> -(2-ヒドロキシエチル)- <i>N,N</i> -ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)-1-プロパンアミニウムブロミド	MDRIE	カチオン性
ジミリスチオキシプロピルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド	DMRI	カチオン性
3β-[<i>N</i> -(<i>N,N</i> -ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール	DC-Chol	カチオン性
ビス-グアニジウム-tren-コレステロール	BGTC	カチオン性
1,3-ジオデオキシ-2-(6-カルボキシ-スベルミン)-プロピルアミド	DOSPER	カチオン性
ジメチルオクタデシルアンモニウムブロミド	DDAB	カチオン性
ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン	DSL	カチオン性
rac-[(2,3-ジオクタデシルオキシプロピル)(2-ヒドロキシエチル)]-ジメチルアンモニウムクロリド	CLIP-1	カチオン性
rac-[2(2,3-ジヘキサデシルオキシプロピル-オキシメチルオキシ)エチル]トリメチルアンモニウムブロミド	CLIP-6	カチオン性
エチルジミリスチルホスファチジルコリン	EDMPC	カチオン性
1,2-ジステアerylオキシ- <i>N,N</i> -ジメチル-3-アミノプロパン	DSDMA	カチオン性
1,2-ジミリスチル-トリメチルアンモニウムプロパン	DMTAP	カチオン性
<i>O,O'</i> -ジミリスチル- <i>N</i> -リシルアスパラギン酸	DMKE	カチオン性
1,2-ジステアeryl-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン	DSEPC	カチオン性
<i>N</i> -パルミトイル D-エリスロ-スフィンゴシルカルバモイル-スベルミン	CCS	カチオン性
<i>N</i> - <i>t</i> -ブチル- <i>N</i> O-テトラデシル-3-テトラデシルアミノプロピオンアミジン	ジ C14-アミジン	カチオン性
オクタデセノイルオキシ[エチル-2-ヘプタデセニル-3 ヒドロキシエチル]イミダゾリニウムクロリド	DOTIM	カチオン性
<i>N</i> 1-コレステリルオキシカルボニル-3,7-ジアザノナン-1,9-ジアミン	CDAN	カチオン性
2-(3-[ビス(3-アミノ-プロピル)-アミノ]プロピルアミノ)- <i>N</i> -ジテトラデシルカルバモイルム-エチル-アセトアミド	RPR209120	カチオン性

【0361】

遺伝子移入のための例示的ポリマーは、下で表 16 に示される。

【0362】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 16: 遺伝子移入のために使用されたポリマー

ポリマー	略称
ポリ(エチレン)グリコール	PEG
ポリエチレンイミン	PEI
ジチオビス(スクシンイミジルプロピオン酸)	DSP
ジメチル-3,3'-ジチオビスプロピオンイミド酸	DTBP
ポリ(エチレンイミン)ビスカルバメート	PEIC
ポリ(L-リジン)	PLL
ヒスチジン修飾 PLL	
ポリ(N-ビニルピロリドン)	PVP
ポリ(プロピレンイミン)	PPI
ポリ(アミドアミン)	PAMAM
ポリ(アミドエチレンイミン)	SS-PAEI
トリエチレンテトラミン	TETA
ポリ(β -アミノエステル)	
ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)	PHP
ポリ(アリルアミン)	
ポリ(α -[4-アミノブチル]-L-グリコール酸)	PAGA
ポリ(D,L-乳酸-コ-グリコール酸)	PLGA
ポリ(N-エチル-4-ビニルピリジニウムブロミド)	
ポリ(ホスファゼン)	PPZ
ポリ(ホスホエステル)	PPE
ポリ(ホスホアミデート)	PPA
ポリ(N-2-ヒドロキシプロピルメタクリルアミド)	pHPMA
ポリ(2-(ジメチルアミノ)メタクリル酸エチル)	pDMAEMA
ポリ(2-アミノエチルプロピレンホスフェート)	PPE-EA
キトサン	
ガラクトシル化キトサン	
N-ドダシル化キトサン	
ヒストン	
コラーゲン	
デキストラン-スペルミン	D-SPM

10

20

30

【0363】

一実施形態では、ビヒクルは、標的化修飾を有して、例えば、細胞特異的抗原、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、アプタマー、ポリマー、糖、及び細胞透過性ペプチドなどのナノ粒子及びリボソームの標的細胞取り込みが増大される。一実施形態では、ビヒクルは、融合性及びエンドソーム不安定化ペプチド/ポリマーを利用する。一実施形態では、ビヒクルは、酸誘発性立体構造変化を受ける（例えば、カーゴのエンドソーム漏出を加速するために）。一実施形態では、例えば、細胞区画内の放出のために、刺激切断可能ポリマーが使用される。例えば、還元性細胞環境内で切断されるジスルフィドベースのカチオン性ポリマーが、使用され得る。

40

【0364】

一実施形態では、送達ビヒクルは、生物学的非ウイルス送達ビヒクルである。一実施形態では、ビヒクルは、弱毒型細菌（例えば、侵入性であるが弱毒化されて発病を予防して導入遺伝子を発現するように、天然に又は人工的に改変されている（例えば、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）、特定のサルモネラ属（*Salmonella*）株、ビフィドバクテリウム・ロングム（*Bifidobacterium longum*）、及び改変大腸菌（*Escherichia coli*）；栄養及び組織特異的親和性を有して特定組織を標的化する細菌；修飾表面タンパク質を有して標的組織特異性を改変する細菌）である。一実施形態

50

では、ビヒクルは、遺伝子修飾されたバクテリオファージである（例えば、改変ファージは、大きなパッケージング容量を有し、免疫原性がより低く、哺乳類プラスミド維持配列を含有して、組み込まれた標的化リガンドを有する）。一実施形態では、ビヒクルは、哺乳類ウイルス様粒子である。例えば、修飾ウイルス粒子が生成され得る（例えば、「空の」粒子精製と、それに続く、所望のカーゴがあるウイルスの生体外構築によって）。ビヒクルはまた改変されて、標的化リガンドが組み込まれ、標的組織特異性が改変され得る。一実施形態では、ビヒクルは、生物学的リボソームである。例えば、生物学的リボソームは、ヒト細胞（例えば、対象に由来する球状構造に分解された赤血球である赤血球ゴーストに由来するリン脂質ベースの粒子（例えば、組織標的化が、様々な組織又は細胞特異的リガンドの付着によって達成され得る）；又はエンドサイトーシス起源の分泌型エキソソーム - 対象（すなわち、患者）由来膜結合ナノ小胞（30 ~ 100 nm）（例えば、様々な細胞型から生成され得て、したがってリガンド標的化の必要なしに細胞に取り込まれ得る）である。

10

【0365】

一実施形態では、例えば、本明細書に記載の Cas 9 又は Cpf 1 分子構成要素、gRNA 分子構成要素、及び / 又は RHO cDNA 分子構成要素などの、RNA 誘導ヌクレアーゼシステムの構成要素以外の 1 つ又は複数の核酸分子（例えば、DNA 分子）が送達される。一実施形態では、核酸分子は、RNA 誘導ヌクレアーゼシステムの構成要素の 1 つ又は複数の送達されるのと同時に、送達される。一実施形態では、核酸分子は、RNA 誘導ヌクレアーゼシステムの構成要素の 1 つ又は複数の送達される（例えば、約 30 分間、1 時間、2 時間、3 時間、6 時間、9 時間、12 時間、1 日、2 日間、3 日間、1 週間、2 週間、又は 4 週間未満）前又は後に送達される。一実施形態では、核酸分子は、例えば、Cas 9 又は Cpf 1 分子構成要素、gRNA 分子構成要素、及び / 又は RHO cDNA 分子構成要素などの、RNA 誘導ヌクレアーゼシステムの構成要素以外の 1 つ又は複数の送達されるのとは異なる手段によって送達される。核酸分子は、本明細書に記載される送達方法のいずれかによって送達され得る。例えば、核酸分子は、例えば、核酸（例えば、DNA）によって引き起こされる毒性が低下され得るように、例えば、組み込み欠損レンチウイルスなどのウイルスベクターによって送達され得て、RNA 誘導ヌクレアーゼ分子構成要素、gRNA 分子構成要素、及び / 又は RHO cDNA 分子構成要素は、電気穿孔によって送達され得る。一実施形態では、核酸分子は、例えば、本明細書に記載されるタンパク質などの治療用タンパク質をコード化する。一実施形態では、核酸分子は、例えば、本明細書に記載される RNA 分子などの RNA 分子をコード化する。

20

30

【0366】

RNA 誘導ヌクレアーゼ分子をコード化する RNA の送達

RNA 誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、本明細書に記載の Cas 9 又は Cpf 1 分子）をコード化する RNA、gRNA 分子、及び / 又は RHO cDNA 分子は、当該技術分野で公知の方法によって、又は本明細書に記載されるように、例えば、本明細書に記載の標的細胞などの細胞に送達され得る。例えば、RNA 誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、本明細書に記載の Cas 9 又は Cpf 1 分子）、gRNA 分子、及び / 又は RHO cDNA 分子は、例えば、マイクロインジェクション、電気穿孔、脂質媒介形質移入、ペプチド媒介送達、又はそれらの組合せによって送達され得る。

40

【0367】

RNA 誘導ヌクレアーゼ分子タンパク質の送達

RNA 誘導ヌクレアーゼ分子（例えば、本明細書に記載の Cas 9 又は Cpf 1 分子）は、当該技術分野で公知の方法によって、又は本明細書に記載されるように細胞内に送達され得る。例えば、RNA 誘導ヌクレアーゼタンパク質分子は、例えば、マイクロインジェクション、電気穿孔、脂質媒介形質移入、ペプチド媒介送達、又はそれらの組合せによって送達され得る。送達は、gRNA 及び / 又は RHO cDNA をコード化する DNA、又は gRNA 及び / 又は RHO cDNA を伴い得る。

【0368】

50

投与経路

全身性の投与方法としては、経口及び非経口経路が挙げられる。非経口経路としては、一例として、静脈内、動脈内、骨内、筋肉内、皮内、皮下、鼻腔内、及び腹腔内経路が挙げられる。全身投与される構成要素は、又は眼に構成要素を標的化するように、修飾又は調合されてもよい。

【0369】

局所投与方法としては、例として、眼内、眼窩内、結膜下(subconjunctival)、硝子体内、網膜下又は経強膜経路が挙げられる。一実施形態では、局所的に(例えば、硝子体内)投与された場合、全身投与(例えば、静脈内)と比較して、(全身性のアプローチと比較して)有意により少量の構成要素が、効果を発揮してもよい。局所投与方法は、治療有効量の構成要素が全身投与された場合に起こることもある、潜在的に毒性の副作用の発生を低減又は排除し得る。

10

【0370】

一実施形態では、本明細書に記載される構成要素は、例えば、結膜下注射によって、網膜下に送達される。結膜下注射は、例えば、黄斑下注射など、黄斑中で直接実施されてもよい。

【0371】

一実施形態では、本明細書に記載される構成要素は、硝子体内注射によって送達される。硝子体内注射は、網膜離脱リスクの相対的に低いリスクを有する。一実施形態では、ナノ粒子又はウイルスベクター、例えば、AAVベクター、例えば、AAV5ベクター、例えば、修飾AAV5ベクター、AAV2ベクター、例えば、修飾AAV2ベクターは、硝子体内送達される。

20

【0372】

眼への薬剤投与方法は、医療技術分野で公知であり、本明細書に記載される構成要素を投与するのに使用され得る。代表的な方法としては、眼内注射(例えば、球後、結膜下、黄斑下、硝子体内及び脈絡膜内)、イオン注入、点眼薬、及び眼内移植(例えば、硝子体内、テノン下、及び結膜下)が挙げられる。

【0373】

投与は、周期的ボラス(例えば、網膜下、静脈内又は硝子体内)として、又は内部リザーバーからの(例えば、眼球内又は眼球外部位に配置されるインプラント(米国特許第5,443,505号明細書及び米国特許第5,766,242号明細書を参照されたい)からの)又は外部リザーバーからの(例えば、静注バッグからの)持続注入として提供されてもよい。構成要素は、例えば、眼の内壁に固定化された徐放薬物送達装置からの連続的放出によって、又は脈絡膜内への標的化経強膜制御放出を介して、局所的に投与されてもよい(例えば、PCT/US00/00207号明細書、PCT/US02/14279号明細書、Ambati 2000a、及びAmbati 2000b。構成要素を眼内に局所的に投与するのに好適な多様な装置が、当該技術分野で公知である(例えば、米国特許第6,251,090号明細書、米国特許第6,299,895号明細書、米国特許第6,416,777号明細書、米国特許第6,413,540号明細書、及びPCT/US00/28187号明細書を参照されたい)。

30

【0374】

加えて、構成要素は、長時間にわたって放出されるように調合されてもよい。放出系は、生分解性材料、又は拡散によって組み込まれた構成要素を放出する材料のマトリックスを含み得る。構成要素は、放出系内で均一に又は不均一に分布し得る。多様な放出系が有用であってもよいが、適切なシステムの選択は、特定用途によって要求される放出速度に左右される。非分解性及び分解性放出系の双方が使用され得る。適切な放出系としては、ポリマー及びポリマーマトリックス、非ポリマーマトリックス、又は炭酸カルシウム及び砂糖(例えば、トレハロース)などであるが、これに限定されるものではない、無機及び有機賦形剤及び希釈剤が挙げられる。放出系は、天然又は合成であってもよい。しかし、通常、より信頼でき、より再現可であり、より限定される放出プロファイルを生じることから、合成放出系が好ましい。放出系材料は、異なる分子量を有する構成要素が、材料を通

40

50

過する又は材料の分解による、拡散によって放出されるように選択され得る。

【0375】

典型的な合成生分解性ポリマーとしては、例えば、ポリ(アミノ酸)及びポリ(ペプチド)などのポリアミド;ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)、及びポリ(カプロラクトン)などのポリエステル;ポリ(酸無水物);ポリオルトエステル;ポリカーボネート;及びその化学的誘導体(置換、例えば、アルキル、アルキレンなどの化学基の付加、ヒドロキシル化、酸化、及び当業者によって慣例的に加えられるその他の修飾)、共重合体、及びそれらの混合物が挙げられる。典型的な合成非分解性ポリマーとしては、例えば、ポリ(酸化エチレン)、ポリ(エチレングリコール)、及びポリ(テトラメチレンオキシド)などのポリエーテル;メチル、エチル、その他のアルキル、ヒドロキシエチルメタクリレート、アクリル及びメタクリル酸、及びポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、及びポリ(酢酸ビニル)などのビニルポリマー-ポリアクリレート及びポリメタクリレート;ポリ(ウレタン);セルロースと、アルキル、ヒドロキシアルキル、エーテル、エステル、ニトロセルロース、及び様々な酢酸セルロースなどのその誘導体;ポリシロキサン;及び任意のその化学的誘導体(置換、例えば、アルキル、アルキレンなどの化学基の付加、ヒドロキシル化、酸化、及び当業者によって慣例的に加えられるその他の修飾)、共重合体、及びそれらの混合物が挙げられる。

10

【0376】

ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)微小球もまた、眼内注射のために使用され得る。典型的に、微小球は、中空球を形成するように構造化された、乳酸及びグリコール酸ポリマーから構成される。球は、直径がおよそ15~30ミクロンであり得て、本明細書に記載される構成要素が負荷され得る。

20

【0377】

構成要素の二峰性又は差動送達

例えば、RNA誘導ヌクレアーゼ分子構成要素(例えば、Cas9又はCpf1分子構成要素)、gRNA分子構成要素、及びRHOcDNA分子構成要素などのRNA誘導ヌクレアーゼシステムの構成要素の別々の送達、より具体的には、異なる様式による構成要素の送達は、例えば、組織の特異性と安全性を改善することによって、性能を向上させ得る。

【0378】

一実施形態では、RNA誘導ヌクレアーゼ分子構成要素、gRNA分子構成要素、及びRHOcDNA分子構成要素は、異なる様式(又は本明細書では差示の様式と称されることもある様式)によって送達される。異なる又は差示の様式は、本明細書の用法では、例えば、RNA誘導ヌクレアーゼ分子、gRNA分子、又はRHOcDNA分子などの、対象の構成要素分子に、異なる薬力学特性又は薬物動態学特性を付与する送達様式を指す。例えば、送達様式は、例えば、選択された区画、組織、又は臓器に、異なる組織分布、異なる半減期、又は異なる時間的分布をもたらし得る。

30

【0379】

例えば、自律複製又は細胞核酸内への挿入によって、細胞内に、又は細胞子孫内に残留する核酸ベクターによる送達などのいくつかの送達様式は、構成要素のより持続性の発現及び存在をもたらす。例としては、例えば、アデノ随伴ウイルス又はレンチウイルスなどのウイルス送達が挙げられる。

40

【0380】

一例として、例えば、RNA誘導ヌクレアーゼ分子、gRNA分子及びRHOcDNA分子などの構成要素は、得られる半減期、又は身体、又は特定の区画、組織又は臓器に送達される構成要素の持続性に関して、異なる様式によって送達され得る。一実施形態では、このような様式によってgRNA分子が送達され得る。RNA誘導ヌクレアーゼ分子構成要素は、身体又は特定の区画又は組織又は臓器でのより低い持続性又はより少ない曝露をもたらす様式によって、送達され得る。RHOcDNA分子構成要素は、gRNA分子構成要素及びRNA誘導ヌクレアーゼ分子構成要素の様式とは異なる様式によって送達

50

されてもよい。

【0381】

より一般的には、一実施形態では、第1の送達様式が使用されて、第1の構成要素が送達され、及び第2の送達様式が使用されて、第2の構成要素が送達される。第1の送達様式は、第1の薬力学的又は薬物動態学的特性を与える。第1の薬力学的特性は、例えば、身体、区画、組織又は臓器内における、構成要素の、又は構成要素をコードする核酸の、分布、持続性、又は曝露であり得る。第2の送達様式は、第2の薬力学又は薬物動態学的特性を与える。第2の薬力学的特性は、例えば、身体、区画、組織又は臓器内における、構成要素の、又は構成要素をコードする核酸の、分布、持続性、又は曝露であり得る。

【0382】

一実施形態では、例えば、分布、持続性又は曝露などの第1の薬力学的又は薬物動態学的特性は、第2の薬力学的又は薬物動態学的特性よりも限定的である。

【0383】

一実施形態では、第1の送達様式は、例えば、分布、持続性又は曝露などの薬力学的又は薬物動態学的特性を最適化する、例えば、最小化するように選択される。

【0384】

一実施形態では、第2の送達様式は、例えば、分布、持続性又は曝露などの薬力学的又は薬物動態学的特性を最大化する、例えば、最適化するように選択される。

【0385】

一実施形態では、第1の送達様式は、例えば、核酸、例えば、プラスミド又はウイルスベクター、例えば、AAV又はレンチウイルスなどの相対的に持続性の要素の使用を含む。このようなベクターは比較的持続性であるので、それらから転写される生成物は、比較的持続性になる。

【0386】

一実施形態では、第2の送達様式は、例えば、RNA又はタンパク質などの比較的一過性の要素を含む。

【0387】

一実施形態では、第1の構成要素はgRNAを含み、送達様式は比較的持続性であり、例えば、gRNAは、例えば、AAV又はレンチウイルスなどのプラスミド又はウイルスベクターから転写される。これらの遺伝子はタンパク質生成物をコードせず、gRNAは単独で作用できないため、これらの遺伝子の転写は、生理学的に重要でない。第2の構成要素であるRNA誘導ヌクレアーゼ分子は、例えば、mRNAとして又はタンパク質として一過性様式で送達され、完全なRNA誘導ヌクレアーゼ分子/gRNA分子複合体が、短時間のみ存在して活性であることが確実にされる。

【0388】

さらに、構成要素は、互いに補完して安全性及び組織特異性を高める、異なる分子形態で、又は異なる送達ベクターで、送達され得る。

【0389】

差動送達様式の使用は、性能、安全性、及び有効性を高め得る。例えば、最終的なオフターゲット修飾の可能性が、低下され得る。細菌由来Cas酵素からのペプチドは、MHC分子によって細胞表面に提示されるので、例えば、RNA誘導ヌクレアーゼ分子などの免疫原性構成要素のより低持続性様式による送達は、免疫原性を低下させ得る。二部送達系は、これらの欠点を軽減し得る。

【0390】

差動送達様式を使用して、異なるが重複する標的領域に、構成要素が送達され得る。形成活性複合体は、標的領域の重なりの外で最小化される。したがって、一実施形態では、例えば、gRNA分子などの第1の構成要素は、第1の送達様式によって送達され、例えば、組織分布などの第1の空間的分布がもたらされる。例えば、RNA誘導ヌクレアーゼ分子などの第2の構成要素は、第2の送達様式によって送達され、例えば、組織分布などの第2の空間的分布がもたらされる。一実施形態では、第1の様式は、リポソーム、例えば

10

20

30

40

50

、ポリマーナノ粒子などのナノ粒子、及び例えば、ウイルスベクターなどの核酸から選択される、第1の要素を含む。第2の様式は、群から選択される、第2の要素を含む。一実施形態では、第1の送達様式は、例えば、細胞特異的受容体又は抗体などの第1の標的化要素を含み、及び第2の送達様式は、その要素を含まない。一実施形態では、第2の送達様式は、例えば、第2の細胞特異的受容体又は第2の抗体などの第2の標的化要素を含む。

【0391】

RNA誘導ヌクレアーゼ分子が、ウイルス送達ベクター、リボソーム、又はポリマーナノ粒子中で送達される場合、単一組織のみを標的化することが望ましくあってもよい場合に、複数組織への送達とそこでの治療活性の可能性がある。二部送達系は、この難題を解決して、組織特異性を高め得る。gRNA分子及びRNA誘導ヌクレアーゼ分子が、別個であるが重複する組織向性がある分離した送達ビヒクルにパッケージされれば、完全に機能的な複合体は、双方のベクターによって標的化される組織内のみに形成される。

10

【0392】

生体外送達

いくつかの実施形態では、表8に記載されている構成要素が細胞に導入され、次に細胞が対象に導入される。構成要素を導入する方法としては、例えば、表9に記載される送達方法のいずれかが挙げられ得る。

【0393】

VIII. 修飾ヌクレオシド、ヌクレオチド、及び核酸

20

本開示のいくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシド及び/又は修飾ヌクレオチドは、例えば、本明細書で提供されるgRNA分子などの核酸中に存在し得る。本発明のRNA誘導ヌクレアーゼ技術の文脈において有用ないくつかの例示的なヌクレオシド、ヌクレオチド、及び核酸の修飾が本明細書に提供され、熟練した技術者であれば、本開示に基づいて、本明細書で開示されるヌクレオシド、ヌクレオチド、及び核酸、並びに治療様式と併せて使用され得る追加的な適切な修飾を確認できるであろう。適切なヌクレオシド、ヌクレオチド、及び核酸の修飾としては、限定されることなく、そのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される、米国特許出願公開第2017/0073674号明細書(A1)、及び国際公開第2017/165862号(A1)に記載されているものが挙げられる。

【実施例】

30

【0394】

以下の実施例は単なる例示であり、本開示の範囲又は内容をどのようにも限定することは意図されない。

【0395】

実施例1：T細胞中のRHO対立遺伝子を編集するためのgRNAのスクリーニング
Cas9と共に使用するためのRHO遺伝子内の様々な位置を標的化し、およそ430個のgRNAを設計し、T細胞中の編集活性についてスクリーニングした。簡潔に述べると、SA-Cas9とガイドRNAは1：2の比率で複合体を形成し(RNP複合体)、電気穿孔を介してT細胞に送達された。電気穿孔の3日後、T細胞からgDNAを抽出し、gDNAから標的部位をPCR増幅した。RHO PCR遺伝子産物の配列解析は、次世代配列決定法(NGS)によって評価した。以下の表18は、T細胞中で0.1%超の編集を示したgRNAの標的化ドメインのRNA及びDNA配列を提供する。これらのデータは、表18及びCas9に記載される標的化ドメインを含むgRNAが、RHO遺伝子の編集をサポートしていることを示す。

40

【0396】

実施例2：HEK293細胞におけるRHO対立遺伝子の用量依存的編集

標的部位がRHO遺伝子のエクソン1又はエクソン2内にあると予測される3つのgRNA、RHO-3、RHO-7、及びRHO-10(表17)を選択してさらに最適化し、Cas9による用量依存的編集を試験した。簡潔に述べると、対照プラスミド(ヒトゲノム内の配列を標的化しないスクランブルgRNAを有するCas9を発現する)、又はCa

50

s 9 と g R N A を発現するプラスミドは、濃度を増加させながら電気穿孔法によって、H E K 2 9 3 細胞に送達した。電気穿孔の3日後、H E K 2 9 3 細胞から g D N A を抽出し、g D N A から g R N A 標的部位を P C R 増幅した。R H O P C R 遺伝子産物の配列解析は、N G S によって評価した。C a s 9 / g R N A プラスミドの濃度の増加は、R H O 遺伝子におけるインデルの80%への増加をサポートした(図4)。配列解析は、プラスミド濃度の増加がインデルの増加をもたらすことを示した。

【0397】

【表17】

表 17: RHO 遺伝子を標的化する gRNA

gRNA ID	標的化ドメイン(RNA)	標的化ドメイン(DNA)/ プロトスペーサー
RHO-3	AGUAUCCAUGCAGAGAGGUGUA (配列番号 102)	AGTATCCATGCAGAGAGGTGTA (配列番号 602)
RHO-7	CCCACACCCGGCUCAUACCGCC (配列番号 106)	CCCACACCCGGCTCATAACCGCC (配列番号 606)
RHO-10	GUGCCAUUACCUGGACCAGCCG (配列番号 109)	GTGCCATTACCTGGACCAGCCG (配列番号 609)

10

【0398】

g R N A (すなわち、R H O - 3、R H O - 7、R H O - 10) 及び C a s 9 リボ核タンパク質複合体の特異性は、C R I S P R - C a s 9 特異性のプロファイリングのために当業者に良く知られている2つの異なるアッセイ、D i g e n o m e - s e q (消化ゲノム配列決定) 及び G U I D E - s e q アッセイを用いて評価した。C a s 9 と複合体形成した R H O - 3、R H O - 7、又は R H O - 10 の各 g R N A を含む R N P の生理学的条件下では、明らかなオフターゲット編集は検出されなかった(データ未掲載)。

20

【0399】

実施例3: R H O - 3、R H O - 7、及び R H O - 10 の各 g R N A によるオンターゲット編集のシミュレーションによって生成された新規 R H O 対立遺伝子の特性評価
R H O 対立遺伝子の R H O - 3、R H O - 7、又は R H O - 10 の各 g R N A (表17の標的化ドメインを参照されたい) のオンターゲット編集によって生成された切断部位を予測した。図5は、R H O ヒト c D N A 上の R H O - 3、R H O - 7、又は R H O - 10 の各 g R N A の予測される切断位置と、結果として得られる R H O タンパク質の長さを示す。R H O - 3 はエクソン1を標的化すると予測され、R H O - 10 はエクソン2とイントロン2の境界を標的化すると予測され、R H O - 7 は R H O c D N A のエクソン1とイントロン1の境界を標的化すると予測される。R H O - 3、R H O - 10、又は R H O - 7 標的部位での1又は2塩基対の欠失は、R H O c D N A のフレームシフトを引き起こし、異常な R H O タンパク質をもたらすことが予測される。図6は、R H O - 3、R H O - 10、又は R H O - 7 の各 g R N A による編集の結果、予測される R H O 対立遺伝子の概略図を示す。

30

【0400】

R H O - 3、R H O - 7、又は R H O - 10 の各 g R N A によるオンターゲット編集で生成された対立遺伝子の効果を特性決定し、これらの g R N A を用いた編集が、潜在的に有害な R H O 対立遺伝子をもたらすかどうかを判定した。簡潔に述べると、野生型(WT)又は模擬編集された R H O 対立遺伝子を C M V プロモーターの制御下で哺乳類発現プラスミドにクローン化し、H E K 2 9 3 細胞にリポフェクトした。模擬編集された R H O 対立遺伝子には、図6に示した各変異対立遺伝子(すなわち、R H O - 3 (-1、-2、又は-3bp)、R H O - 10 (-1、-2、又は-3bp)、又は R H O - 7 (-1bp、-2bp、-3bp))が含まれた。網膜色素変性症の優性型につながるよく知られた P 2 3 H R H O 変異体もまたクローン化し、試験した。48時間の過剰発現後、A T P L i t e ルミネセンスアッセイ(Perkin Elmer)を使用して、WT及び各模擬編集された対

40

50

立遺伝子の細胞生存率を評価した。

【0401】

WT RHO の過剰発現は、ベクター対照 (pUC19 プラスミド、上の点線) と対比して、比較的細胞傷害性を示さなかったが、P23H RHO は予測どおり 50% の細胞死 (下の点線) をもたらした (図 7A)。さらに、RHO-3、RHO-7、又は RHO-10 の各 gRNA 標的部位での 1 塩基対又は 2 塩基対の欠失のフレームシフトの発現は、WT RHO と対比して細胞生存率の有意な損失を誘発しなかった (図 7A、RHO-3 1 及び 2 bp del; RHO-10 1 及び 2 bp del; 及び RHO-7 1 及び 2 bp del を参照されたい)。しかし、RHO-3 及び RHO-10 の各標的部位でのフレーム内の 3 塩基対の欠失では、細胞生存率が有意に低下し、P23H RHO と同等の細胞死レベルがもたらされた (図 7A、RHO-3 3 bp del 及び RHO-10 3 bp del を参照されたい)。RHO-7 配列での 3 塩基対の欠失は非細胞傷害性 RHO 対立遺伝子をもたらしただけで、これは全ての gRNA に当てはまるわけではなかった (図 7A、RHO-7 3 bp del を参照されたい)。

【0402】

次に、RHO-3、RHO-7、及び RHO-10 の各模擬編集された RHO 対立遺伝子が、RHO の P23H 変異型の毒性を低減し得るかどうかを判定するために、図 6 に示される、P23H 変異を含む模擬編集された RHO-3、RHO-7、及び RHO-10 の各 RHO 対立遺伝子を、CMV プロモーターの制御下で哺乳類発現プラスミドにクローン化して、HEK293 細胞にリポフェクトした。48 時間の過剰発現後、ATPLite ミネセンスアッセイ (Perkin Elmer) を使用して、WT 及び各模擬編集された対立遺伝子の細胞生存率を評価した。

【0403】

RHO-3、RHO-7、又は RHO-10 の各 gRNA 標的部位での 1 塩基対又は 2 塩基対の欠失のフレームシフトの発現は、RHO の P23H 変異型の毒性を低減し、WT RHO と比較して細胞生存率の有意な低下を誘発しなかった (図 7B、RHO-3 1 及び 2 bp del、RHO-10 1 及び 2 bp del 及び RHO-7 1 及び 2 bp del を参照されたい)。RHO-3 及び RHO-10 の各標的部位でのフレーム内の 3 塩基対の欠失は、細胞生存率の有意な損失があったため、RHO の P23H 変異型の毒性を低減せず、P23H RHO と同等の細胞死レベルをもたらしただけで (図 7B、RHO-3 3 bp del 及び RHO-10 3 bp del を参照されたい)。しかし、RHO-7 標的配列での 3 塩基対の欠失は、RHO の P23H 変異型の毒性を低減し、非細胞傷害性 RHO 対立遺伝子をもたらしただけで (図 7B、RHO-7 3 bp del を参照されたい)。

【0404】

これらのデータは、RHO-3、RHO-7、又は RHO-10 の各 gRNA によって生成されたフレーム外の RHO 編集が生産的で無毒であったのに対し、フレーム内の編集の効果は gRNA / 遺伝子座に依存していたことを示す。

【0405】

実施例 4: Cas9 と RHO 遺伝子を標的化する gRNA とを含むリポ核タンパク質による非ヒト霊長類外植片の編集

RHO 遺伝子を標的化する RHO-9 gRNA と Cas9 とを含むリポ核タンパク質が非ヒト霊長類 (NHP) からの外植片を編集する能力を評価した。RHO-9 gRNA (配列番号 108 (RNA)) (配列番号 608 (DNA))、表 1 に記載の標的化ドメイン配列を含む) は交差反応性であり、ヒト及び NHP RHO 配列の双方を編集し得る。

【0406】

簡潔に述べると、NHP ドナーからの網膜外植片を採取し、24 ウェルプレートのトランスウェルチャンバー上の膜に移した。300 µl の網膜培地を 24 ウェルプレートに添加した (すなわち、B27 (VitA 添加) 50X (20 mL)、Antibiotic - Antimycotic (5 mL)、及び GlutaMAX 1% (5 mL) を含有する Neurobasal-A 培地 (フェノールレッドなし) (470 mL))。RHO-9 gRNA、SA Cas9、及

び置換 RHO を含む二重 AAV による形質導入は、24 ~ 48 時間後に発生した。AAV を網膜培地で所望の力価 (10^{12} v.g./mL) に希釈し、合計 $100 \mu\text{L}$ で最終濃度を得た。希釈 / 力価測定された AAV を 24 ウェルプレートの外植片の上面に滴下した。 $300 \mu\text{L}$ の網膜培地を 72 時間ごとに補充した。2 ~ 4 週間後、外植片を溶解して、分子生物学分析用の DNA、RNA、及びタンパク質を取得した。外植片中の桿体の百分率を測定するために、桿体特異的 mRNA (神経網膜ロイシンジッパー (NRL)) を外植片から抽出して測定した。ハウスキーピング RNA (アクチン (ACTB)) もまた測定して、細胞の総数を判定した。

【0407】

図 8 に示されるように、各データ点は、異なる数の桿体光受容体含有し得る単一の外植片を表す。x 軸は、RT-qPCR によって測定された ACTB と NRL の RNA レベルの差を示し、これは、外植片を溶解した時の外植片の桿体の百分率の測定値である。有意な編集と桿体百分率の高さとの間の相関関係が示され、かなりの数の桿体を有する外植片中

10

で堅牢な編集レベルが達成され得ることが実証される (図 8)。これらのデータは、RHO を標的化する gRNA が、非ヒト霊長類外植片を効率的に編集できることを示す。

【0408】

実施例 5 : RHO 置換ベクターの最適化

RHO 置換ベクターの様々な構成要素 (例えば、プロモーター、UTR、RHO 配列) を最適化して、RHO mRNA 及び RHO タンパク質の最大発現に最適な RHO 置換ベクターを同定した。最初に、異なる長さの RHO プロモーターが RHO 発現に与える影響を試験するために、二重ルシフェラーゼ系を設計した。ルシフェラーゼ系の構成要素には、プラスミド濃度及び形質移入効率を正規化するために、CMV によって駆動されるウミシイタケルシフェラーゼが主鎖中に含まれていた (図 9)。

20

【0409】

簡潔に述べると、自己切断 T2A ペプチド ($100 \text{ ng} / 10,000$ 細胞) によって分離された、ホタルルシフェラーゼでタグ付けされた異なる長さの RHO プロモーターと RHO 遺伝子を含有するプラスミドを、NRL、CRX、及び NONO ($100 \text{ ng} / 10,000$) を発現するプラスミドと共に HEK293 細胞に形質移入して、RHO プロモーターからの発現をオンにした (その内容全体が参照により本明細書に援用される Yadav 2014 を参照されたい)。72 時間後、細胞を溶解し、形質移入効率 (Firefly) と実験変数 (NanoLuc) の双方を解析した。ルミネセンスの測定には、Nano-Glo (登録商標) Dual-Luciferase (登録商標) Reporter Assay System (Promega Corporation、カタログ番号 N1521) を用いた。Firefly と NanoLuc の双方からのルミネセンスを測定した。図 10 に示されるように、最小の 250 bp RHO プロモーター (配列番号 44) をはじめとする、異なる長さのプロモーターが機能的であることが示された。

30

【0410】

次に、様々な 3' UTR を試験して、3' UTR が、RHO mRNA 及び RHO タンパク質の発現を改善し得るかどうかを判断した。簡潔に述べると、非常に安定した転写産物と遺伝子からの 3' UTR を、CMV RHO の下流にクローン化した (すなわち、HBA1 3' UTR (配列番号 38)、短鎖 HBA1 3' UTR (配列番号 39)、TH 3' UTR (配列番号 40)、COL1A1 3' UTR (配列番号 41)、ALOX15 3' UTR (配列番号 42)、及び minUTR (配列番号 56))。ベクター (500 ng) を HEK293 細胞 ($80,000$ 細胞 / ウェル) に形質移入した。72 時間後、細胞を溶解し、RHO mRNA とタンパク質の発現レベルをそれぞれ RHO RT-qPCR と RHO ELISA アッセイを用いて判定した。図 11A は、安定した転写物からの 3' UTR の RHO 置換ベクターへの組み込みが、RHO mRNA 発現レベルを改善したことを示す。図 11B は、安定した転写物からの 3' UTR の RHO 置換ベクターへの組み込みが、RHO タンパク質発現レベルもまた改善したことを示す。

【0411】

次に、RHO イントロン 1、2、3、又は 4 の配列の組み込みを RHO 置換ベクター中の

50

R H O c D N A (すなわち、それぞれ、配列番号 4 ~ 7) に加えて、R H O タンパク質発現への影響を判定した。ベクター (5 0 0 及び 2 5 0 n g) を H E K 2 9 3 細胞 (8 0 , 0 0 0 / ウェル) に形質移入した。7 2 時間後、細胞を溶解し、R H O E L I S A を用いて R H O タンパク質の発現を判定した。図 1 2 は、イントロンの付加が R H O タンパク質の発現に影響を与えることを示す。

【 0 4 1 2 】

最後に、異なるコドン最適化 R H O c D N A コンストラクト (すなわち、配列番号 1 3 ~ 1 8) を試験して、R H O 発現に対するコドン最適化の影響を判定した。ベクター (5 0 0 及び 2 5 0 n g) を H E K 2 9 3 細胞 (8 0 , 0 0 0 / ウェル) に形質移入した。7 2 時間後、細胞を溶解し、R H O E L I S A を用いて R H O タンパク質の発現を判定した。図 1 3 は、R H O c D N A のコドン最適化が R H O タンパク質の発現に影響を及ぼすことを示す。

【 0 4 1 3 】

実施例 6 : 編集成功後に C a s 9 レベルを低下させる自己制限型 C a s 9 ベクター系を用いた生体内編集

C a s 9 と g R N A を発現する二重ベクター系が R H O ゲノムを編集して C a s 9 ベクターの発現を非機能的にする能力を、生体内で試験した。自己制限型ベクター系は、以前に公開されている (その内容全体が参照により本明細書に援用される、2018 年 6 月 14 日に公開され、Systems and Methods for One-Shot guide RNA (ogRNA) Targeting of Endogenous and Source DNA と題された国際公開第 2018/106693 号を参照されたい) 。簡潔に述べると、C a s 9 ベクターが、C a s 9 c D N A (S D C a s 9) 内の R H O g R N A の標的部位を含む、C a s 9 ベクター系が生成された。S D C a s 9 及び R H O ベクターの投与の 6 週間後に、C a s 9 タンパク質レベル、C a s 9 A A V 、及び R H O の編集を評価した。

【 0 4 1 4 】

図 1 4 A は、S D C a s 9 ベクター系が、C a s 9 レベルのサイレンシングに成功したことを実証する。図 1 4 B は、S D C a s 9 システムを保有するベクター系では、野生型 C a s 9 配列をコード化するベクター系と比較して、わずかに低いレベルではあるが、R H O 遺伝子座で堅牢な編集がもたらされたことを示す。

【 0 4 1 5 】

実施例 7 : R H O 遺伝子及び C a s 9 を標的化する g R N A を含むリボ核タンパク質によるヒト外植片の編集

R H O 遺伝子及び C a s 9 を標的化する R H O - 9 g R N A (表 1) を含むリボ核タンパク質がヒト外植片を編集する能力を評価した。簡潔に述べると、1 人のヒトドナーからの網膜外植片を採取し、2 4 ウェルプレートのトランスウェルチャンバー上の膜に移した。3 0 0 μ l の網膜培地を 2 4 ウェルプレートに添加した (すなわち、B 2 7 (V i t A 添加) 5 0 X (2 0 m L) 、Antibiotic-Antimycotic (5 m L) 、GlutaMAX1 % (5 m L) を含有する Neurobasal-A 培地 (フェノールレッドなし) (4 7 0 m L)) 。異なる「ノックダウン及び置換」ストラテジーを比較した：「s h R N A」：R H O 遺伝子を標的化する s h R N A と R H O c D N A を提供する置換ベクターとによる、網膜外植片の形質導入 (Cideciyan 2018 で公開された) ；「ベクター A」：2 ベクター系 (最小 R H O プロモーター (2 5 0 b p) によって駆動される s a C a s 9 を含むベクター 1 、及びコドン最適化された R H O c D N A (コドン 6 (配列番号 1 8)) を含む、及び最小 2 5 0 b p R H O プロモーターの制御下にある H B A 1 3 ' U T R 、及び U 6 プロモーターの制御下にある R H O - 9 g R N A を含むベクター 2) ；「ベクター B」：ベクター 2 が w t R H O c D N A を含むこと以外は、「ベクター A」と同一である 2 ベクター系；及び「U T C」：非形質導入対照。各 A A V を網膜培地で所望の力価 (1 \times 1 0 ¹² v g / m L) に希釈し、合計 1 0 0 μ l で最終濃度を得た。希釈 / 力価測定された A A V を 2 4 ウェルプレートの外植片の上面に滴下した。3 0 0 μ l の網膜培地を 7 2 時間ごとに補充した。4 週間後、外植片を溶解し、分子生物学分析のためにタンパク質を得た。

RHOタンパク質：総タンパク質の比率を測定した。データは、ベクターA（最小の250bpプロモーター、RHO cDNA、HBA1 3'UTR、及びRHO-9 gRNAを含む）がRHOタンパク質の強力な発現をもたらしたことを示す（図15）。

【0416】

実施例8：遺伝子編集システムのそれを必要とする患者への投与

adRPを呈するヒト患者に、2つのAAV5ベースの発現ベクターを含む遺伝子編集システムを投与する。

【0417】

ベクター1は、S. アウレウス (S. aureus) Cas9タンパク質をコード化する核酸配列を含み、GRK1プロモーターの制御下にあるか、又はRHO最小プロモーター（例えば、250bp RHOプロモーター）の制御下にある、核局在化配列によって各部位において挟まれる。

10

【0418】

ベクター2は、それぞれU6プロモーターの制御下にある、1つ又は複数のガイドRNAをコード化する核酸配列を含む。1つ又は複数のガイドRNAの標的化ドメインは、独立して、以下の配列から選択される：

RHO-1：GUCAGCCACAAAGGGCCACAGCC（配列番号100）

RHO-2：CCGAAGACGAAGUAUCCAUAGCA（配列番号101）

RHO-3：AGUAUCCAUAGCAGAGAGGUGUA（配列番号102）

RHO-4：CUAGGUUGAGCAGGAUGUAGUU（配列番号103）

20

RHO-5：CAUGGCUCAGCCAGGUAGUACU（配列番号104）

RHO-6：ACGGGUGUGGUACGCAGCCCCU（配列番号105）

RHO-7：CCCCACACCCGGGCUCAUAACCGCC（配列番号106）

RHO-8：CCCUUGGGCGGUUAUGAGCCGGGU（配列番号107）

RHO-9：CCAUCAUGGGGCGUUGCCUUCAC（配列番号108）

RHO-10：GUGCCAUAUACCUUGGACCAGCCG（配列番号109）

RHO-11：UUACCUGGACCAGCCGGCGAGU（配列番号110）。

【0419】

ガイドRNAをコード化する核酸配列は、U6プロモーターの制御下にある。ベクター2は、RHO遠位エンハンサーの一部とRHO近位プロモーター領域の一部を含む、最小RHOプロモーター配列の制御下にある、RHO 5'-UTR、RHO cDNAをコード化する上流配列と、HBA1 3'-UTRをコード化する下流配列とを含む核酸をさらに含む。ベクター2の[プロモーター] - [5'UTR] - [cDNA] - [3'UTR]配列は、次のようである：

30

40

50

【化 2 8】

CCACGTCAGAATCAAACCCTCACCTTAACCTCATTAGCGTTGGGCATAATCACCAGGCCAAG
 CGCCTTAAACTACGAGAGGCCCCATCCCACCCGCCCTGCCTTAGCCCTGCCACGTGTGCCAA
 ACGCTGTTAGACCAACACCACCCAGGCCAGGTAGGGGGCTGGAGCCCAGGTGGGCATTTGA
 GTCACCAACCCCCAGGCAGTCTCCCTTTTCTGGATCCTGAGTACCTCTCCTCCCTGACCTC
 AGGCTTCCTCCTAGTGTACCTTGGCCCCCTCTTAGAAGCCAATTAGGCCCTCAGTTTCTGCA
 GCGGGGATTAATATGATTATGAACACCCCAATCTCCAGATGCTGATTACAGCCAGGAGCTT
 AGGAGGGGGAGGTCACTTTATAAGGGTCTGGGGGGGTGAGAACCAGAGTCATCCAGCTGGA
 GCCCTGAGTGGCTGAGCTCAGGCCTTCGCAGCATTCTTGGGTGGGAGCAGCCACGGGTGAGC
 CACAAGGGCCACCACC
 ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGGTACG
 CAGCCCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCG
 CCTACATGTTTCTGCTGATCGTGCTGGGCTTCCCCATCAACTTCTCAGCTCTACGTCACC
 GTCCAGCACAGAAGCTGCGCACGCCTCTCAACTACATCCTGCTCAACCTAGCCGTGGCTGA
 CCTCTTCATGGTCTAGGTGGCTTACCAGCACCTCTACACCTCTCTGCATGGATACTTCG
 TCTTCGGGCCCACAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTTGCCACCCTGGGCGGTGAAATTGCC
 CTGTGGTCTTGGTGGTCTTGGCCATCGAGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAA
 CTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTACCTGGGTGATGGCGCTGG
 CCTGCGCCGCACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGCTCG
 TGTGGAATCGACTACTACACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTGCTATACAT
 GTTCGTGGTCCACTTACCATCCCCATGATTATCATCTTTTTCTGCTATGGGCAGCTCGTCT
 TCACCGTCAAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAG
 GAGGTCACCCGCATGGTCATCATCATGGTTCATCGCTTTCTGATCTGCTGGGTGCCCTACGC
 CAGCGTGGCATTCTACATCTTACCCACCAGGGCTCCAACCTTCGGTCCCATCTTCATGACCA
 TCCCAGCGTTCTTTGCCAAGAGCGCCGCCATCTACAACCCTGTGCTATATCATGATGAAC
 AAGCAGTTCCGGAAGTGCATGCTCACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCACTGGGTGACGA
 TGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCCTAAGCTGGAG
 CCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCTTGGGCCCTCCCCCAGCCCTCCTCCCCTTCTGTCAC
 CCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCA (配列番号8)

10

20

【0 4 2 0】

R H O c D N A 中に存在する野生型 R H O 配列に結合する標的化ドメインを含むガイド
 R N A が使用される場合、R H O c D N A のコドン修飾バージョンは、上記の核酸コン
 ストラクトに含まれる R H O c D N A を置換してもよい。

30

【0 4 2 1】

ベクター 1 とベクター 2 は、当該技術分野で公知の方法に従ってウイルス粒子にパッケー
 ジ化され、約 3 0 0 m L の $1 \times 10^{11} \sim 3 \times 10^{11}$ ウイルスゲノム (v g) / m L の
 用量で、網膜下注射を介して患者に送達される。患者は投与後にモニターされ、定期的に
 a d R P に関連する 1 つ又は複数の症状の評価を受ける。例えば、患者は、例えば、暗順
 応微小視野測定によって、定期的に桿体光受容体の機能の評価を受ける。ベクター 1 及び
 ベクター 2 の投与から約 1 年後、患者は、例えば、桿体機能の安定化など、少なくとも 1
 つの a d R P に関連する症状の改善を示し、これは、臨床的介入がない場合、患者、又は
 適切な対照群における桿体機能の予想レベルと比較して、桿体機能が改善されることを特
 徴とする。

40

【0 4 2 2】

50

【表 18 - 1】

表 18: HEK293T 細胞において RHO 対立遺伝子の 0.1% 超の編集を提供する gRNA

gRNA ID	標的化ドメイン(RNA)	標的化ドメイン(DNA)/ プロトSpacer
RHO-1	GUCAGCCACAAGGGCCACAGCC (配列番号 100)	GTCAGCCACAAGGGCCACAGCC (配列番号 600)
RHO-2	CCGAAGACGAAGUAUCCAUGCA (配列番号 101)	CCGAAGACGAAGTATCCATGCA (配列番号 601)
RHO-3	AGUAUCCAUGCAGAGAGGUGUA (配列番号 102)	AGTATCCATGCAGAGAGGTGTA (配列番号 602)
RHO-4	CUAGGUUGAGCAGGAUGUAGUU (配列番号 103)	CTAGGTTGAGCAGGATGTAGTT (配列番号 603)
RHO-5	CAUGGCUCAGCCAGGUAGUACU (配列番号 104)	CATGGCTCAGCCAGGTAGTACT (配列番号 604)
RHO-6	ACGGGUGUGGUACGCAGCCCCU (配列番号 105)	ACGGGTGTGGTACGCAGCCCCT (配列番号 605)
RHO-7	CCCACACCCGGCUCAUACCGCC (配列番号 106)	CCCACACCCGGCTCATACCGCC (配列番号 606)
RHO-8	CCCUGGGCGGUAUGAGCCGGGU (配列番号 107)	CCCTGGGCGGTATGAGCCGGGT (配列番号 607)
RHO-9	CCAUCAUGGGCGUUGCCUUCAC (配列番号 108)	CCATCATGGGCGTTGCCTTCAC (配列番号 608)

10

20

【 0 4 2 3 】

30

40

50

【表 18 - 2】

RHO-10	GUGCCAUUACCUAGGACCAGCCG (配列番号 109)	GTGCCATTACCTGGACCAGCCG (配列番号 609)
RHO-11	UUACCUAGGACCAGCCGGCGAGU (配列番号 110)	TTACCTGGACCAGCCGGCGAGT (配列番号 610)
RHO-12	GCAUUCUUGGGUGGGAGCAGCC (配列番号 111)	GCATTCTTGGGTGGGAGCAGCC (配列番号 611)
RHO-13	GCUCAGCCACUCAGGGCUCCAG (配列番号 112)	GCTCAGCCACTCAGGGCTCCAG (配列番号 612)
RHO-14	UGACCCGUGGCUGCUCCACCC (配列番号 113)	TGACCCGTGGCTGCTCCACCC (配列番号 613)
RHO-15	AGCUCAGGCCUUCGCAGCAUUC (配列番号 114)	AGCTCAGGCCTTCGCAGCATTC (配列番号 614)
RHO-17	ACACGCUGAGGAGAGCUGGGCA (配列番号 116)	ACACGCTGAGGAGAGCTGGGCA (配列番号 616)
RHO-18	GCAAUAACUUCUUUUUUUUUU (配列番号 117)	GCAAATAACTTCCCCCATTTCC (配列番号 617)
RHO-19	AGACCCAGGCUGGGCACUGAGG (配列番号 118)	AGACCCAGGCTGGGCACTGAGG (配列番号 618)
RHO-20	CUAGGUCUCCUGGCUGUGAUCC (配列番号 119)	CTAGGTCTCCTGGCTGTGATCC (配列番号 619)
RHO-21	CCAGAAGGUGGGUGUGCCACUU (配列番号 120)	CCAGAAGGTGGGTGTGCCACTT (配列番号 620)
RHO-24	GGGCGUCACACAGGGACGGGUG (配列番号 123)	GGGCGTCACACAGGGACGGGTG (配列番号 623)
RHO-25	CUGUGAUCCAGGAUAUCUCUG (配列番号 124)	CTGTGATCCAGGAATATCTCTG (配列番号 624)
RHO-26	UUGCAUUUAACAGGAAAACAGA (配列番号 125)	TTGCATTTAACAGGAAAACAGA (配列番号 625)
RHO-27	GGAGUGCACCCUCCUUAGGCAG (配列番号 126)	GGAGTGCACCCTCCTTAGGCAG (配列番号 626)
RHO-28	CAUCUGUCCUGCUCACCACCCC (配列番号 127)	CATCTGTCCTGCTCACCACCCC (配列番号 627)
RHO-29	GAGGGGAGGCAGAGGATGCCAG (配列番号 128)	GAGGGGAGGCAGAGGATGCCAG (配列番号 628)
RHO-30	CUCAGGGAAUCUCUGGCCAUUG (配列番号 129)	CTCAGGGAATCTCTGGCCATTG (配列番号 629)
RHO-31	UGCACUUUUUUUAGACAGGGA (配列番号 130)	TGCACTCCCCCTAGACAGGGA (配列番号 630)
RHO-32	UGCUGUUUGUGCAGGGCUGGCA (配列番号 131)	TGCTGTTTGTGCAGGGCTGGCA (配列番号 631)
RHO-33	ACUGGGACAUUCCUAACAGUGA (配列番号 132)	ACTGGGACATTCTTAACAGTGA (配列番号 632)
RHO-35	CUCCUCUCUGGGGCCCCAAGCU (配列番号 134)	CTCCTCTCTGGGGCCCCAAGCT (配列番号 634)
RHO-36	CUGCAUCUCAGCAGAGAUUUC (配列番号 135)	CTGCATCTCAGCAGAGATATTC (配列番号 635)
RHO-37	UGUUUUUUUUGAGCAGCUGUG (配列番号 136)	TGTTTCCCTTGAGCAGCTGTG (配列番号 636)
RHO-40	CCUAGGAGAGGCCCCACAUGU (配列番号 139)	CCTAGGAGAGGCCCCACATGT (配列番号 639)

10

20

30

40

【 0 4 2 4 】

50

【表 18 - 3】

RHO-41	AUCACUCAGUUCUGGCCAGAAG (配列番号 140)	ATCACTCAGTTCTGGCCAGAAG (配列番号 640)
RHO-42	AGAGCUGGGCAAAGAAAUCCA (配列番号 141)	AGAGCTGGGCAAAGAAATCCA (配列番号 641)
RHO-43	CCACCCCAUGAAGUCCAAGG (配列番号 142)	CCACCCCATGAAGTCCATAGG (配列番号 642)
RHO-44	CCACCCUGAGCUUGGGCCCCCA (配列番号 143)	CCACCCCTGAGCTTGGGCCCCCA (配列番号 643)
RHO-45	CAGAGGAAGAAGAAGGAAAUGA (配列番号 144)	CAGAGGAAGAAGAAGGAAATGA (配列番号 644)
RHO-46	AAACAGCAGCCCGGCUAUCACC (配列番号 145)	AAACAGCAGCCCGGTATCACC (配列番号 645)
RHO-49	UCACACAGGGACGGGUGCAGAG (配列番号 148)	TCACACAGGGACGGGTGCAGAG (配列番号 648)
RHO-51	UGAGCUUGGGCCCCCAGAGAGG (配列番号 150)	TGAGCTTGGGCCCCCAGAGAGG (配列番号 650)
RHO-52	AAUAUCUCUGCUGAGAUGCAGG (配列番号 151)	AATATCTCTGCTGAGATGCAGG (配列番号 651)
RHO-53	GGAGAGGGGAAGAGACUCAUUU (配列番号 152)	GGAGAGGGGAAGAGACTCATTT (配列番号 652)
RHO-54	AGAACUGAGUGAUCUGUGAUUA (配列番号 153)	AGAACTGAGTGATCTGTGATTA (配列番号 653)
RHO-55	CCACUCUCCCUAUGGAACUUA (配列番号 154)	CCACTCTCCCTATGGAATTCA (配列番号 654)
RHO-57	UGGAUUUCCAUUCUCCAGUCA (配列番号 156)	TGGATTTTCCATTCTCCAGTCA (配列番号 656)
RHO-58	GUGCAGGAGCCCGGGAGCAUGG (配列番号 157)	GTGCAGGAGCCCGGGAGCATGG (配列番号 657)
RHO-59	GGGUGGUGAGCAGGACAGAUU (配列番号 158)	GGGTGGTGAGCAGGACAGATGT (配列番号 658)
RHO-60	CAGCUCUCCCUAGUGCCCAGC (配列番号 159)	CAGCTCTCCCTCAGTGCCCAGC (配列番号 659)
RHO-61	CCUGCUGGGGCGUCACACAGGG (配列番号 160)	CCTGCTGGGGCGTCACACAGGG (配列番号 660)
RHO-63	ACUUACGGGUGGUUGUUCUCUG (配列番号 162)	ACTTACGGGTGGTTGTTCTCTG (配列番号 662)
RHO-64	CACAGGGAAGACCCAAUGACUG (配列番号 163)	CACAGGGAAGACCCAATGACTG (配列番号 663)
RHO-65	AGCACAGACCCACUGCCUAAG (配列番号 164)	AGCACAGACCCCACTGCCTAAG (配列番号 664)
RHO-66	ACCUGAGGACAGGGCUGAGAG (配列番号 165)	ACCTGAGGACAGGGGCTGAGAG (配列番号 665)
RHO-67	CAACAAUGGCCAGAGAUUCCCU (配列番号 166)	CAACAATGGCCAGAGATTCCCT (配列番号 666)
RHO-68	UGCUGCCUCGGUCCCAUUCUA (配列番号 167)	TGCTGCCTCGGTCCCATTCTCA (配列番号 667)
RHO-69	UGCUGCCUGGCCACAUCCUAA (配列番号 168)	TGCTGCCTGGCCACATCCCTAA (配列番号 668)
RHO-70	GCCACUCUCCCUAUGGAACUUC (配列番号 169)	GCCACTCTCCCTATGGAATTCT (配列番号 669)

【 0 4 2 5 】

10

20

30

40

50

【表 18 - 4】

RHO-71	GAGGGAGGAAGGACUGCCAAUU (配列番号 170)	GAGGGAGGAAGGACTGCCAATT (配列番号 670)
RHO-72	GAGGGUAGCUAGGAAGGCAACC (配列番号 171)	GAGGGTAGCTAGGAAGGCAACC (配列番号 671)
RHO-73	GGAAGGCAACCAGGAGUGGGAG (配列番号 172)	GGAAGGCAACCAGGAGTGGGAG (配列番号 672)
RHO-74	GCUGAGAUGCAGGAGGAGACGC (配列番号 173)	GCTGAGATGCAGGAGGAGACGC (配列番号 673)
RHO-75	AGGCUAGGAGGGGCACCUGAGGA (配列番号 174)	AGGCTGGAGGGGCACCTGAGGA (配列番号 674)
RHO-76	AGGAAGGCAACCAGGAGUGGGA (配列番号 175)	AGGAAGGCAACCAGGAGTGGGA (配列番号 675)
RHO-77	CCGGGAGCAUGGAGGGGUCUGG (配列番号 176)	CCGGGAGCATGGAGGGGTCTGG (配列番号 676)
RHO-78	GGAUAAACAGAUCCACUUAACA (配列番号 177)	GGATAACAGATCCCACTTAACA (配列番号 677)
RHO-79	AGGCAGAGGAUGCCAGAGGGGA (配列番号 178)	AGGCAGAGGATGCCAGAGGGGA (配列番号 678)
RHO-80	GGGCCCCAAGCUCAGGUGGGAA (配列番号 179)	GGGCCCCAAGCTCAGGUGGGAA (配列番号 679)
RHO-81	UAACUAUAUGGCCACUCUCCCU (配列番号 180)	TAACATATATGGCCACTCTCCCT (配列番号 680)
RHO-82	UCCACACUUAACAGAGAGGAAAA (配列番号 181)	TCCCACTTAACAGAGAGGAAAA (配列番号 681)
RHO-83	GAAUGCAGAGGUGGUGGAAACC (配列番号 182)	GAATGCAGAGGTGGTGGAAACC (配列番号 682)
RHO-84	GGGAGACAGGGCAAGGCUGGCA (配列番号 183)	GGGAGACAGGGCAAGGCTGGCA (配列番号 683)
RHO-85	CACCACCCCAUGAAGUCCAUA (配列番号 184)	CACCACCCCATGAAGTTCATA (配列番号 684)
RHO-86	GCCAUUAUAGUUAUCAACCAAA (配列番号 185)	GCCATATAGTTAATCAACCAAA (配列番号 685)
RHO-87	GUAGCUAGGAAGGCAACCAGGA (配列番号 186)	GTAGCTAGGAAGGCAACCAGGA (配列番号 686)
RHO-88	CACAUUGCUUCAUGGCUCUAG (配列番号 187)	CACATTGCTTCATGGCTCCTAG (配列番号 687)
RHO-89	CUGAGCUUGGGCCCCCAGAGAG (配列番号 188)	CTGAGCTTGGGCCCCCAGAGAG (配列番号 688)
RHO-90	ACCGAGCCCAUUGCCCAGCACA (配列番号 189)	ACCGAGCCCATGCCCAGCACA (配列番号 689)
RHO-91	CUCAAAGAAGUCAAGCGCCUG (配列番号 190)	CTCAAAGAAGTCAAGCGCCCTG (配列番号 690)
RHO-92	GCUACCCUCUCCUGUCUAGGG (配列番号 191)	GCTACCCCTCTCCCTGTCTAGGG (配列番号 691)
RHO-93	ACCCUGAGCUUGGGCCCCCAGA (配列番号 192)	ACCCTGAGCTTGGGCCCCCAGA (配列番号 692)
RHO-94	GGCAGAGGGACCACACGCUGAG (配列番号 193)	GGCAGAGGGACCACACGCTGAG (配列番号 693)
RHO-95	UCUGACUCAGCACAGCUGCUCC (配列番号 194)	TCTGACTCAGCACAGCTGCTCC (配列番号 694)

10

20

30

40

【 0 4 2 6 】

50

【表 18 - 5】

RHO-96	CUCUCAGCCACCACCGCCAAGC (配列番号 195)	CTCTCAGCCACCACCGCCAAGC (配列番号 695)
RHO-97	AGGGAUGUGGCCAGGCAGCAAC (配列番号 196)	AGGGATGTGGCCAGGCAGCAAC (配列番号 696)
RHO-98	CACCUGAGGACAGGGGCTGAGA (配列番号 197)	CACCTGAGGACAGGGGCTGAGA (配列番号 697)
RHO-99	GCCCAUGAUGGCAUGGUUCUCC (配列番号 198)	GCCCATGATGGCATGGTTCTCC (配列番号 698)
RHO-100	GAAGGGGCAGAGGGACCACACG (配列番号 199)	GAAGGGGCAGAGGGACCACACG (配列番号 699)
RHO-101	AGCACCCUCUACACCUCUCUGC (配列番号 200)	AGCACCTCTACACCTCTCTGC (配列番号 700)
RHO-102	CUUUGGAUAACAUUGACAGGAC (配列番号 201)	CTTTGGATAACATTGACAGGAC (配列番号 701)
RHO-103	GGUGAAGCCACCUAGGACCAUG (配列番号 202)	GGTGAAGCCACCTAGGACCATG (配列番号 702)
RHO-104	UAACAUUGACAGGACAGGAGAA (配列番号 203)	TAACATTGACAGGACAGGAGAA (配列番号 703)
RHO-105	GGGAGAGGGGAAGAGACUCAUU (配列番号 204)	GGGAGAGGGGAAGAGACTCATT (配列番号 704)
RHO-106	GCUGUGCUGAGUCAGACCCAGG (配列番号 205)	GCTGTGCTGAGTCAGACCCAGG (配列番号 705)
RHO-107	UUGAGGAGGCCUUGGGGAAGGA (配列番号 206)	TTGAGGAGGCCCTGGGGAAGGA (配列番号 706)
RHO-108	GCCCCGGGAGCAUGGAGGGGUCU (配列番号 207)	GCCCCGGGAGCATGGAGGGGTCT (配列番号 707)
RHO-109	GUAACUGGGACUGACCCUGCA (配列番号 208)	GTAAACTGGGACTGACCCTGCA (配列番号 708)
RHO-110	AUAACAUUGACAGGACAGGAGA (配列番号 209)	ATAACATTGACAGGACAGGAGA (配列番号 709)
RHO-111	GGCAGGGAGGCUGGAGGGGCAC (配列番号 210)	GGCAGGGAGGCTGGAGGGGCAC (配列番号 710)
RHO-112	GCAAACAUGGCCCGAGAUAGAU (配列番号 211)	GCAAACATGGCCCCGAGATAGAT (配列番号 711)
RHO-113	GGACCGAGCCCAUUGCCCAGCA (配列番号 212)	GGACCGAGCCCATTGCCAGCA (配列番号 712)
RHO-114	GCUCUACGUCACCGUCCAGCAC (配列番号 213)	GCTCTACGTCACCGTCCAGCAC (配列番号 713)
RHO-115	AGCACAGCUGCUCCAAGGGAAA (配列番号 214)	AGCACAGCTGCTCCAAGGGAAA (配列番号 714)
RHO-116	CUAAAAGCAAAAAGGAACUGCUU (配列番号 215)	CTAAAGCAAAAAGGAACTGCTT (配列番号 715)
RHO-117	GAGAGGAAAACUGAGGCAGGGA (配列番号 216)	GAGAGGAAAACUGAGGCAGGGA (配列番号 716)
RHO-118	CAUUGCAAAGCUGGGUGACGGG (配列番号 217)	CATTGCAAAGCTGGGTGACGGG (配列番号 717)
RHO-119	UUGCCACCCUGGGCGGUAUGAG (配列番号 218)	TTGCCACCCTGGGCGGTATGAG (配列番号 718)
RHO-120	AGCUAGGAAGGCAACCAGGAGU (配列番号 219)	AGCTAGGAAGGCAACCAGGAGT (配列番号 719)

10

20

30

40

【 0 4 2 7 】

50

【表 18 - 6】

RHO-121	UCUCUGGGGGCCCAAGCUCAGG (配列番号 220)	TCTCTGGGGGGCCCAAGCTCAGG (配列番号 720)
RHO-122	AGCACAGGGAAGACCCAAUGAC (配列番号 221)	AGCACAGGGAAGACCCAAATGAC (配列番号 721)
RHO-123	GUUGACUGAAUAUAUGAGGCGU (配列番号 222)	GTTGACTGAATATATAGAGGCT (配列番号 722)
RHO-124	UUGUAAACUGGGACUGACCCUG (配列番号 223)	TTGTAAACTGGGACTGACCCTG (配列番号 723)
RHO-125	CACACCCACCUUCUGGCCAGAA (配列番号 224)	CACACCCACCTTCTGGCCAGAA (配列番号 724)
RHO-126	CCAGAGGAAGAAGAAGGAAUG (配列番号 225)	CCAGAGGAAGAAGAAGGAAATG (配列番号 725)
RHO-127	GAGAUUAUCCUGGAUCACAGCC (配列番号 226)	GAGATATTCCTGGATCACAGCC (配列番号 726)
RHO-128	AGGGGCAGAGGGACCACACGCU (配列番号 227)	AGGGGCAGAGGGACCACACGCT (配列番号 727)
RHO-129	AACUAUAUGGCCACUCUCCCUA (配列番号 228)	AACTATATGGCCACTCTCCCTA (配列番号 728)
RHO-130	GCUGCUUGCGGUUCUACACCC (配列番号 229)	GCTGCTTGGGTTCTCAACACC (配列番号 729)
RHO-131	CACCAUGAAUGGUGUUUGUUGA (配列番号 230)	CACCATGAATGGTGTGTTGTTGA (配列番号 730)
RHO-132	GCAGCCAUUGCAAAGCUGGGUG (配列番号 231)	GCAGCCATTGCAAAGCTGGGTG (配列番号 731)
RHO-133	UGACUCAGCACAGCUGCUCCAA (配列番号 232)	TGACTCAGCACAGCTGCTCCAA (配列番号 732)
RHO-134	CUGGGAGGAGGGGAAGGGGCA (配列番号 233)	CTGGGAGGAGGGGAAGGGGCA (配列番号 733)
RHO-135	GAUAACAUUGACAGGACAGGAG (配列番号 234)	GATAACATTGACAGGACAGGAG (配列番号 734)
RHO-136	CCAAACUGGGACAUCCUAACA (配列番号 235)	CCAAACTGGGACATTCTTAACA (配列番号 735)
RHO-137	AGGAAAACAGAUAGGGGUGCUGC (配列番号 236)	AGGAAAACAGATGGGGTGCTGC (配列番号 736)
RHO-138	CGGACAUGUGGGGGCCUCUCCU (配列番号 237)	CGGACATGTGGGGGCCTCTCCT (配列番号 737)
RHO-139	GCAAAGAAAUCCAGGGAAUGG (配列番号 238)	GCAAAGAAATCCAGGGAATGG (配列番号 738)
RHO-140	CCAGGAGACUUGGAACGCGGCA (配列番号 239)	CCAGGAGACTTGAACGCGGCA (配列番号 739)
RHO-141	UGGUCCUUGGUGUCCUGGCCA (配列番号 240)	TGGTCCTTGGTGGTCCTGGCCA (配列番号 740)
RHO-142	AAUGGAAAAUCCACUCCACC (配列番号 241)	AATGGAAAAATCCACTTCCCACC (配列番号 741)
RHO-143	GCCCGAAGACGAAGUAUCCAUG (配列番号 242)	GCCCGAAGACGAAGTATCCATG (配列番号 742)
RHO-144	GUGCUGGACGGUGACGUAGAGC (配列番号 243)	GTGCTGGACGGTGACGTAGAGC (配列番号 743)
RHO-145	AGAAACAUGUAGGCGGCCAGCA (配列番号 244)	AGAAACATGTAGGCGGCCAGCA (配列番号 744)

10

20

30

40

【 0 4 2 8 】

【表 18 - 7】

RHO-146	CCGCUCGAUGGCCAGGACCACC (配列番号 245)	CCGCTCGATGGCCAGGACCACC (配列番号 745)
RHO-147	UCAGCACAGACCCACUGCCUA (配列番号 246)	TCAGCACAGACCCACTGCCTA (配列番号 746)
RHO-148	GAAUAUCUCUGCUGAGAUGCAG (配列番号 247)	GAATATCTCTGCTGAGATGCAG (配列番号 747)
RHO-149	GAGUACCCACAGUACUACCUGG (配列番号 248)	GAGTACCCACAGTACTACCTGG (配列番号 748)
RHO-150	CAACCAGGAGUGGGAGAGGGAU (配列番号 249)	CAACCAGGAGTGGGAGAGGGAT (配列番号 749)
RHO-151	UUGAGAACCGCAAGCAGCCGCU (配列番号 250)	TTGAGAACCGCAAGCAGCCGCT (配列番号 750)
RHO-152	GCAAGCCAGACCCUCCUCUCU (配列番号 251)	GCAAGCCAGACCCCTCCTCTCT (配列番号 751)
RHO-153	GAGAGCUGGGCAAAGAAAUCC (配列番号 252)	GAGAGCTGGGCAAAGAAATTCC (配列番号 752)
RHO-154	CGAGGCAGCAGCCUGGACAUGG (配列番号 253)	CGAGGCAGCAGCCTGGACATGG (配列番号 753)
RHO-155	AGGAAUAUCUCUGCUGAGAUGC (配列番号 254)	AGGAATATCTCTGCTGAGATGC (配列番号 754)
RHO-156	UUCCCGAGAAGGGAGAGGGAGG (配列番号 255)	TTCCCGAGAAGGGAGAGGGAGG (配列番号 755)
RHO-157	UCCUCCUCCUCCUCCUUCUC (配列番号 256)	TCCTTCTCCCTCTCCCTTCTC (配列番号 756)
RHO-158	UGUUUUGCCCAGAGGAAGAAGA (配列番号 257)	TGTTTTGCCCAGAGGAAGAAGA (配列番号 757)
RHO-159	CCGGCUGGUCCAGGUAAUGGCA (配列番号 258)	CCGGCTGGTCCAGGTAATGGCA (配列番号 758)
RHO-160	CAGCACAGGGAAGACCCAAUGA (配列番号 259)	CAGCACAGGGAAGACCCAATGA (配列番号 759)
RHO-161	ACCAGGAGUGGGAGAGGGAUUU (配列番号 260)	ACCAGGAGTGGGAGAGGGATTT (配列番号 760)
RHO-162	GCUGGUGAAGCCACCUAGGACC (配列番号 261)	GCTGGTGAAGCCACCTAGGACC (配列番号 761)
RHO-163	GGCGGUAUGAGCCGGGUGUGGG (配列番号 262)	GGCGGTATGAGCCGGGTGTGGG (配列番号 762)
RHO-164	CAGCCAUUGCAAAGCUGGGUGA (配列番号 263)	CAGCCATTGCAAAGCTGGGTGA (配列番号 763)
RHO-165	ACAUUGACAGGACAGGAGAAGG (配列番号 264)	ACATTGACAGGACAGGAGAAGG (配列番号 764)
RHO-166	UGGGUCUCCUGUGCUGGGCA (配列番号 265)	TGGGTCTTCCTGTGCTGGGCA (配列番号 765)
RHO-167	GUACGUGGUGGUGUGUAAGCCC (配列番号 266)	GTACGTGGTGGTGTGTAAGCCC (配列番号 766)
RHO-168	AGCAAUAACUCCCCCAUCC (配列番号 267)	AGCAAATAACTCCCCCATTC (配列番号 767)
RHO-169	GGAUUUGAGGAGGCCUUGGGGA (配列番号 268)	GGATTTGAGGAGGCCCTGGGGA (配列番号 768)
RHO-170	CCCUGAGCUUGGGCCCCCAGAG (配列番号 269)	CCCTGAGCTTGGGCCCCCAGAG (配列番号 769)

10

20

30

40

【 0 4 2 9 】

50

【表 18 - 8】

RHO-171	CAGAGAUUCCUGAGAAUGGGA (配列番号 270)	CAGAGATTCCCTGAGAATGGGA (配列番号 770)
RHO-172	GAGUUGGAAGCCCGCAUCUAUC (配列番号 271)	GAGTTGGAAGCCCGCATCTATC (配列番号 771)
RHO-173	AGUCCUCCUCCUCCUCCUUC (配列番号 272)	AGTCCTTCCTCCCTCTCCCTTC (配列番号 772)
RHO-174	GUUAUUUCAUUUCCCGAGAAGG (配列番号 273)	GTTATTTTCAATTTCCCGAGAAGG (配列番号 773)
RHO-175	AUUUCAUUUCCCGAGAAGGGAG (配列番号 274)	ATTTCAATTTCCCGAGAAGGGAG (配列番号 774)
RHO-176	GACGUAGAGCGUGAGGAAGUUG (配列番号 275)	GACGTAGAGCGTGAGGAAGTTG (配列番号 775)
RHO-177	CAUUUCCCGAGAAGGGAGAGGG (配列番号 276)	CATTTCCCGAGAAGGGAGAGGG (配列番号 776)
RHO-178	GUAGAGCGUGAGGAAGUUGAUG (配列番号 277)	GTAGAGCGTGAGGAAGTTGATG (配列番号 777)
RHO-179	CAGGCCUUCGCGCAUUCUUGG (配列番号 278)	CAGGCCTTCGCGCATTCTTGG (配列番号 778)
RHO-180	AGGUAGUACUGUGGGUACUCGA (配列番号 279)	AGGTAGTACTGTGGGTACTCGA (配列番号 779)
RHO-181	AAACAUGUAGGCGGCCAGCAUG (配列番号 280)	AAACATGTAGGCGGCCAGCATG (配列番号 780)
RHO-182	UUUCAUUUCCCGAGAAGGGAGA (配列番号 281)	TTTCATTTCCCGAGAAGGGAGA (配列番号 781)
RHO-183	GGGAAGACCCAAUGACUGGAGA (配列番号 282)	GGGAAGACCCAATGACTGGAGA (配列番号 782)
RHO-184	AAAACUGAGGCAGGGAGAGGGG (配列番号 283)	AAAACUGAGGCAGGGAGAGGGG (配列番号 783)
RHO-185	UGAGUCAGACCCAGGCUGGGCA (配列番号 284)	TGAGTCAGACCCAGGCTGGGCA (配列番号 784)
RHO-186	GGGAUUUGAGGAGCCUUGGGG (配列番号 285)	GGGATTTGAGGAGGCCTTGGGG (配列番号 785)
RHO-187	UCUGGGGGCCCAAGCUCAGGGU (配列番号 286)	TCTGGGGGGCCCAAGCTCAGGGT (配列番号 786)
RHO-188	CGGGCCACAGGAUGCAAUUUG (配列番号 287)	CGGGCCACAGGATGCAATTTG (配列番号 787)
RHO-189	ACGUAGAGCGUGAGGAAGUUGA (配列番号 288)	ACGTAGAGCGTGAGGAAGTTGA (配列番号 788)
RHO-190	GACCGAGGCAGCAGCCUGGACA (配列番号 289)	GACCGAGGCAGCAGCCTGGACA (配列番号 789)
RHO-191	CAGGCUGGGCACUGAGGGAGAG (配列番号 290)	CAGGCTGGGCACTGAGGGAGAG (配列番号 790)
RHO-192	UAUUUCAUUUCCCGAGAAGGGA (配列番号 291)	TATTTCAATTTCCCGAGAAGGGA (配列番号 791)
RHO-193	GUCCCGGGCUUGGCGGUGGUGG (配列番号 292)	GTCCCGGGCTTGGCGGTGGTGG (配列番号 792)
RHO-194	CUGCUGCCUCGUCCCAUUCUC (配列番号 293)	CTGCTGCCTCGGTCCCATCTC (配列番号 793)
RHO-195	AGCGUCUCCUCCUGCAUCUCAG (配列番号 294)	AGCGTCTCCTCCTGCATCTCAG (配列番号 794)

10

20

30

40

【 0 4 3 0 】

50

【表 18 - 9】

RHO-196	UCAGACCCAGGCUGGGCACUGA (配列番号 295)	TCAGACCCAGGCTGGGCACTGA (配列番号 795)
RHO-197	AGCUACCCUCUCCUGUCUAGG (配列番号 296)	AGCTACCTCTCCCTGTCTAGG (配列番号 796)
RHO-198	CAGAGAGGAAAACUGAGGCAGG (配列番号 297)	CAGAGAGGAAAACUGAGGCAGG (配列番号 797)
RHO-199	GGAGAGGGAUUUGAGGAGGCCU (配列番号 298)	GGAGAGGGATTGAGGAGGCCT (配列番号 798)
RHO-200	GUCCUUCUCCUCUCCCUUCU (配列番号 299)	GTCCTTCCTCCCTCTCCCTTCT (配列番号 799)
RHO-201	AGAGAGCUUGGUGCUGGGAGGA (配列番号 300)	AGAGAGCTTGGTGCTGGGAGGA (配列番号 800)
RHO-202	CCUUCUCGGGAAAUGAAAUAAC (配列番号 301)	CCTTCTCGGGAAATGAAATAAC (配列番号 801)
RHO-203	GCGGUUCUACACCAGGAGAC (配列番号 302)	GCGGTCTCAACACCAGGAGAC (配列番号 802)
RHO-204	CUCUGGGGGCCCAAGCUCAGGG (配列番号 303)	CTCTGGGGGCCCAAGCTCAGGG (配列番号 803)
RHO-205	UGUGCAGGAGCCCGGGAGCAUG (配列番号 304)	TGTGCAGGAGCCCGGGAGCATG (配列番号 804)
RHO-206	CAGAGAGGUGUAGAGGGUGCUG (配列番号 305)	CAGAGAGGTGTAGAGGGTGCTG (配列番号 805)
RHO-207	CUCCCCGAAGCGGAAGUUGCUC (配列番号 306)	CTCCCCGAAGCGGAAGTTGCTC (配列番号 806)
RHO-208	GCUAGAAGCAGCCAUGCAAAG (配列番号 307)	GCTAGAAGCAGCCATTGCAAAG (配列番号 807)
RHO-209	CAAACACCAUUAUGGUGAUAG (配列番号 308)	CAAACACCATTCATGGTGATAG (配列番号 808)
RHO-210	UCAUUUCCCGAGAAGGGAGAGG (配列番号 309)	TCATTTCCCGAGAAGGGAGAGG (配列番号 809)
RHO-211	UCACCACCCCAUGAAGUCCAU (配列番号 310)	TCACCACCCCATGAAGTTCCAT (配列番号 810)
RHO-212	GGGAGUGCACCCUCCUAGGCA (配列番号 311)	GGGAGTGCACCTCCTTAGGCA (配列番号 811)
RHO-213	AAUGGCCAGAGAUUCCUGAGA (配列番号 312)	AATGGCCAGAGATTCCCTGAGA (配列番号 812)
RHO-214	AGAAUGGGACCGAGGCAGCAGC (配列番号 313)	AGAATGGGACCGAGGCAGCAGC (配列番号 813)
RHO-215	GGCAAGCCAGACCCUCCUCUC (配列番号 314)	GGCAAGCCAGACCCCTCCTCTC (配列番号 814)
RHO-216	CCCGGGCUUGGCGUGGUGGCU (配列番号 315)	CCCGGGCTTGGCGGTGGTGGCT (配列番号 815)
RHO-217	AGCCCGGGAGCAUGGAGGGGUC (配列番号 316)	AGCCCGGGAGCATGGAGGGGTC (配列番号 816)
RHO-218	CCGGGUUAUUCAUUUCCCGAG (配列番号 317)	CCGGGTATTTCATTTCCCGAG (配列番号 817)
RHO-219	GGUGUUUGUUGACUGAAUUAU (配列番号 318)	GGTGTTTGTTGACTGAATATAT (配列番号 818)
RHO-220	CCGUCCUGUGUGACGCCCCAG (配列番号 319)	CCGTCCCTGTGTGACGCCCCAG (配列番号 819)

【 0 4 3 1 】

10

20

30

40

50

【表 18 - 10】

RHO-221	GGACAGGGGCUGAGAGGGGAGG (配列番号 320)	GGACAGGGGCTGAGAGGGGAGG (配列番号 820)
RHO-222	AGAGGGUGCUGGUGAAGCCACC (配列番号 321)	AGAGGGTGCTGGTGAAGCCACC (配列番号 821)
RHO-223	AUUGCAUCCUGUGGGCCGAAG (配列番号 322)	ATTGCATCCTGTGGGCCCCGAAG (配列番号 822)
RHO-224	CGGGUUAUUUCAUUUCCCGAGA (配列番号 323)	CGGGTTATTTTCATTTCCCGAGA (配列番号 823)
RHO-225	GGAAAUGAAAUAACCCGGACAU (配列番号 324)	GGAAATGAAATAACCCGGACAT (配列番号 824)
RHO-226	CUGACUCAGCACAGCUGCUGCA (配列番号 325)	CTGACTCAGCACAGCTGCTCCA (配列番号 825)
RHO-227	GGCACCUGAGGACAGGGGCUGA (配列番号 326)	GGCACCTGAGGACAGGGGCTGA (配列番号 826)
RHO-228	GGAGAGCUGGGCAAAGAAAUUC (配列番号 327)	GGAGAGCTGGGCAAAGAAATTC (配列番号 827)
RHO-229	GGGCGGUUAUGAGCCGGGUGUGG (配列番号 328)	GGGCGGTATGAGCCGGGTGTGG (配列番号 828)
RHO-230	CCUCCUCUCCCUUCUCGGGAA (配列番号 329)	CCTCCCTCTCCCTTCTCGGGAA (配列番号 829)
RHO-231	UCCAGGUAUUGGCACUGAGCAG (配列番号 330)	TCCAGGTAATGGCACTGAGCAG (配列番号 830)
RHO-232	GUGGGGGCCUCUCCUAGGAGCC (配列番号 331)	GTGGGGGCTCTCCTAGGAGCC (配列番号 831)
RHO-233	GAUGGCAUGGUUCUCCCGAAG (配列番号 332)	GATGGCATGTTCTCCCCGAAG (配列番号 832)
RHO-234	CGUCGCAUUGGAGAAGGGCACG (配列番号 333)	CGTCGCATTGGAGAAGGGCACG (配列番号 833)
RHO-235	UGGGUGGGGUGUGCAGGAGCCC (配列番号 334)	TGGGTGGGGTGTGCAGGAGCCC (配列番号 834)
RHO-236	CUGGACGGUGACGUAGAGCGUG (配列番号 335)	CTGACGGTGACGTAGAGCGTG (配列番号 835)
RHO-237	GAGGAAAACUGAGGCAGGGAGA (配列番号 336)	GAGGAAAACUGAGGCAGGGAGA (配列番号 836)
RHO-238	CUGAACACUGCCUUGAUUUUAU (配列番号 337)	CTGAACACTGCCTTGATCTTAT (配列番号 837)
RHO-239	CAUUACCUGGACCAGCCGGCGA (配列番号 338)	CATTACCTGGACCAGCCGGCGA (配列番号 838)
RHO-240	GGAGAGAGCUUGGUGCUGGGAG (配列番号 339)	GGAGAGAGCTTGGTGCTGGGAG (配列番号 839)
RHO-241	AGAAUAAUGUCUUGCAUUUAAC (配列番号 340)	AGAATAATGTCTTGATTTAAC (配列番号 840)
RHO-242	CUAGGAAGGCAACCAGGAGUGG (配列番号 341)	CTAGGAAGGCAACCAGGAGTGG (配列番号 841)
RHO-243	UCUCCAGACCCUCCAUGCUC (配列番号 342)	TCTCCAGACCCCTCCATGCTC (配列番号 842)
RHO-244	ACAGGGGCUGAGAGGGGAGGCA (配列番号 343)	ACAGGGGCTGAGAGGGGAGGCA (配列番号 843)
RHO-245	GGGGCAGAGGGACCACACGCUG (配列番号 344)	GGGGCAGAGGGACCACACGCTG (配列番号 844)

【0432】

10

20

30

40

50

【表 18 - 11】

RHO-246	AGGGGAGGCAGAGGAUGCCAGA (配列番号 345)	AGGGGAGGCAGAGGATGCCAGA (配列番号 845)
RHO-247	UGGUCCAGGUAAUGGCACUGAG (配列番号 346)	TGGTCCAGGTAATGGCACTGAG (配列番号 846)
RHO-248	CCGGACAUGUGGGGGCCUCUCC (配列番号 347)	CCGGACATGTGGGGGCTCTCC (配列番号 847)
RHO-249	GCAGGCCAGCGCCAUGACCCAG (配列番号 348)	GCAGGCCAGCGCCATGACCCAG (配列番号 848)
RHO-250	CUAGCUACCCUCUCCUGUCUA (配列番号 349)	CTAGCTACCCTCTCCCTGTCTA (配列番号 849)
RHO-251	GCUUUGGAUAAAUUGACAGGA (配列番号 350)	GCTTTGGATAACATTGACAGGA (配列番号 850)
RHO-252	GCCAUUGCAAAGCUGGGUGACG (配列番号 351)	GCCATTGCAAAGCTGGGTGACG (配列番号 851)
RHO-253	CCUAGGUCUCCUGGCUGUGAUC (配列番号 352)	CCTAGGTCTCCTGGCTGTGATC (配列番号 852)
RHO-254	AACAGAGAGGAAAACUGAGGCA (配列番号 353)	AACAGAGAGGAAAACUGAGGCA (配列番号 853)
RHO-255	AUUACCUUGGACCGCGCGAG (配列番号 354)	ATTACCTGGACCGCGCGAG (配列番号 854)
RHO-256	GAGGGGCACCUAGGACAGGGG (配列番号 355)	GAGGGGCACCTGAGGACAGGGG (配列番号 855)
RHO-257	GGGUUAUUCAUUUCCCGAGAA (配列番号 356)	GGGTTATTTTATTTCCCGAGAA (配列番号 856)
RHO-258	AGGGUGCACUCCCCCUAGACA (配列番号 357)	AGGGTGCCTCCTCCCTAGACA (配列番号 857)
RHO-259	CCAGGAGUGGGAGAGGGAUUUG (配列番号 358)	CCAGGAGTGGGAGAGGGATTG (配列番号 858)
RHO-260	AGAGGGGAGGCAGAGGAUGCCA (配列番号 359)	AGAGGGGAGGCAGAGGATGCCA (配列番号 859)
RHO-261	CCGCCUGCUGACUGCCUUGCAG (配列番号 360)	CCGCCTGCTGACTGCCTTGACG (配列番号 860)
RHO-262	GGCUUGGUGUGCAAACAUGGC (配列番号 361)	GGCTTGGTGCTGCAAACATGGC (配列番号 861)
RHO-263	CAGGUAAUGGCACUGAGCAGAA (配列番号 362)	CAGGTAATGGCACTGAGCAGAA (配列番号 862)
RHO-264	UUGGAACGCGGCAGGGAGGCUG (配列番号 363)	TTGGAACGCGGCAGGGAGGCTG (配列番号 863)
RHO-265	UGUCCGGGUUAUUUCAUUUCCC (配列番号 364)	TGTCCGGGTATTTTATTTCCC (配列番号 864)
RHO-266	CAGGUAGUACUGUGGUACUCG (配列番号 365)	CAGGTAGTACTGTGGGTACTCG (配列番号 865)
RHO-267	AUAACAGAUCCCACUUAACAGA (配列番号 366)	ATAACAGATCCCACTTAACAGA (配列番号 866)
RHO-268	AGGGACGGGUGCAGAGUUGAGU (配列番号 367)	AGGGACGGGTGCAGAGTTGAGT (配列番号 867)
RHO-269	GAAGGAGAGAGCUUGGUGCUGG (配列番号 368)	GAAGGAGAGAGCTTGGTGCTGG (配列番号 868)
RHO-270	GGUCAGCCACGGCUAGGUUGAG (配列番号 369)	GGTCAGCCACGGCTAGGTTGAG (配列番号 869)

10

20

30

40

【 0 4 3 3 】

50

【表 18 - 12】

RHO-271	AUUUCACAGCAAGAAAACUGAG (配列番号 370)	ATTTCACAGCAAGAAAACCTGAG (配列番号 870)
RHO-272	UCAAAGAAGUCAAGCGCCUGC (配列番号 371)	TCAAAGAAGTCAAGCGCCCTGC (配列番号 871)
RHO-273	GCUGCUCACCCCAAGAAUGCU (配列番号 372)	GCTGCTCCACCCCAAGAATGCT (配列番号 872)
RHO-274	GCAACAAACACCCAACAUGGC (配列番号 373)	GCAACAAACACCCAACAATGGC (配列番号 873)
RHO-275	AAAUCCACUCCACCCUGAGC (配列番号 374)	AAATCCACTTCCACCCCTGAGC (配列番号 874)
RHO-276	CAGGGAGGCUGGAGGGGCACCU (配列番号 375)	CAGGGAGGCTGGAGGGGCACCT (配列番号 875)
RHO-277	GGGCAAGCCAGACCCUCCUCU (配列番号 376)	GGGCAAGCCAGACCCCTCCTCT (配列番号 876)
RHO-278	CAGGAAAACAGAUAGGGUGCUG (配列番号 377)	CAGGAAAACAGATGGGGTGCTG (配列番号 877)
RHO-279	UUGGAGAAGGGCACGUAGAAGU (配列番号 378)	TTGGAGAAGGGCACGTAGAAGT (配列番号 878)
RHO-280	AGAGCUUGGUGCUGGGAGGAGG (配列番号 379)	AGAGCTTGGTGCTGGGAGGAGG (配列番号 879)
RHO-281	UAGCUAGGAAGGCAACCAGGAG (配列番号 380)	TAGCTAGGAAGGCAACCAGGAG (配列番号 880)
RHO-282	GGCUAGGUUGAGCAGGAUGUAG (配列番号 381)	GGCTAGGTTGAGCAGGATGTAG (配列番号 881)
RHO-283	CUCACCACCCCAUGAAGUCCA (配列番号 382)	CTCACCACCCCATGAAGTTCCA (配列番号 882)
RHO-284	AAGCAAUGUGCAAUGUUUUGCC (配列番号 383)	AAGCAATGTGCAATGTTTTGCC (配列番号 883)
RHO-285	GGAAGACCCAAUGACUGGAGAA (配列番号 384)	GGAAGACCCAATGACTGGAGAA (配列番号 884)
RHO-286	UGGCCAGGACCACCAAGGACCA (配列番号 385)	TGGCCAGGACCACCAAGGACCA (配列番号 885)
RHO-287	AAAUAAUUGUCCCUUUCACUGUU (配列番号 386)	AAATATTGTCCTTTTCACTGTT (配列番号 886)
RHO-288	CAUGAGCAACUCCGCUUCGGG (配列番号 387)	CATGAGCAACTTCCGCTTCGGG (配列番号 887)
RHO-289	AGAGAUAAUCCUGGAUCACAGC (配列番号 388)	AGAGATATTCTGGATCACAGC (配列番号 888)
RHO-290	CAUGGAGGGGUCUGGAGAGUC (配列番号 389)	CATGGAGGGGTCTGGGAGAGTC (配列番号 889)
RHO-291	AUGUUUUGCCCAGAGGAAGAAG (配列番号 390)	ATGTTTTGCCCAGAGGAAGAAG (配列番号 890)
RHO-292	GUGGGUGGGGUGUGCAGGAGCC (配列番号 391)	GTGGGTGGGGTGTGCAGGAGCC (配列番号 891)
RHO-293	CCAGGUAAUUGGCACUGAGCAGA (配列番号 392)	CCAGGTAATGGCACTGAGCAGA (配列番号 892)
RHO-294	CCCAACAAUGGCCAGAGAUUCC (配列番号 393)	CCCAACAATGGCCAGAGATTCC (配列番号 893)
RHO-295	GCACCUGAGGACAGGGGCUGAG (配列番号 394)	GCACCTGAGGACAGGGGCTGAG (配列番号 894)

10

20

30

40

【 0 4 3 4 】

50

【表 18 - 13】

RHO-296	GUCAGACCCAGGCUGGGCACUG (配列番号 395)	GTCAGACCCAGGCTGGGCACTG (配列番号 895)
RHO-297	GGGGCACCUGAGGACAGGGGCU (配列番号 396)	GGGGCACCTGAGGACAGGGGCT (配列番号 896)
RHO-298	AGAGGAAAACUGAGGCAGGGAG (配列番号 397)	AGAGGAAAACUGAGGCAGGGAG (配列番号 897)
RHO-299	AGGGAUAAACAGAUCCACUAAA (配列番号 398)	AGGGATAACAGATCCCACTTAA (配列番号 898)
RHO-300	CUUGGUGCUGGGAGGAGGGGGA (配列番号 399)	CTTGGTGCTGGGAGGAGGGGGA (配列番号 899)
RHO-301	AGAGGGUAGCUAGGAAGGCAAC (配列番号 400)	AGAGGGTAGCTAGGAAGGCAAC (配列番号 900)
RHO-302	UUGCACAUUGCUUCAUGGCUC (配列番号 401)	TTGCACATTGCTTCATGGCTCC (配列番号 901)
RHO-303	GACCGAGCCCAUUGCCCAGCAC (配列番号 402)	GACCGAGCCCATTGCCAGCAC (配列番号 902)
RHO-304	UGAACACUGCCUUGAUCUUAUU (配列番号 403)	TGAACACTGCCTTGATCTTATT (配列番号 903)
RHO-305	GGUGCACUCCCCCUAGACAGG (配列番号 404)	GGTGCCTCCCCCTAGACAGG (配列番号 904)
RHO-306	GCUUGGUGCUGGGAGGAGGGGG (配列番号 405)	GCTTGGTGCTGGGAGGAGGGGG (配列番号 905)
RHO-307	GGAUACUUCGUCUUCGGGCCCA (配列番号 406)	GGATACTTCGTCTTCGGGCCCA (配列番号 906)
RHO-308	AGUCAGACCCAGGCUGGGCACU (配列番号 407)	AGTCAGACCCAGGCTGGGCACT (配列番号 907)
RHO-309	AGCACCAAGCCUCUGUUUCCCU (配列番号 408)	AGCACCAAGCCTCTGTTTCCCT (配列番号 908)
RHO-310	UGGGCAAAGAAAUUCCAGGGAA (配列番号 409)	TGGGCAAAGAAATTCCAGGGAA (配列番号 909)
RHO-311	AGAGGGAUUUGAGGAGGCCUUG (配列番号 410)	AGAGGGATTTGAGGAGGCCCTG (配列番号 910)
RHO-312	GCAAUGUUUUUGCCCAGAGGAAG (配列番号 411)	GCAATGTTTTGCCCAGAGGAAG (配列番号 911)
RHO-313	CAUGUCCGGGUUAUUUCAUUC (配列番号 412)	CATGTCCGGGTATTTTCATTTC (配列番号 912)
RHO-314	AAGCCCAUGAGCAACUCCGCU (配列番号 413)	AAGCCCATGAGCAACTTCCGCT (配列番号 913)
RHO-315	UCCCACCCUGAGCUUGGGCCCC (配列番号 414)	TCCCACCCTGAGCTTGGGCCCC (配列番号 914)
RHO-316	GAGAGAGCUUGGUGCUGGGAGG (配列番号 415)	GAGAGAGCTTGGTGCTGGGAGG (配列番号 915)
RHO-317	CUACGUGCCCUUCUCCAAUGCG (配列番号 416)	CTACGTGCCCTTCTCCAATGCG (配列番号 916)
RHO-318	CUUGCAUUUAACAGGAAAACAG (配列番号 417)	CTTGCATTTAACAGGAAAACAG (配列番号 917)
RHO-319	GAAAUGAAAUAAACCGGACAUG (配列番号 418)	GAAATGAAATAACCCGGACATG (配列番号 918)
RHO-320	CGAAGGCCUGAGCUCAGCCACU (配列番号 419)	CGAAGGCCTGAGCTCAGCCACT (配列番号 919)

10

20

30

40

【0435】

50

【表 18 - 14】

RHO-321	GGAGGGUGCACUCCCCCUAGA (配列番号 420)	GGAGGGTGCACCTCCCCCTAGA (配列番号 920)
RHO-322	CAGCACCAAGCCUCUGUUUCCC (配列番号 421)	CAGCACCAAGCCTCTGTTTCCC (配列番号 921)
RHO-323	GGCAAAGAAAUUCCAGGGAU (配列番号 422)	GGCAAAGAAATTCCAGGGAAT (配列番号 922)
RHO-324	CUUCGGGGAGAACCAUGCCAUC (配列番号 423)	CTTCGGGGAGAACCATGCCATC (配列番号 923)
RHO-325	UGGGAGGAGGGGGAAGGGGCAG (配列番号 424)	TGGGAGGAGGGGGAAGGGGCAG (配列番号 924)
RHO-326	CCUAGACAGGGAGAGGGUAGCU (配列番号 425)	CCTAGACAGGGAGAGGGTAGCT (配列番号 925)
RHO-327	UAACAGAGAGGAAAACUGAGGC (配列番号 426)	TAACAGAGAGGAAAACUGAGGC (配列番号 926)
RHO-328	UCUCAGCCACCACCGCCAAGCC (配列番号 427)	TCTCAGCCACCACCGCCAAGCC (配列番号 927)
RHO-329	GUCAGCACAGACCCACUGCCU (配列番号 428)	GTCAGCACAGACCCACTGCCT (配列番号 928)
RHO-330	AGGAAAACUGAGGCAGGGAGAG (配列番号 429)	AGGAAAACUGAGGCAGGGAGAG (配列番号 929)
RHO-331	AGCCAUUGCAAAGCUGGGUGAC (配列番号 430)	AGCCATTGCAAAGCTGGGTGAC (配列番号 930)
RHO-332	AAAUGAAAUAACCCGGACAUGU (配列番号 431)	AAATGAAATAACCCGGACATGT (配列番号 931)
RHO-333	UAGCUACCCUCUCCUGUCUAG (配列番号 432)	TAGCTACCTCTCCCTGTCTAG (配列番号 932)
RHO-334	UGUGGGUGGGUGUGCAGGAGC (配列番号 433)	TGTGGGTGGGTGTGCAGGAGC (配列番号 933)
RHO-335	UGGGGAAGGAGAGAGCUUGGUG (配列番号 434)	TGGGGAAGGAGAGAGCTTGGTG (配列番号 934)
RHO-336	GACUUGGAACGCGGCAGGGAGG (配列番号 435)	GACTTGGAACGCGGCAGGGAGG (配列番号 935)
RHO-337	AAGGAGAGAGCUUGGUGCUGGG (配列番号 436)	AAGGAGAGAGCTTGGTGCTGGG (配列番号 936)
RHO-338	GGGAAGGAGAGAGCUUGGUGCU (配列番号 437)	GGGAAGGAGAGAGCTTGGTGCT (配列番号 937)
RHO-339	AUUUGAGGAGGCCUUGGGGAAG (配列番号 438)	ATTTGAGGAGGCCCTTGGGGAAG (配列番号 938)
RHO-340	AUCCAGCUGGAGCCUGAGUGG (配列番号 439)	ATCCAGCTGGAGCCCTGAGTGG (配列番号 939)
RHO-341	GAGAGCUUGGUGCUGGGAGGAG (配列番号 440)	GAGAGCTTGGTGCTGGGAGGAG (配列番号 940)
RHO-342	UCCUAGCUACCCUCUCCUGUC (配列番号 441)	TCCTAGCTACCCTCTCCCTGTC (配列番号 941)
RHO-343	CCGAGGCAGCAGCCUGGACAUG (配列番号 442)	CCGAGGCAGCAGCCTGGACATG (配列番号 942)
RHO-344	GGGGAAGGAGAGAGCUUGGUGC (配列番号 443)	GGGGAAGGAGAGAGCTTGGTGC (配列番号 943)
RHO-345	UGCUGGGAGGAGGGGAAGGGG (配列番号 444)	TGCTGGGAGGAGGGGAAGGGG (配列番号 944)

10

20

30

40

【0436】

50

【表 18 - 15】

RHO-346	CUUCUUGUGCUGGACGGUGACG (配列番号 445)	CTTCTGTGCTGGACGGTGACG (配列番号 945)
RHO-347	UACCACACCCGUCGCAUUGGAG (配列番号 446)	TACCACACCCGTGCGATTGGAG (配列番号 946)
RHO-348	AGCAGCCUGGACAUGGGGGAGA (配列番号 447)	AGCAGCCTGGACATGGGGGAGA (配列番号 947)
RHO-349	AGCCAGGUAGUACUGUGGGUAC (配列番号 448)	AGCCAGGTAGTACTGTGGGTAC (配列番号 948)
RHO-350	GGCUGCUUGCGGUUCUCAACAC (配列番号 449)	GGCTGCTTGC GGTTCTCAACAC (配列番号 949)
RHO-351	GGACCGAGGCAGCAGCCUGGAC (配列番号 450)	GGACCGAGGCAGCAGCCTGGAC (配列番号 950)
RHO-352	CUGGGCAAAGAAAUCCAGGGA (配列番号 451)	CTGGGCAAAGAAATTCAGGGA (配列番号 951)
RHO-353	UGAGAGGGGAGGCAGAGGAUGC (配列番号 452)	TGAGAGGGGAGGCAGAGGATGC (配列番号 952)
RHO-354	GAGGGUGCACUCCCCCUAGAC (配列番号 453)	GAGGGTGC ACTCCCCCTAGAC (配列番号 953)
RHO-355	CGGUUCUACAACACAGGAGACU (配列番号 454)	CGGTTCTCAACACAGGAGACT (配列番号 954)
RHO-356	UGUGCAAUGUUUUGCCCAGAGG (配列番号 455)	TGTGCAATGTTTTGCCAGAGG (配列番号 955)
RHO-357	GGGGGAGACAGGGCAAGGCUGG (配列番号 456)	GGGGGAGACAGGGCAAGGCTGG (配列番号 956)
RHO-358	GCCGGGUGUGGGUGGGUGUGC (配列番号 457)	GCCGGGTGTGGGTGGGGTGTGC (配列番号 957)
RHO-359	CUGCGUACCACACCCGUCGCAU (配列番号 458)	CTGCGTACCACACCCGTGCGAT (配列番号 958)
RHO-360	CACCCAAGAAUGCUGCGAAGGC (配列番号 459)	CACCCAAGAATGCTGCGAAGGC (配列番号 959)
RHO-361	CCUAGCUACCCUCUCCUGUCU (配列番号 460)	CCTAGCTACCCTCTCCCTGTCT (配列番号 960)
RHO-362	CACCAGGAGACUUGGAACGCGG (配列番号 461)	CACCAGGAGACTTGGAACGCGG (配列番号 961)
RHO-363	UUGGAUAACAUUGACAGGACAG (配列番号 462)	TTGGATAACATTGACAGGACAG (配列番号 962)
RHO-364	UUCGGGCCCCACAGGAUGCAAUU (配列番号 463)	TTCGGGCCCCACAGGATGCAATT (配列番号 963)
RHO-365	GAAGUAUCCAUGCAGAGAGGUG (配列番号 464)	GAAGTATCCATGCAGAGAGGTG (配列番号 964)
RHO-366	GGUGUGCAGGAGCCCGGAGCA (配列番号 465)	GGTGTGCAGGAGCCCGGAGCA (配列番号 965)
RHO-367	GGAGCAGCCACGGGUCAGCCAC (配列番号 466)	GGAGCAGCCACGGGTGAGCCAC (配列番号 966)
RHO-368	AGCGCCUGCUGGGGCGUCACA (配列番号 467)	AGCGCCCTGCTGGGGCGTCACA (配列番号 967)
RHO-369	GAGCCCGGGAGCAUGGAGGGGU (配列番号 468)	GAGCCCGGGAGCATGGAGGGGT (配列番号 968)
RHO-370	AGGGCCACAGCCAUGAAUGGCA (配列番号 469)	AGGGCCACAGCCATGAATGGCA (配列番号 969)

10

20

30

40

【 0 4 3 7 】

【表 18 - 16】

RHO-371	GCAAUGUGCAAUGUUUGCCCA (配列番号 470)	GCAATGTGCAATGTTTTGCCCA (配列番号 970)
RHO-372	GAAGAGGUCAGCCACGGCUAGG (配列番号 471)	GAAGAGGTGAGCCACGGCTAGG (配列番号 971)
RHO-373	GGCCUUCGCAGCAUUCUUGGGU (配列番号 472)	GGCCTTCGCAGCATTCTTGGGT (配列番号 972)
RHO-374	UUAACAGAGAGGAAAACUGAGG (配列番号 473)	TTAACAGAGAGGAAAACCTGAGG (配列番号 973)
RHO-375	UGAUGGCAUGGUUCUCCCCGAA (配列番号 474)	TGATGGCATGGTTCTCCCCGAA (配列番号 974)
RHO-376	ACCGAGGCAGCAGCCUGGACAU (配列番号 475)	ACCGAGGCAGCAGCCTGGACAT (配列番号 975)
RHO-377	AGGGACCACACGCUGAGGAGAG (配列番号 476)	AGGGACCACACGCTGAGGAGAG (配列番号 976)
RHO-378	UGGAACGCGGCAGGGAGGCUGG (配列番号 477)	TGGAACGCGGCAGGGAGGCTGG (配列番号 977)
RHO-379	UGCACAUUGCUUCAUGGCUCUU (配列番号 478)	TGCACATTGCTTCATGGCTCCT (配列番号 978)
RHO-380	GCGUCCAAGUCUCCUGGUGUU (配列番号 479)	GCGTTCCTAAGTCTCCTGGTGT (配列番号 979)
RHO-381	GGGUGUGCAGGAGCCCGGGAGC (配列番号 480)	GGGTGTGCAGGAGCCCGGGAGC (配列番号 980)
RHO-382	GGCAAAGAAAUCCAGGAAUG (配列番号 481)	GGCAAAGAAATTCCAGGGAATG (配列番号 981)
RHO-383	GGCUGGAGGGGCACCUGAGGAC (配列番号 482)	GGCTGGAGGGGCACCTGAGGAC (配列番号 982)
RHO-384	GCGCCUGCUGGGGCGUCACAC (配列番号 483)	GCGCCCTGCTGGGGCGTCACAC (配列番号 983)
RHO-385	GCGUACCACACCCGUCGCAUUG (配列番号 484)	GCGTACCACACCCGTGCGATTG (配列番号 984)
RHO-386	ACCAGGAGACUUGGAACGCGGC (配列番号 485)	ACCAGGAGACTTGGAACGCGGC (配列番号 985)
RHO-387	GCUGCUGCCUCGGUCCCAUUCU (配列番号 486)	GCTGCTGCCTCGGTCCCATTCT (配列番号 986)
RHO-388	GAAGCCCUCCAAAUUGCAUCCU (配列番号 487)	GAAGCCCTCCAAATTGCATCCT (配列番号 987)
RHO-389	CGUAGAGCGUGAGGAAGUUGAU (配列番号 488)	CGTAGAGCGTGAGGAAGTTGAT (配列番号 988)
RHO-390	CUGAAGCAGUCCUUUUUGCUU (配列番号 489)	CTGAAGCAGTTCCTTTTTGCTT (配列番号 989)
RHO-391	GCUGGACGGUGACGUAGAGCGU (配列番号 490)	GCTGGACGGTGACGTAGAGCGT (配列番号 990)
RHO-392	UGAGGGCUUUGGAUACAUGA (配列番号 491)	TGAGGGCTTTGGATAACATTGA (配列番号 991)
RHO-393	AGCCGGGUGUGGGUGGGGUGUG (配列番号 492)	AGCCGGGTGTGGGTGGGGTGTG (配列番号 992)
RHO-394	CUCAGUUUCCUCUCUGUUAAG (配列番号 493)	CTCAGTTTCTCTCTGTTAAG (配列番号 993)
RHO-395	CAAGACAUAUUCUAAAGCAA (配列番号 494)	CAAGACATTATTCTAAAGCAA (配列番号 994)

10

20

30

40

【0438】

50

【表 18 - 17】

RHO-396	UGGAACUUCAUGGGGUGGUGAG (配列番号 495)	TGGAACCTTCATGGGGTGGTGAG (配列番号 995)
RHO-397	GAGAGGGAUUUGAGGAGGCCUU (配列番号 496)	GAGAGGGATTTGAGGAGGCCTT (配列番号 996)
RHO-398	CUUCGGGCCACAGGAUGCAAU (配列番号 497)	CTTCGGGCCACAGGATGCAAT (配列番号 997)
RHO-399	ACUUGGAACGCGGCAGGGAGGC (配列番号 498)	ACTTGAACGCGGCAGGGAGGC (配列番号 998)
RHO-400	AUGGCCAGAGAUUCCUGAGAA (配列番号 499)	ATGGCCAGAGATTCCTTGAGAA (配列番号 999)
RHO-401	CCUCAGUUUCCUCUGUUA (配列番号 500)	CCTCAGTTTTCTCTGTAA (配列番号 1000)
RHO-402	UAACAGAUCCACUUAACAGAG (配列番号 501)	TAACAGATCCCACTTAACAGAG (配列番号 1001)
RHO-403	GGGAGAGGGAUUUGAGGAGGCC (配列番号 502)	GGGAGAGGGATTTGAGGAGGCC (配列番号 1002)

10

【0439】

参照による援用

全本明細書で言及される全ての文献、特許、及び特許出願は、あたかも個々の出版物、特許又は特許出願が、具体的にそして個別に、参照により援用されると示されるかのように、その内容全体を参照により本明細書に援用する。矛盾する場合は、本明細書の任意の定義を含めて、本出願が優先される。

20

【0440】

均等物

当業者は、単に通例の実験法を使用して、本明細書に記載される本開示の特定の実施形態の多くの同等物を認識し、又は見極めることができるであろう。このような均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

【0441】

追加的な配列

特定の実施形態で使用されてもよい、例示的な配列を以下に記載する：

30

A A V I T R :

【化29】

TGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGC
GACCTTTGGTCGCCCCGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCCACTCCA
TCACTAGGGGTTCTT (配列番号92)

U6プロモーター：

【化30】

AAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAA
GGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATA
CGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTTATGTTTTAAATG
GACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTG
GAAAGGACGAAACACC (配列番号78)

40

例示的な s a C a s 9 g R N A プロトスペーサー：

C C C A C A C C C G G C T C A T A C C G C C (配列番号 606)

ガイドRNA スキャフォールド配列：

50

【化 3 1】

GTTATAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTATAACAAGGC AAAATGCCGTGTTTATCTCGTCA
ACTTGTTGGCGAGA (配列番号12)

最小 R H O プロモーター (2 5 0 b p) :

【化 3 2】

GTCACCTTGGCCCCCTCTTAGAAGCCAATTAGGCCCTCAGTTTCTGCAGCGGGGATTAATATG
ATTATGAACACCCCCAATCTCCCAGATGCTGATTTCAGCCAGGAGCTTAGGAGGGGGAGGTCA
CTTTATAAGGGTCTGGGGGGGTCAGAACCAGAGTCATCCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTGA
GCTCAGGCCTTCGCAGCATTTCTTGGGTGGGAGCAGCCACGGGTGAGCCACAAGGGCCACAGC
C (配列番号44)

10

S V 4 0 イントロン :

【化 3 3】

TCTAGAGGATCCGGTACTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTT
TTTGTCTTTTATTTTCAAGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGT
GGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTAC (配列番号94)

コドン最適化された R H O をコード化する配列 1 (コドン 1) :

【化 3 4】

ATGAACGGGCACCGAGGGCCCCAACTTCTACGTCCCCTTCAGCAACGCCACCGGCGTCGTCCG
CAGCCCCCTTCGAGTACCCCCAGTACTACCTGGCCGAGCCCTGGCAGTTCAGCATGCTGGCCG
CCTACATGTTCTGCTGATCGTCCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTGACCCTGTACGTCACC
GTCCAGCACAAGAAGCTGCGCACCCCCCTGAACTACATCCTGCTGAACCTGGCCGTCGCCGA
CCTGTTTCATGGTCTTGGGCGGCTTCACCAGCACCTGTACACCAGCCTGCACGGCTACTTCG
TCTTCGGCCCCACCGGCTGCAACCTGGAGGGCTTCTTCGCCACCCTGGGCGGCGAGATCGCC
CTGTGGAGCCTGGTTCGTCTGGCCATCGAGCGCTACGTCTGCTCTGCAAGCCCATGAGCAA
CTTCCGCTTCGGCGAGAACACGCCATCATGGGCGTCGCCTTCACCTGGGTTCATGGCCCTGG
CCTGCGCCGCCCCCCCCCTGGCCGGCTGGAGCCGCTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGCAGC
TGCGGCATCGACTACTACACCCTGAAGCCCGAGGTCAACAACGAGAGCTTCGTTCATCTACAT
GTTTCGTCTGCTCACTTCACCATCCCCATGATCATCATCTTCTTCTGCTACGGCCAGCTGGTCT
TCACCGTCAAGGAGGCCGCCGCCAGCAGCAGGAGAGCGCCACCACCCAGAAGGCCGAGAAG
GAGGTACCCCGCATGGTCATCATCATGGTTCATCGCCTTCTGATCTGCTGGGTCCCCCTACGC
CAGCGTCGCCTTCTACATCTTCACCCACCAGGGCAGCAACTTCGGCCCCATCTTCATGACCA
TCCCCGCCTTCTTCGCCAAGAGCGCCGCCATCTACAACCCCGTCATCTACATCATGATGAAC
AAGCAGTTCCGCAACTGCATGCTGACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCCTGGGCGACGA
CGAGGCCAGCGCCACCGTCAGCAAGACCGAGACCAGCCAGGTGCCCCCGCCTAA (配列番号13)

20

30

コドン最適化された R H O をコード化する配列 2 (コドン 2) :

40

50

【化 3 5】

ATGAACGGCACCGAGGGCCCCAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAACGCCACCGGCGTGGTGCG
 CTCCCCCTTCGAGTACCCCCAGTACTACCTGGCCGAGCCCTGGCAGTTCTCCATGCTGGCCG
 CCTACATGTTCTGCTGATCGTGCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTGACCTGTACGTGACC
 GTGCAGCACAAGAAGCTGCGCACCCCCCTGAACTACATCCTGCTGAACCTGGCCGTGGCCGA
 CCTGTTTCATGGTGCTGGGCGGCTTCACCTCCACCCTGTACACCTCCCTGCACGGCTACTTCG
 TGTTCGGCCCCACCGGCTGCAACCTGGAGGGCTTCTTCGCCACCCTGGGCGGCGAGATCGCC
 CTGTGGTCCCTGGTGGTGCTGGCCATCGAGCGCTACGTGGTGGTGTGCAAGCCCATGTCCAA
 CTTCCGCTTCGGCGAGAACCACGCCATCATGGGCGTGGCCTTCACCTGGGTGATGGCCCTGG
 CCTGCGCCGCCCCCCCCCTGGCCGGCTGGTCCCGCTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGCTCC
 TGCGGCATCGACTACTACACCCTGAAGCCCCGAGGTGAACAACGAGTCCTTCGTGATCTACAT
 GTTCGTGGTGCACTTCACCATCCCCATGATCATCATCTTCTTCTGCTACGGCCAGCTGGTGT
 TCACCGTGAAGGAGGCCGCCGCCAGCAGCAGGAGTCCGCCACCACCCAGAAGGCCGAGAAG
 GAGGTGACCCGCATGGTGATCATCATGGTGATCGCCTTCCTGATCTGCTGGGTGCCCTACGC
 CTCGGTGGCCTTCTACATCTTCACCCACCAGGGCTCCAACCTTCGGCCCCATCTTCATGACCA
 TCCCCGCTTCTTCGCCAAGTCCGCCGCCATCTACAACCCCGTGATCTACATCATGATGAAC
 AAGCAGTTCGCGAACTGCATGCTGACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCCTGGGCGACGA
 CGAGGCCTCCGCCACCGTGTCCAAGACCGAGACCTCCAGGTGGCCCCCGCCTAA (配列番号14)

10

コドン最適化された R H O をコード化する配列 3 (コドン 3) :

【化 3 6】

ATGAACGGCACCGAGGGCCCCAACTTCTACGTCCCCTTCAGCAACGCCACCGGCGTCGTCCG
 CAGCCCCCTTCGAGTACCCCCAGTACTACCTGGCCGAGCCCTGGCAGTTCTCTATGCTGGCCG
 CCTACATGTTCTGCTGATCGTCCTGGGCTTCCCTATCAACTTCCTCACCCTCTACGTCACC
 GTCCAGCACAAGAAGCTCCGCACCCCTCTCAACTACATCCTCCTTAACCTTGCCGTGCGCCGA
 CCTTTTCATGGTCCTTGCGGGCTTCACCTCTACTCTTTACACTTCTTTGCACGGGTACTTCG
 TGTTCCGGTCTACTGGTTGCAACTTGGAGGGTTCTTCGCCACTTTGGGTGGTGAGATCGCC
 TTGTGGTTCGTTGGTGGTGTAGCTATCGAGCGATACGTGGTGGTGTGCAAGCCTATGTGCAA
 CTTCCGGTTCGGTGAGAATCATGCTATCATGGGAGTGGCTTTTACTTGGGTGATGGCTTTAG
 CTTGCGCTGCTCCTCCGTTAGCTGGATGGTCGCGTTATATCCCGGAGGGATTACAGTGCTCA
 TGCGGAATCGACTATTATACTCTAAAGCCGGAAGTTAATAATGAATCATTTGTTATTTATAT
 GTTTGTTGTTTCAATTTTACAATTCCGATGATTATTTATTTTGTATGGACAGCTAGTTT
 TTACAGTTAAGGAAGCAGCAGCACAGCAACAAGAATCAGCAACAACACAAAAGGCAGAAAAA
 GAAGTTACAAGGATGGTTATTATTATGGTAATTGCATTTCTAATATGTTGGGTACCGTATGC
 ATCCGTAGCATTTTATATATTTACACATCAAGGGTCCAATTTTGGGCCAATATTTATGACGA
 TACCAGCGTTTTTTTGCAGAAATCCGCGGCGATATATAATCCAGTAATATATATAATGATGAAT
 AAACAATTTAGAAATTGTATGCTAACGACGATATGTTGTGGGAAAAATCCACTAGGGGATGA
 TGAAGCGAGTGCGACGGTAAGTAAAACGGAAACGAGTCAAGTAGCGCCAGCGTAA (配列番号15)

20

30

コドン最適化された R H O をコード化する配列 4 (コドン 4) :

40

50

【化 3 7】

ATGAACGGGCACCGAGGGTCCCAATTTCTACGTCCCATTTTCCAACGCCACGGGGGTGGTACG
 CAGCCCTTTTGAATATCCGCAGTACTATCTGGCTGAGCCCTGGCAGTTTTCTATGCTCGCAG
 CGTACATGTTCTTGCTAATCGTTCTGGGATTTCCAATTAATTTCCCTCACATTGTATGTCACC
 GTGCAGCACAAGAAGCTACGGACGCCTCTGAACTACATCCTCTTGAATCTAGCCGTCGCTGA
 CCTGTTTATGGTTCTCGGCGGTTTACATCGACCTTGTATACGTCACTACATGGGTACTTTG
 TCTTCGGACCGACAGGCTGCAACCTGGAAGGTTTTTTTCGCAACCCTCGGGGGAGAGATTGCG
 TTGTGGTCCCTAGTGGTACTGGCCATCGAAAGGTATGTTGTCTGTGTAAAGCCCATGAGCAA
 TTTTCGCTTCGGCGAGAACCACGCTATTATGGGTGTAGCATTTACGTGGGTTATGGCGCTCG
 CCTGCGCTGCACCACCTTTGGCGGGGTGGTCTCGGTACATCCCGGAAGGACTACAGTGTTCTG
 TCGGCATTGATTATTACACACTGAAGCCCGAGGTCAATAACGAATCATTTCGTGATCTATAT
 GTTTGTAGTTTCAATTTACCATTCCAATGATCATTATCTTTTTCTGTTACGGTCAGCTCGTCT
 TTACGGTGAAGGAGGCCGCTGCACAGCAGCAGGAATCCGCGACAACCCAGAAGGCCGAGAAG
 GAAGTAACGAGGATGGTTATTATCATGGTCATTGCTTTCTTGATCTGCTGGGTGCCTTATGC
 AAGCGTAGCGTTTTACATTTTACACACCAGGGGTCTAATTTTGGACCGATCTTCATGACCA
 TTCCCGCCTTTTTTCGCTAAGTCGGCAGCGATCTATAACCCAGTTATTTACATCATGATGAAT
 AAGCAGTTTCGCAACTGTATGCTAACGACAATTTGCTGTGGCAAGAATCCTCTGGGTGACGA
 TGAGGCCTCAGCTACCGTCTCCAAGACGGAAACAAGCCAGGTGGCACCGGCGTAA (配列番号16)

10

コドン最適化された R H O をコード化する配列 5 (コドン 5) :

【化 3 8】

ATGAATGGGACTGAAGGACCTAATTTCTATGTGCCATTTAGCAATGCTACTGGCGTTGTCAG
 AAGCCCTTTCGAATATCCACAATACTATCTGGCCGAACCTTGGCAGTTCAGCATGCTCGCTG
 CCTATATGTTTCTGCTGATTGTGCTGGGCTTTCCCATAAATTTCCCTCACCTGTATGTTACT
 GTTCAACACAAAAAGCTGCGGACGCCTCTGAACTACATACTGCTGAACCTGGCCGTCGCCGA
 CCTGTTTATGGTCCCTGGGAGGCTTTACAAGCACTCTGTATACAAGCCTGCACGGCTACTTCG
 TGTTCCGCCCCACAGGCTGCAACCTCGAAGGCTTCTTTGCCACCCTCGGAGGAGAGATTGCC
 CTGTGGAGCCTGGTGGTGCTGGCCATCGAAAGGTATGTGGTGGTGTGTAAACCCATGTCCAA
 TTTTCGGTTCGGCGAGAACCACGCTATTATGGGAGTGGCTTTCACTTGGGTGATGGCCCTGG
 CCTGCGCCGCCCCACCACTGGCCGGGTGGAGCCGGTACATCCAGAGGGGCTGCAATGTAGC
 TGCGGAATCGACTATTATACCTGAAACCAGAGGTGAACAACGAGAGCTTTGTGATTTATAT
 GTTTGTGGTGCAATTTTACAATTCCTATGATTATCATTTTCTTCTGTTACGGGCAACTGGTGT
 TTACCGTGAAGGAAGCCGCCGCTCAACAGCAGGAGAGCGCCACAACCCAAAAGGCCGAGAAG
 GAGGTGACCAGAATGGTGATTATTATGGTGTATCGTTTTCTGATTTGCTGGGTGCCATACGC
 TAGCGTCGCTTTCTATATTTCACTCACCAGGGGAGCAACTTCGGCCCCATTTTCATGACAA
 TCCCTGCCTTTTTTGTCTAAAAGCGCCGCATCTATAACCCAGTGATCTACATCATGATGAAC
 AAACAGTTTAGGAACTGTATGCTCACAACAATCTGCTGTGGAAAGAACCCCTCGGCGATGA
 CGAAGCCAGCGCCACCGTCAGCAAGACAGAAACAAGCCAGGTGGCCCTGCCTAA (配列番号17)

20

30

コドン最適化された R H O をコード化する配列 6 (コドン 6) :

40

50

【化 3 9】

ATGAATGGCACAGAGGGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTTAGCAATGCCACAGGCGTCGTGCG
 GAGCCCTTTTGTAGTACCCCTCAGTACTATCTGGCCGAGCCTTGGCAGTTTAGCATGCTGGCCG
 CCTACATGTTCTGCTGATCGTGCTGGGCTTCCCCATCAACTTTCTGACCCTGTACGTGACC
 GTGCAGCACAGAAGCTGCGGACCCCTCTGAACCTACATCCTGCTGAATCTGGCCGTGGCCGA
 CCTGTTTATGGTGCTCGGCGGCTTTACCAGCACACTGTACACAAGCCTGCACGGCTACTTCG
 TGTTTGGCCCCACCGGCTGCAATCTGGAAGGCTTTTTTGGCACACTCGGCGGCGAAATTGCT
 CTGTGGTCACTGGTGGTGCTGGCCATCGAGAGATACGTGGTCTGTGTGCAAGCCCATGAGCAA
 CTTTACAGATTCGGCGAGAACCACGCCATCATGGGCGTCGCCCTTTACATGGGTTATGGCCCTGG
 CTTGTGCAGCTCCTCCTCTTGCCGGCTGGTCCAGATATATTCCTGAGGGCCTGCAGTGCAGC
 TGGCGCATCGATTACTACACCCTGAAGCCTGAAGTGAACAACGAGAGCTTCGTGATCTACAT
 GTTTGTGGTGCACTTCACGATCCCCATGATCATCATATTCTTTTGCTACGGCCAGCTGGTGT
 TCACCGTGAAAGAAGCCGCTGCTCAGCAGCAAGAGAGCGCCACAACACAGAAAGCCGAGAAA
 GAAGTGACCCGGATGGTCATTATCATGGTTATCGCCTTTCTGATCTGTTGGGTGCCCTACGC
 CAGCGTGGCCTTCTACATCTTTACCCACCAAGGCAGCAACTTCGGCCCCATCTTTATGACAA
 TCCCCGCCTTCTTTGCCAAGAGCGCCGCCATCTACAACCCCGTGATCTATATCATGATGAAC
 AAGCAGTTCGCAACTGCATGCTGACCACCATCTGCTGCGGAAAGAACCCTCTGGGAGATGA
 TGAGGCCAGCGCCACCGTGTCTAAGACCGAAACATCTCAGGTGGCCCCTGCATGA (配列番号18)

10

ヘモグロビン A 1 (H B A 1) 3 ' U T R :

【化 4 0】

GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCTCCTCCCCTT
 CCTGCACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCA (配列番号38)

20

最小 U T R (m i n ポリ A) :

T A G C A A T A A A G G A T C G T T T A T T T T C A T T G G A A G C G T G T G T
 T G G T T T T T T G A T C A G G C G C G (配列番号 5 6)

反転 I T R 配列 :

【化 4 1】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC
 GGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGC
 GCGCAGCTGCCTGCA (配列番号93)

30

例示的な置換ベクター (コドン最適化された R H O c D N A を駆動する 2 5 0 b p の最
 小 R H O プロモーター ; R H O を標的化する g R N A を駆動する U 6 プロモーター) (機
 能の注釈については図 1 6 を参照されたい) :

40

50

【化 4 2】

TGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGC
 GACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCA
 TCACTAGGGGTTCCTGCGGCCGCGGTTCCCTCAGATCTGAATTCGGTACCAAGGTCGGGCAGG
 AAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAG
 ATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAA
 GTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGC
 TTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAAC
 ACCGCCCCACACCCGGCTCATACCGCCGTTATAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTATAACAA
 GGCAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTTTCGACTTAGTTCGATCG
 AAGGAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGAT
 ACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAA
 AATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAA
 AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCT
 TGTGGAAAGGACGAAACACCGCCCCACACCCGGCTCATACCGCCGTTATAGTACTCTGGAAAC
 AGAATCTACTATAACAAGGCAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTT
 TGGTACCGCTAGCGCTGTACCTTGGCCCCCTCTTAGAAGCCAATTAGGCCCTCAGTTTCTGC
 AGCGGGGATTAATATGATTATGAACACCCCCAATCTCCAGATGCTGATTCAGCCAGGAGCT
 TAGGAGGGGGAGGTCACTTTATAAGGGTCTGGGGGGGTGAGAACCAGAGTCATCCAGCTGG
 AGCCCTGAGTGGCTGAGCTCAGGCCTTCGCAGCATTCTTGGGTGGGAGCAGCCACGGGTGAG
 CCACAAGGGCCACAGCCTCTAGAGGATCCGGTACTCGAGGAACGAAAAACCAGAAAGTTAA
 CTGGTAAGTTTGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAAGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCA
 AAGAACTGCTCCTCAGTGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTCCGC
 CACCATGAATGGCACAGAGGGCCCTAATTCTACGTGCCCTTTAGCAATGCCACAGGCGTCG
 TGCGGAGCCCTTTTGTAGTACCTCAGTACTATCTGGCCGAGCCTTGGCAGTTTAGCATGCTG
 GCCGCCTACATGTTCTGCTGATCGTGCTGGGCTTCCCCATCAACTTTCTGACCCTGTACGT
 GACCGTGCAGCACAGAAGCTGCGGACCCCTCTGAACTACATCCTGCTGAATCTGGCCGTGG
 CCGACCTGTTTATGGTGCTCGGCGGCTTTACCAGCACACTGTACACAAGCCTGCACGGCTAC
 TTCGTGTTTGGCCCCACCGGCTGCAATCTGGAAGGCTTTTTTGGCACACTCGGCGGCGAAAT
 TGCTCTGTGGTCACTGGTGGTGCTGGCCATCGAGAGATACGTGGTCTGTGCAAGCCCATGA
 GCAACTTCAGATTGCGCGAGAACACGCCATCATGGGCGTCGCCTTTACATGGGTTATGGCC
 CTGGCTTGTGCAGCTCCTCCTCTTGGCGGCTGGTCCAGATATATTCTGAGGGCCTGCAGTG
 CAGCTGCGGCATCGATTACTACACCCTGAAGCCTGAAGTGAACAACGAGAGCTTCTGATCT
 ACATGTTTGTGGTGCACTTCACGATCCCCATGATCATCATATTCTTTTGCTACGGCCAGCTG
 GTGTTACCCGTGAAAGAAGCCGCTGCTCAGCAGCAAGAGAGCGCCACAACACAGAAAGCCGA
 GAAAGAAGTGACCCGGATGGTCATTATCATGGTTATCGCCTTTCTGATCTGTTGGGTGCCCT
 ACGCCAGCGTGGCCTTCTACATCTTTACCCACCAAGGCAGCAACTTCGGCCCCATCTTTATG
 ACAATCCCCGCTTCTTTGCCAAGAGCGCCGCCATCTACAACCCCGTGATCTATATCATGAT
 GAACAAGCAGTTCCGCAACTGCATGCTGACCACCATCTGCTGCGGAAAGAACCCTCTGGGAG
 ATGATGAGGCCAGCGCCACCGTGTCTAAGACCGAAACATCTCAGGTGGCCCTGCATGAGCT
 GGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGGCCCTTGGGCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCTTCTCT
 GCACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCACATGCTGGGGAGAGAT
 CTGCGGCGGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCT
 CACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGA
 GCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCA (配列番号11)

10

20

30

40

C a s 9 ベクター 2 (C a s 9 を グロビン U T R で駆動する 2 5 0 b p の最小 R H O プ
 ロモーター) (機能の注釈については図 1 7 を参照されたい) :

【化 4 3】

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGG
GCGACCTTTGGTTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTC
CATCACTAGGGGTTCTTAAGCGGCCGCGGTTCTCAGATCTGAATTCGGTACCTGTCACCTT
GGCCCCCTCTTAGAAGCCAATTAGGCCCTCAGTTTCTGCAGCGGGGATTAAATATGATTATGAA
CACCCCCAATCTCCAGATGCTGATTCAGCCAGGAGCTTAGGAGGGGGAGGTCACTTTATAA
GGGTCTGGGGGGGTGAGAACCAGAGTCATCCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTGAGCTCAGGC
CTTCGCAGCATTCTTGGGTGGGAGCAGCCACGGGTGAGCCACAAGGGCCACAGCCTCTAGAG
GATCCGGTACTCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCT
TTTATTTCAAGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAAGTCTCCTCAGTGGATGTT
GCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTCCGCCACCATGGGACCGAAGAAAAAGCG
CAAGGTCGAAGCGTCCATGAAAAGGAACTACATTCTGGGGCTGGACATCGGGATTACAAGCG
TGGGGTATGGGATTATTGACTATGAAACAAGGGACGTGATCGACGCAGGCGTCAGACTGTTT
AAGGAGGCCAACGTGGAAAACAATGAGGGACGGAGAAGCAAGAGGGGAGCCAGGCGCCTGAA
ACGACGGAGAAGGCACAGAATCCAGAGGGTGAAGAACTGCTGTTTCGATTACAACCTGCTGA
CCGACCATTCTGAGCTGAGTGAATTAATCCTTATGAAGCCAGGGTGAAAGGCCTGAGTCAG
AAGCTGTCAGAGGAAGAGTTTTCCGCAGCTCTGCTGCACCTGGCTAAGCGCCGAGGAGTGCA
TAACGTCAATGAGGTGGAAGAGGACACCGGCAACGAGCTGTCTACAAAGGAACAGATCTCAC
GCAATAGCAAAGCTCTGGAAGAGAAGTATGTGCGAGAGCTGCAGCTGGAACGGCTGAAGAAA
GATGGCGAGGTGAGAGGGTCAATTAATAGGTTCAAGACAAGCGACTACGTCAAAGAAGCCAA
GCAGCTGCTGAAAGTGCAGAAGGCTTACCACCAGCTGGATCAGAGCTTCATCGATACTTATA
TCGACCTGCTGGAGACTCGGAGAACCTACTATGAGGGACCAGGAGAAGGGAGCCCCCTTCGGA
TGGAAGACATCAAGGAATGGTACGAGATGCTGATGGGACATTGCACCTATTTTCCAGAAGA
GCTGAGAAGCGTCAAGTACGCTTATAACGCAGATCTGTACAACGCCCTGAATGACCTGAACA
ACCTGGTCATCACCAGGGATGAAAACGAGAACTGGAATACTATGAGAAGTTCCAGATCATC
GAAAACGTGTTTAAAGCAGAAGAAAAAGCCTACACTGAAACAGATTGCTAAGGAGATCCTGGT
CAACGAAGAGGACATCAAGGGCTACCGGGTGACAAGCACTGGAAAACCAGAGTTCACCAATC
TGAAAGTGTATCACGATATTAAGGACATCACAGCACGGAAAGAAATCATTGAGAACGCCGAA
CTGCTGGATCAGATTGCTAAGATCCTGACTATCTACCAGAGCTCCGAGGACATCCAGGAAGA
GCTGACTAACCTGAACAGCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAACAGATTAGTAATCTGAAGG
GGTACACCGGAACACACAACCTGTCCCTGAAAGCTATCAATCTGATTCTGGATGAGCTGTGG
CATACAAACGACAATCAGATTGCAATCTTTAACCGGCTGAAGCTGGTCCCCAAAAAGGTGGA
CCTGAGTCAGCAGAAAGAGATCCCAACCACACTGGTGGACGATTTCACTCTGTCAACCGTGG
TCAAGCGGAGCTTCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTG
CCCAATGATATCATTTATCGAGCTGGCTAGGGAGAAGAACAGCAAGGACGCACAGAAGATGAT
CAATGAGATGCAGAAACGAAACCGGCAGACCAATGAACGCATTGAAGAGATTATCCGAACATA
CCGGGAAAGAGAACGCAAAGTACCTGATTGAAAAAATCAAGCTGCACGATATGCAGGAGGGA
AAGTGTCTGTATTCTCTGGAGGCCATCCCCCTGGAGGACCTGCTGAACAATCCATTCAACTA

10

20

30

40

50

【化 4 4】

CGAGGTCGATCATATTATCCCCAGAAGCGTGTCTTCGACAATTCTTTAACAACAAGGTGC
 TGGTCAAGCAGGAAGAGAACTCTAAAAAGGGCAATAGGACTCCTTTCCAGTACCTGTCTAGT
 TCAGATTCCAAGATCTCTTACGAAACCTTTAAAAAGCACATTCTGAATCTGGCCAAAGGAAA
 GGGCCGCATCAGCAAGACCAAAAAGGAGTACCTGCTGGAAGAGCGGGACATCAACAGATTCT
 CCGTCCAGAAGGATTTTATTAACCGGAATCTGGTGGACACAAGATACGCTACTCGCGGCCTG
 ATGAATCTGCTGCGATCCTATTTCCGGGTGAACAATCTGGATGTGAAAGTCAAGTCCATCAA
 CGGCGGGTTACATCTTTTCTGAGGCGCAAATGGAAGTTTAAAAAGGAGCGCAACAAAGGGT
 ACAAGCACCATGCCGAAGATGCTCTGATTATCGCAAATGCCGACTTCATCTTTAAGGAGTGG
 AAAAGCTGGACAAAGCCAAGAAAGTGATGGAGAACCAGATGTTTGAAGAGAAGCAGGCCGA
 ATCTATGCCCCGAAATCGAGACAGAACAGGAGTACAAGGAGATTTTCATCACTCCTCACCAGA
 TCAAGCATATCAAGGATTTCAAGGACTACAAGTACTCTCACCGGGTGGATAAAAAGCCCAAC
 AGAGAGCTGATCAATGACACCCTGTATAGTACAAGAAAAGACGATAAGGGGAATACCTGAT
 TGTGAACAATCTGAACGGACTGTACGACAAAGATAATGACAAGCTGAAAAAGCTGATCAACA
 AAAGTCCCGAGAAGCTGCTGATGTACCACCATGATCCTCAGACATATCAGAACTGAAGCTG
 ATTATGGAGCAGTACGGCGACGAGAAGAACCCACTGTATAAGTACTATGAAGAGACTGGGAA
 CTACCTGACCAAGTATAGCAAAAAGGATAATGGCCCCGTGATCAAGAAGATCAAGTACTATG
 GGAACAAGCTGAATGCCCATCTGGACATCACAGACGATTACCCTAACAGTCGCAACAAGGTG
 GTCAAGCTGTCACTGAAGCCATACAGATTGATGTCTATCTGGACAACGGCGTGTATAAATT
 TGTGACTGTCAAGAATCTGGATGTCTCAAAAAGGAGAACTACTATGAAGTGAATAGCAAGT
 GCTACGAAGAGGCTAAAAAGCTGAAAAAGATTAGCAACCAGGCAGAGTTCATCGCCTCCTTT
 TACAACAACGACCTGATTAAGATCAATGGCGAACTGTATAGGGTCATCGGGGTGAACAATGA
 TCTGCTGAACCGCATTGAAGTGAATATGATTGACATCACTTACCGAGAGTATCTGGAAAACA
 TGAATGATAAGCGCCCCCTCGAATTATCAAAACAATTGCCTCTAAGACTCAGAGTATCAAA
 AAGTACTCAACCGACATTCTGGGAAACCTGTATGAGGTGAAGAGCAAAAAGCACCCCTCAGAT
 TATCAAAAAGGGCGGATCCCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCTCGAGCTAGGCTGGAGCCTCGG
 TGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCTGCAACCCGTAC
 CCCCCTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCACATGCTGGGGAGAGATCTGCGGCCGC
 CTAGCAATAAAGGATCGTTTATTTTCATTGGAAGCGTGTGTTGGTTTTTTGATCAGGCGCGA
 GGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG
 GCGACCAAAGGTCGCCCCGACCGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG
 CGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号10)

10

20

30

C a s 9 ベクター 1 (S V 4 0 ポリ A シグナルで w t C a s 9 を駆動する 5 5 0 b p の
 最小 R H O プロモーター) (機能の注釈については図 1 8 を参照されたい) :

【化 4 5】

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGG
 GCGACCTTTGGTTCGCCCCGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTC
 CATCACTAGGGGTTCTTAAGCGGCCGCGGTTCTCAGATCTGAATTCTCATGTTACAGGCAG
 GGAGACGGGCACAAAACACAAATAAAAAGCTTCCATGCTGTGAGAAGCACTATGCAAAAAGC
 AAGATGCTGAGGTCATGGAGCTCCTCCTGTCAGAGGAGTGTGGGGACTGGATGACTCCAGAG
 GTAACCTGTGGGGGAACGAACAGGTAAGGGGCTGTGTGACGAGATGAGAGACTGGGAGAATA
 AACCAGAAAGTCTCTAGCTGTCCAGAGGACATAGCACAGAGGCCCATGGTCCCTATTTCAAA
 CCCAGGCCACCAGACTGAGCTGGGACCTTGGGACAGACAAGTCATGCAGAAGTTAGGGGACC
 TTCTCCTCCCTTTTCTGGATCCTGAGTACCTCTCCTCCCTGACCTCAGGCTTCCTCCTAGT
 GTCACCTTGGCCCCCTCTTAGAAGCCAATTAGGCCCTCAGTTTCTGCAGCGGGGATTAATATG
 ATTATGAACACCCCCAATCTCCCAGATGCTGATTCAGCCAGGAGCTTAGGAGGGGGAGGTCA
 CTTTATAAGGGTCTGGGGGGGTGAGAACCAGAGTCATCCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTGA
 GCTCAGGCCTTCGCAGCATTCTTGGGTGGGAGCAGCCACGGGTGAGCCACAATCTAGAGGAT
 CCGGTACTCGAGGAACCTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTT

40

50

【化 4 6】

ATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCC
TTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAAGTGTTACGCGGCCGCCACCATGGGACCGAAGAAAAAGCG
CAAGGTGGAAGCGTCCATGAAAAGGAACTACATTCTGGGGCTGGACATCGGGATTACAAGCG
TGGGGTATGGGATTATTGACTATGAAAACAAGGGACGTGATCGACGCAGGCGTCAGACTGTTTC
AAGGAGGCCAACGTGGAACAATGAGGGACGGAGAAGCAAGAGGGGAGCCAGGCGCCTGAA
ACGACGGAGAAGGCACAGAATCCAGAGGGTGAAGAACTGCTGTTTCGATTACAACCTGCTGA
CCGACCATTCTGAGCTGAGTGGAAATTAATCCTTATGAAGCCAGGGTGAAGGCGCTGAGTCAG
AAGCTGTCAGAGGAAGAGTTTTTCCGCAGCTCTGCTGCACCTGGCTAAGCGCCGAGGAGTGCA
TAACGTCAATGAGGTGGAAGAGGACACCGGCCAACGAGCTGTCTACAAAGGAACAGATCTCAC
GCAATAGCAAAGCTCTGGAAGAGAAGTATGTCTGCAGAGCTGCAGCTGGAACGGCTGAAGAAA
GATGGCGAGGTGAGAGGGTCAATTAATAGGTTCAAGACAAGCGACTACGTCAAAGAAAGCCAA
GCAGCTGCTGAAAGTGCAGAAGGCTTACCACCAGCTGGATCAGAGCTTCATCGATACTTATA
TCGACCTGCTGGAGACTCGGAGAACCTACTATGAGGGACCAGGAGAAGGGAGCCCCCTTCGGA
TGGAAAAGACATCAAGGAATGGTACGAGATGCTGATGGGACATTGCACCTATTTTTCCAGAAGA
GCTGAGAAGCGTCAAGTACGCTTATAACGCAGATCTGTACAACGCCCTGAATGACCTGAACA
ACCTGGTCATCACCAGGGATGAAAACGAGAACTGGAATACTATGAGAAGTTCCAGATCATC
GAAAACGTGTTTAAAGCAGAAGAAAAAGCCTACACTGAAACAGATTGCTAAGGAGATCCTGGT
CAACGAAGAGGACATCAAGGGCTACCGGGTGACAAGCACTGGAAAACCAGAGTTCCACCAATC
TGAAAGTGTATCACGATATTAAGGACATCACAGCACGGAAAGAAATCATTGAGAACGCCGAA
CTGCTGGATCAGATTGCTAAGATCCTGACTATCTACCAGAGCTCCGAGGACATCCAGGAAGA
GCTGACTAACCTGAACAGCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAACAGATTAGTAATCTGAAGG
GGTACACCGGAACACACAACCTGTCCCTGAAAGCTATCAATCTGATTCTGGATGAGCTGTGG
CATACAAACGACAATCAGATTGCAATCTTTAACCAGCTGAAGCTGGTCCCAAAAAAGGTGGA
CCTGAGTCAGCAGAAAGAGATCCCAACCACACTGGTGGACGATTTCATTCTGTACCCCGTGG
TCAAGCGGAGCTTCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTG
CCCAATGATATCATTATCGAGCTGGCTAGGGAGAAGAACAGCAAGGACGCACAGAAGATGAT
CAATGAGATGCAGAAACGAAACCGGCAGACCAATGAACGCATTGAAGAGATTATCCGAACTA
CCGGGAAAAGAGAACGCAAGTACCTGATTGAAAAAATCAAGCTGCACGATATGCAGGAGGGA
AAGTGTCTGTATTCTCTGGAGGCCATCCCCCTGGAGGACCTGCTGAACAATCCATTCAACTA
CGAGGTCGATCATATTATCCCCAGAAGCGTGTCCCTTCGACAAATCCTTTAACAACAAGGTGC
TGGTCAAGCAGGAAGAGAACTCTAAAAAGGGCAATAGGACTCCTTTCCAGTACCTGTCTAGT
TCAGATTCCAAGATCTCTACGAAACCTTTAAAAAGCACATTCTGAATCTGGCCAAAGGAAA
GGGCCGCATCAGCAAGACCAAAAAGGAGTACCTGCTGGAAGAGCGGGACATCAACAGATTCT
CCGTCCAGAAGGATTTTATTAACCGGAATCTGGTGGACACAAGATACGCTACTCGCGGCCTG
ATGAATCTGCTGCGATCCTATTTCCGGGTGAACAATCTGGATGTGAAAGTCAAGTCCATCAA
CGGCGGGTTCACATCTTTCTGAGGCGCAAATGGAAGTTTAAAAAGGAGCGCAACAAAGGGT
ACAAGCACCATGCCGAAGATGCTCTGATTATCGCAAATGCCGACTTCATCTTTAAGGAGTGG
AAAAAGCTGGACAAAGCCAAGAAAAGTGATGGAGAACCAGATGTTCGAAGAGAAGCAGGCCGA
ATCTATGCCCCGAAATCGAGACAGAACAGGAGTACAAGGAGATTTTCATCACTCCTCACCAGA
TCAAGCATATCAAGGATTTCAAGGACTACAAGTACTCTCACCAGGTGGATAAAAAGCCCAAC
AGAGAGCTGATCAATGACACCTGTATAGTACAAGAAAAGACGATAAGGGGAATACCTGAT
TGTGAACAATCTGAACGGACTGTACGACAAAAGATAATGACAAGCTGAAAAAGCTGATCAACA
AAAGTCCCGAGAAGCTGCTGATGTACCACCATGATCCTCAGACATATCAGAACTGAAGCTG
ATTATGGAGCAGTACGGCGACGAGAAGAACCCTGTATAAGTACTATGAAGAGACTGGGAA
CTACCTGACCAAGTATAGCAAAAAGGATAATGGCCCCGTGATCAAGAAGATCAAGTACTATG
GGAACAAGCTGAATGCCCATCTGGACATCACAGACGATTACCCTAACAGTCGCAACAAGGTG
GTCAAGCTGTCACTGAAGCCATACAGATTGATGTCTATCTGGACAACGGCGTGTATAAATT

10

20

30

40

50

【化 4 7】

TGTGACTGTCAAGAATCTGGATGTCATCAAAAAGGAGAACTACTATGAAGTGAATAGCAAGT
 GCTACGAAGAGGCTAAAAAGCTGAAAAAGATTAGCAACCAGGCAGAGTTCATCGCCTCCTTT
 TACAACAACGACCTGATTAAGATCAATGGCGAACTGTATAGGGTCATCGGGGTGAACAATGA
 TCTGCTGAACCGCATTGAAGTGAATATGATTGACATCACTTACCGAGAGTATCTGGAAAACA
 TGAATGATAAGCGCCCCCTCGAATTATCAAAACAATTGCCTCTAAGACTCAGAGTATCAAA
 AAGTACTCAACCGACATTCTGGGAAACCTGTATGAGGTGAAGAGCAAAAAGCACCCCTCAGAT
 TATCAAAAAGGGCGGATCCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCTCGAGCTAGCAATAAAGGATCG
 TTTATTTTCATTGGAAGCGTGTGTTGGTTTTTTGATCAGGCGCGTCCAAGCTTGCATGCTGG
 GGAGAGATCTGCGGCCGCTAGCAATAAAGGATCGTTTTATTTTCATTGGAAGCGTGTGTTGG
 TTTTTTGATCAGGCGCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTC
 GCTCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCC
 TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号9)

10

【0 4 4 2】

参考文献

- Ambati et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 41(5):1181-1185 (2000a)
 Ambati et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 41(5):1186-1191 (2000b)
 Amrani et al., Genome Biol. 19(1):214 (2018)
 Bae et al., Bioinformatics 30(10):1473-1475 (2014)
 Berson et al., N Engl J Med. 323(19):1302-1307 (1990)
 Briner et al., Mol Cell 56(2):333-339 (2014)
 Burstein et al., Nature. 542(7640):237-241 (2017)
 Casini et al., Nat Biotechnol. 36(3):265-271 (2018)
 Chen et al., Nature. 550(7676):407-410 (2017)
 Cideciyan et al., PNAS. 115 (36):E8547-E8556 (2018)
 Cong et al., Science. 339(6121):819-23 (2013)
 Daiger et al., Arch Ophthalmol. 125(2):151-8 (2007)
 Heigwer et al., Nat Methods 11(2):122-3 (2014)
 Hsu et al., Nat Biotechnol 31(9):827-832 (2013)
 Jiang et al., Nat Biotechnol 31(3):233-239 (2013)
 Jinek et al., Science 337(6096):816-821 (2012)
 Kim et al., Nat Commun. 8:14500 (2017)
 Kleinstiver et al., Nat Biotechnol 33(12):1293-1298 (2015)
 Kleinstiver et al., Nature 529(7587):490-495 (2016)
 Lee et al., Nat Commun. 9(1):3048 (2018)
 Li et al., The CRISPR Journal 01:01 (2018)
 Mali et al., Science 339(6121):823-826 (2013)
 Nishimasu et al., Cell 156(5):935-949 (2014)
 Nishimasu et al., Cell 162(5):1113-1126 (2015)
 Nishimasu et al., Science. 361(6408):1259-1262 (2018)
 Pellissier et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 1:14009 (2014)
 Ran et al., Cell 154(6):1380-1389 (2013)
 Ran et al., Nature. 520(7546):186-91 (2015)
 Strecker et al., Nat Commun. Jan 22;10(1):212 (2019)
 Teng et al., Cell Discov. 4:63 (2018)
 Wang et al., Plant Biotechnol J. pbi.13053 (2018)
 Xiao et al. Bioinformatics 30(8):1180-1182 (2014)
 Yadav et al., Human Molecular Genetics 23(8):2132-2144 (2014)
 Yan et al., Science 363(6422):88-91 (2019)
 Zetsche et al., Nat Biotechnol 33(2):139-142 (2015)

20

30

40

50

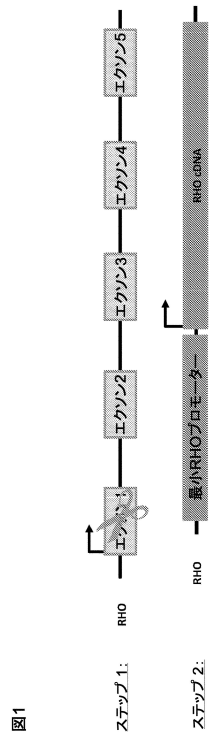
Zetsche et al., Nat Biotechnol. 35(1):31-34 (2017)

【 0 4 4 3 】

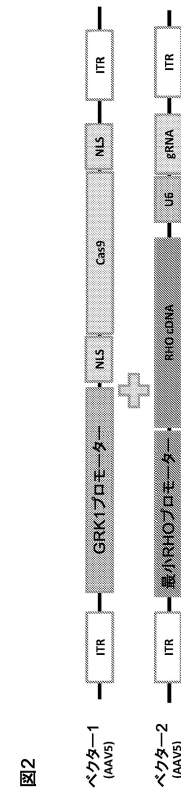
その他の実施形態は、以下の特許請求の範囲内にある。

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 】



10

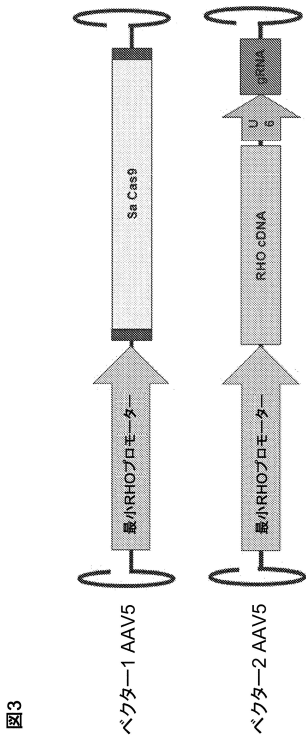
20

30

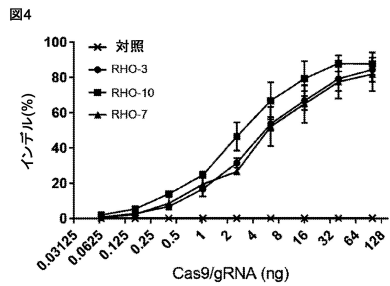
40

50

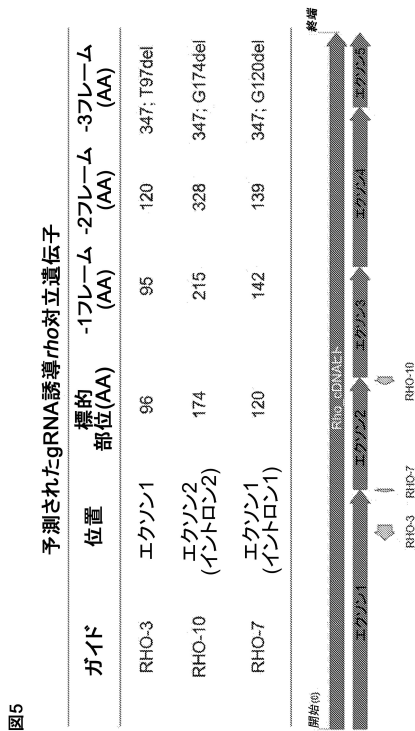
【 図 3 】



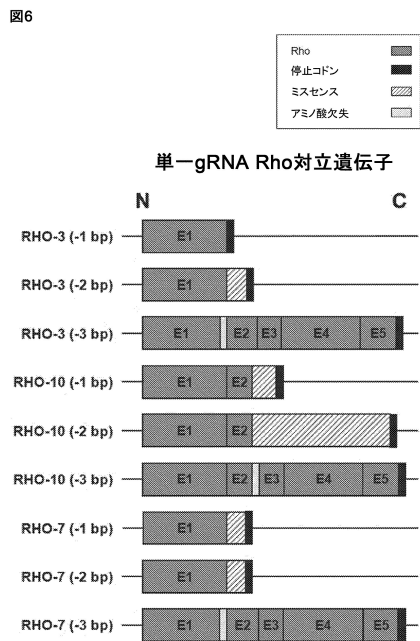
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



10

20

30

40

50

【 図 7 】

図7A

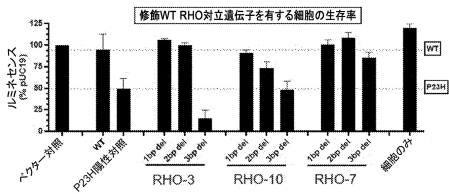
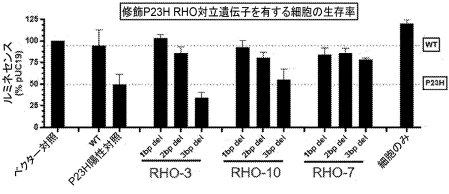
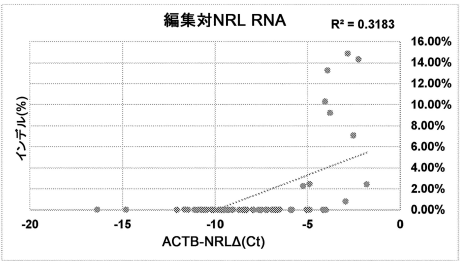


図7B



【 図 8 】

図8

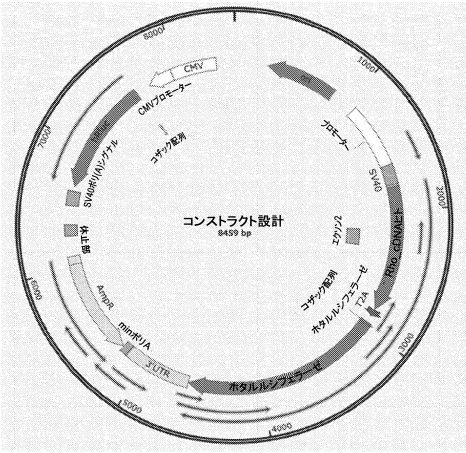


10

20

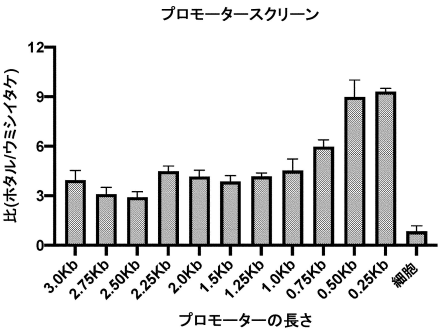
【 図 9 】

図9



【 図 1 0 】

図10



40

50

【 図 1 1 A 】

【 図 1 1 B 】

図11A

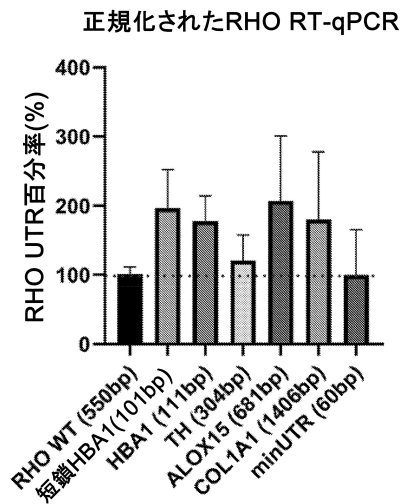
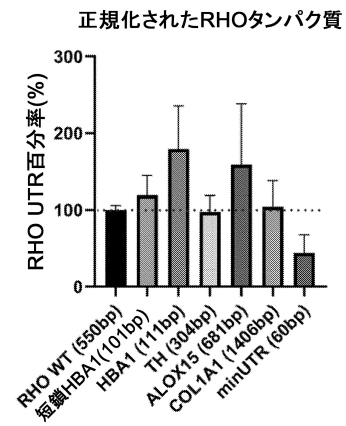


図11B



10

20

【 図 1 2 】

【 図 1 3 】

図12

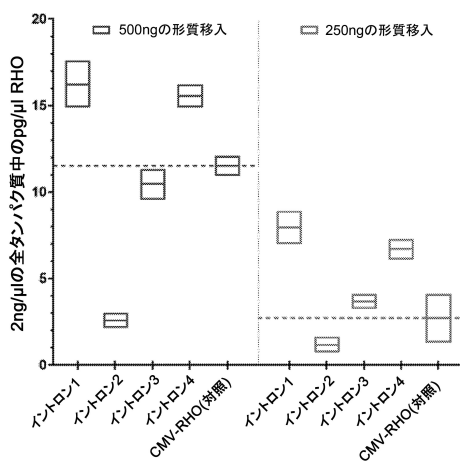
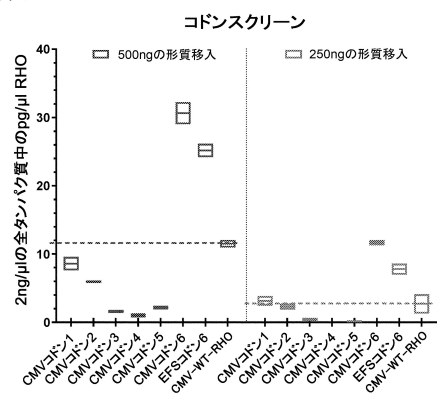


図13

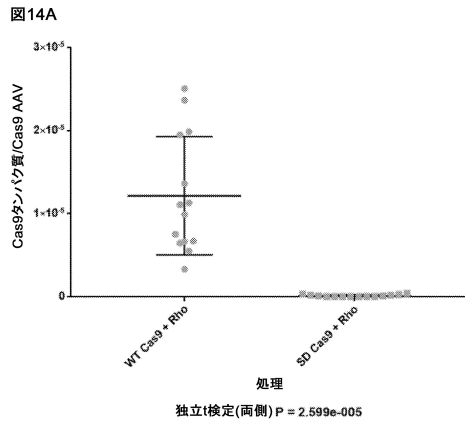


30

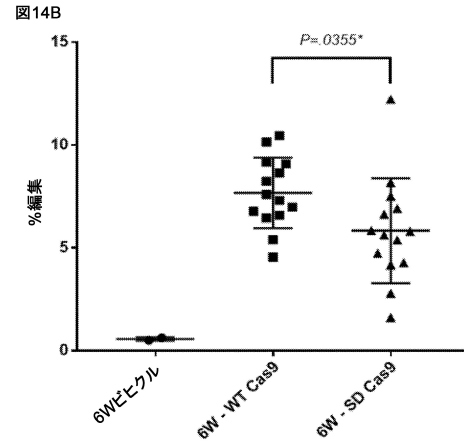
40

50

【 図 1 4 A 】



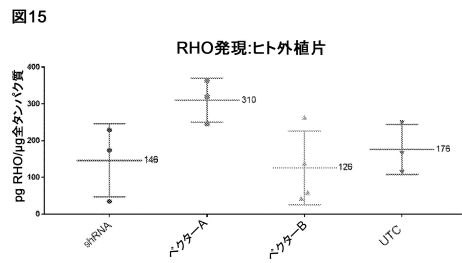
【 図 1 4 B 】



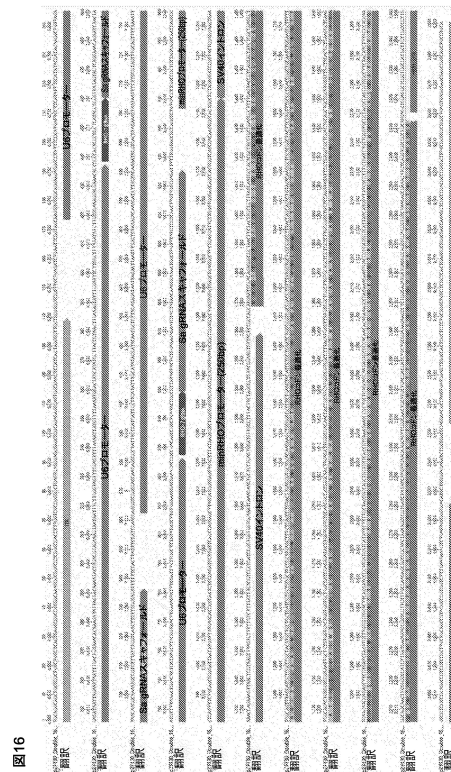
10

20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



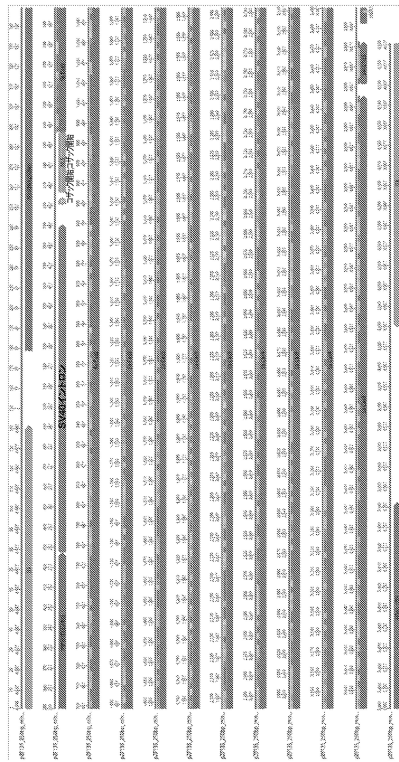
30

40

50

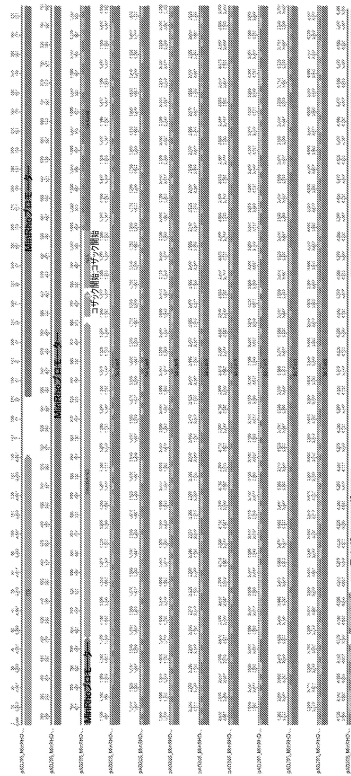
【図 17】

図17



【図 18】

図18



10

20

30

40

50

【配列表】

2022521764000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/019766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/113 C12N15/10 A61K48/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C40B A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/195621 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY [US]) 23 December 2015 (2015-12-23) page 84 - page 97; figures 18, 19; example 4 the whole document page 16; figures 18, 19 ----- -/--	1-5, 10-12, 16,18, 19,23, 26,49, 50,70, 71,89, 102,115, 116
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 June 2020		Date of mailing of the international search report 17/06/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Macchia, Giovanni

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/019766

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2020/019766

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ERIN R. BURNIGHT ET AL.: "Using CRISPR-Cas9 to generate gene-corrected autologous iPSCs for the treatment of inherited retinal degeneration", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, vol. 25, no. 9, 1 September 2017 (2017-09-01), pages 1999-2013, XP055557450, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.05.015 the whole document page 2005 - page 2007; figure 4 -----	1-5, 10-12, 16-19, 23,26, 27,70, 71, 114-116
Y	WO 2018/209158 A2 (EDITAS MEDICINE, INC. [US]) 15 November 2018 (2018-11-15) paragraphs [[0160]], [[0163]] page 68, paragraph [0202] - page 69, paragraph [0203] paragraphs [[0119]], [[0141]].[0152]], [[0165]] - [[0166]], [[0175]] paragraphs [[0190]], [[0193]], [[0194]], [[0199]], [[0200]], [[0209]] paragraph [[0210]] -----	8,9,15, 20-22, 24,25, 44,46, 84-86, 104-106, 108
X	TSAI YI-TING ET AL.: "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-based genome surgery for the treatment of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa", OPHTHALMOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 125, no. 9, 11 May 2018 (2018-05-11), pages 1421-1430, XP085448365, ISSN: 0161-6420, DOI: 10.1016/J.OPHTHA.2018.04.001	1-5, 10-12, 16,18, 19,23, 26-28, 30, 33-43, 45, 47-49, 51-83, 87-103, 107, 109-118
Y	the whole document ----- -/--	8,9,15, 20-22, 24,25, 44,46, 84-86, 104-106, 108

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/019766

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2019/183630 A2 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK [US]) 26 September 2019 (2019-09-26) claim 55	1
X,P	WO 2019/102381 A1 (CASEBIA THERAPEUTICS LLP [GB]) 31 May 2019 (2019-05-31) claims	1
A	SERENA G. GIANNELLI ET AL.: "Cas9/sgRNA selective targeting of the P23H Rhodopsin mutant allele for treating retinitis pigmentosa by intravitreal AAV9.PHP.B-based delivery", HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 27, no. 5, 1 March 2018 (2018-03-01), pages 761-779, XP55700284, ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/hmg/ddx438 the whole document	1
A	MARIA CARMELA LAELLA ET AL.: "In vivo editing of the human mutant rhodopsin gene by electroporation of plasmid-based CRISPR/Cas9 in the mouse retina", MOLECULAR THERAPY-NUCLEIC ACIDS, vol. 5, 1 January 2016 (2016-01-01), page e389, XP055557441, US ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1038/mtna.2016.92 the whole document	1,21,22
A	Pingjuan Li ET AL: "Allele-specific CRISPR/Cas9 genome editing of the single-base P23H mutation for rhodopsin associated dominant retinitis pigmentosa", bioRxiv, 29 January 2018 (2018-01-29), XP055557445, DOI: 10.1101/197962 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2017/10/03/197962.full.pdf the whole document	1
A	WO 2016/176690 A2 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK [US]) 3 November 2016 (2016-11-03)	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/019766

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E. Burnright et al.: "Developing treatments for dominant retinal dystrophies using patient-specific induced pluripotent stem cells", Molecular Therapy, vol. 26, no. 5 Supplement 1 1 May 2018 (2018-05-01), pages 440-441, XP055700520, Retrieved from the Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/journal/molecular-therapy/vol/28/issue/4/suppl/S1 [retrieved on 2020-06-03] the whole document	1-4
A	WO 2015/188056 A1 (SANGAMO BIOSCIENCES INC [US]) 10 December 2015 (2015-12-10) page 30, paragraph [0076] - page 31	5
A	JOANA A. VIDIGAL ET AL.: "Rapid and efficient one-step generation of paired gRNA CRISPR-Cas9 libraries", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 6, no. 1, 17 August 2015 (2015-08-17) , XP055560017, DOI: 10.1038/ncomms9083 the whole document	17
A	US 2016/324987 A1 (CEDARS SINAI MEDICAL CENTER [US]) 10 November 2016 (2016-11-10) page 12; example 21	52
A	BENJAMIN BAKONDI ET AL.: "In vivo CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, vol. 24, no. 3, 1 March 2016 (2016-03-01), pages 556-563, XP055557459, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2015.220 the whole document	1
A	LEE JIA HUI ET AL.: "Gene therapy for visual loss: opportunities and concerns", PROGRESS IN RETINAL AND EYE RESEARCH, OXFORD, GB, vol. 68, 29 August 2018 (2018-08-29), pages 31-53, XP085582549, ISSN: 1350-9462, DOI: 10.1016/J.PRETEYERES.2018.08.003 the whole document	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/019766

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/089462 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. [US]; MASSACHUSETTS INSTITUTE TECHNOLOGY [US]) 18 June 2015 (2015-06-18) example 2	1
A	----- WU WENYI ET AL.: "Application of CRISPR-Cas9 in eye disease", EXPERIMENTAL EYE RESEARCH, ACADEMIC PRESS LTD, LONDON, vol. 161, 12 June 2017 (2017-06-12), pages 116-123, XP085178515, ISSN: 0014-4835, DOI: 10.1016/J.EXER.2017.06.007 the whole document	1
A	----- WO 2018/009562 A1 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]) 11 January 2018 (2018-01-11) -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/019766

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015195621 A1	23-12-2015	AU 2015277369 A1 BR 112016029178 A2 CA 2952697 A1 CL 2016003247 A1 CN 106852157 A DK 3155101 T3 EA 201692510 A1 EP 3155101 A1 EP 3674408 A1 JP 2017519500 A KR 20170020867 A SG 10202002486Q A SG 11201610405R A US 2016074535 A1 US 2018200388 A1 US 2018369420 A1 US 2019365928 A1 WO 2015195621 A1	02-02-2017 17-10-2017 23-12-2015 24-11-2017 13-06-2017 04-05-2020 30-06-2017 19-04-2017 01-07-2020 20-07-2017 24-02-2017 29-04-2020 27-01-2017 17-03-2016 19-07-2018 27-12-2018 05-12-2019 23-12-2015
WO 2018209158 A2	15-11-2018	EP 3622070 A2 US 2020155606 A1 WO 2018209158 A2	18-03-2020 21-05-2020 15-11-2018
WO 2019183630 A2	26-09-2019	NONE	
WO 2019102381 A1	31-05-2019	AU 2018372763 A1 US 2019153440 A1 US 2019153441 A1 WO 2019102381 A1	28-05-2020 23-05-2019 23-05-2019 31-05-2019
WO 2016176690 A2	03-11-2016	EP 3289080 A2 HK 1251615 A1 US 2019275168 A1 WO 2016176690 A2	07-03-2018 01-02-2019 12-09-2019 03-11-2016
WO 2015188056 A1	10-12-2015	EP 3151846 A1 EP 3152319 A1 US 2015353917 A1 WO 2015188056 A1 WO 2015188065 A1	12-04-2017 12-04-2017 10-12-2015 10-12-2015 10-12-2015
US 2016324987 A1	10-11-2016	NONE	
WO 2015089462 A1	18-06-2015	AU 2014361781 A1 BR 112016013201 A2 CA 2932478 A1 CN 106061510 A CN 111206032 A DK 3079725 T3 EP 3079725 A1 EP 3653229 A1 JP 2017504312 A KR 20160089527 A SG 10201804976Y A US 2016340661 A1 WO 2015089462 A1	16-06-2016 26-09-2017 18-06-2015 26-10-2016 29-05-2020 20-01-2020 19-10-2016 20-05-2020 09-02-2017 27-07-2016 30-07-2018 24-11-2016 18-06-2015
WO 2018009562 A1	11-01-2018	AU 2017293773 A1	21-02-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/019766

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		BR 112019000057 A2	02-04-2019
		CA 3029874 A1	11-01-2018
		CL 2019000024 A1	21-06-2019
		CN 109890424 A	14-06-2019
		EP 3481434 A1	15-05-2019
		JP 2019520391 A	18-07-2019
		KR 20190039703 A	15-04-2019
		SG 11201900049Q A	27-02-2019
		US 2020080108 A1	12-03-2020
		WO 2018009562 A1	11-01-2018

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	9/16	(2006.01)	C 1 2 N	9/16	Z
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

弁理士 大宅 郁治

(74)代理人 100153051

弁理士 河野 直樹

(74)代理人 100162570

弁理士 金子 早苗

(72)発明者 ダイナー、ベンジャミン・アリー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 0 2 1 4 5、サマービル、グラント・ストリート 4 0、ナ
ンバー 2

(72)発明者 レヨン、ディーパック

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 0 2 1 4 3、サマービル、ワシントン・ストリート 3 6 0
、ナンバー 2

F ターム (参考) 4B050 CC03 DD01 LL01 LL03

4B065 AA01Y AA90X AA90Y AA95Y AB01 AC20 BA02 CA24 CA31 CA44
CA46

4C084 AA13 NA14 ZA33

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA33

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74