

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7616716号
(P7616716)

(45)発行日 令和7年1月17日(2025.1.17)

(24)登録日 令和7年1月8日(2025.1.8)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z Z N A
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86 Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
請求項の数 17 (全57頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2023-522814(P2023-522814)	(73)特許権者	522229949 北京中因科技有限公司 中華人民共和国 102206 ベキン, チャンピン ディストリクト, ライフ サ イエンス パーク, ライフ ガーデン ロ ード, ナンバー 27, ビルディング 1 Building 1, No. 27, L ife Garden Road, Lif e Science Park, Chan gping District, Bei jing 102206, China
(86)(22)出願日	令和2年10月13日(2020.10.13)	(74)代理人	100112656 弁理士 宮田 英毅
(65)公表番号	特表2024-501098(P2024-501098 A)	(74)代理人	100089118 弁理士 酒井 宏明
(43)公表日	令和6年1月11日(2024.1.11)		
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/120692		
(87)国際公開番号	WO2022/077233		
(87)国際公開日	令和4年4月21日(2022.4.21)		
審査請求日	令和5年6月13日(2023.6.13)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 ビエッティ結晶性ジストロフィー治療用核酸分子およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

シトクロム P 4 5 0 ファミリー 4 サブファミリー V ポリペプチド 2 (C Y P 4 V 2) 遺伝子の特異的に標的とする g R N A であって、 c . 8 0 2 - 8 _ _ 8 1 0 d e l 1 7 b p i n s G C 変異部位の上流および / または下流 2 0 0 b p 以内のヌクレオチド配列に特異的に結合し、前記 g R N A は、 S E Q I D N O : 7 4 , 7 8 - 8 0 , 8 2 - 8 4 のいずれかのヌクレオチド配列を含有する、前記 g R N A。

【請求項 2】

5 ' - (X) n - S E Q I D N O : 7 4 , 7 8 - 8 0 , 8 2 - 8 4 バックボーン配列 - 3 ' を含有し、 X は A、U、C および G から選択されるいずれかの塩基であり、かつ n は 0 - 1 5 のいずれの整数である、請求項 1 に記載の g R N A。

【請求項 3】

前記 g R N A は一本鎖ガイド R N A (s g R N A) である、請求項 1 から 2 のいずれかに記載の g R N A。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれかに記載の C Y P 4 V 2 遺伝子の特異的に標的とする g R N A をコードする、一種または複数種の単離された核酸分子。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の単離された核酸分子を含有する、ベクター。

【請求項 6】

更にドナー核酸分子を含有し、前記ドナー核酸分子は、CYP4V2 遺伝子 c . 8 0 2 - 8 _ 8 1 0 d e l 1 7 b p i n s G C 変異部位の上流および / または下流 8 0 0 b p 以内の正常野生型のヌクレオチド配列を含有する、請求項 5 に記載のベクター。

【請求項 7】

前記ドナー核酸分子は、SEQ ID NO : 6 4 - 6 6 のいずれかのヌクレオチド配列を含有する、請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 8】

前記単離された核酸分子と前記ドナー核酸分子が同一ベクター上に存在する、請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 9】

前記ベクターはウイルスベクターである、請求項 5 から 8 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 10】

請求項 4 に記載の単離された核酸分子、および / または請求項 5 から 9 のいずれかに記載のベクターを含有する、細胞。

【請求項 11】

前記細胞は、HEK293 細胞、腎上皮細胞および / または人工多能性幹細胞を含む、請求項 10 に記載の細胞。

【請求項 12】

前記細胞は、修飾により分化能を有する、請求項 10 から 11 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 13】

前記細胞は、3D - 網膜オルガノイドに分化することができる、請求項 10 から 11 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 14】

i) 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の gRNA、請求項 4 に記載の一種または複数種の単離された核酸分子、および / または請求項 5 に記載のベクター、ii) Casヌクレアーゼ、または該 Casヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子又はベクター、iii) 請求項 6 又は 7 で定義されたドナー核酸分子、または該ドナー核酸分子を含むベクター、および iv) 薬学的に許容される担体を含有する、医薬組成物。

【請求項 15】

疾患の治療のための医薬組成物の製造における、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の gRNA、請求項 4 に記載の一種または複数種の単離された核酸分子、および / または請求項 5 から 9 のいずれかに記載のベクターの使用であって、前記疾患は CYP4V2 遺伝子における c . 8 0 2 - 8 _ 8 1 0 d e l 1 7 b p i n s G C 変異による疾患を含み、前記医薬組成物は、請求項 14 に記載の医薬組成物である、前記使用。

【請求項 16】

前記疾患はビエッティ結晶性ジストロフィーを含む、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

細胞における CYP4V2 遺伝子の発現を調節する非治療性方法であって、前記細胞に請求項 1 から 3 のいずれかに記載の gRNA、請求項 4 に記載の一種または複数種の単離された核酸分子、および / または請求項 5 から 9 のいずれかに記載のベクターを導入することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願はバイオ医薬分野に関し、より詳細には、ビエッティ結晶性ジストロフィーを遺伝子編集治療するための gRNA とドナー核酸分子に関する。

【背景技術】

【0002】

ビエッティ結晶性ジストロフィー ((B i e t t i c r y s t a l l i n e d y s t r o p h y 、 B C D) 、結晶性網膜色素変性症、ビエッティ結晶性角膜網膜ジストロフィ

10

20

30

40

50

ー (Bietti Crystalline Corneoretinal Dystrophy)、クリスタリン網膜症 (Bietti Crystalline Retinopathy)、ビエッティの網膜ジストロフィー (Bietti's Retinal Dystrophy) と呼ばれることもある。) は失明に至る常染色体潜性遺伝性網膜変性疾患である。CYP4V2 遺伝子は現在発見されたBCDの原因遺伝子の一つである (Lietal. Am J Hum Genet. 74: 817-826, 2000)。CYP4V2 はシトクロムP450スーパーファミリーに属し、ヘム-チオレートタンパク質シトクロムP450サブファミリー4 (CYP4) のメンバーである。

【0003】

現在、当該疾患のためにいくつかの治療法があり、例えば、ウイルストランスフェクションシステム、またはその他のトランスフェクションシステム (例えば、AAV、レンチウイルス、レトロウイルス) を利用して、CYP4V2 の野生型遺伝子を遺伝子変異の細胞にトランスフェクトすることで、遺伝子変異の細胞が野生型CYP4V2 を発現することができる遺伝子置換療法がある。この方法では、変異細胞の機能を部分的にしか回復させることができず、しかも治療の有効性が限られている。それは、変異型の遺伝子産物は仍然として細胞に存在し、これらの変異タンパク質は正常の遺伝子産物を競合的に阻害してしまう。そのため、より安全かつ有効な治療方法の開発は期待されている。

10

【0004】

当該背景技術の部分で開示された情報は、本願の一般的な背景に対する理解を深めるためのものにすぎず、それらの情報が当業者に公然知られた従来技術を形成するという承認またはいかなる形の示唆ではない。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本願は、シトクロムP450ファミリー4サブファミリーVポリペプチド2 (CYP4V2) を特異的に標的とするgRNAを提供するものであって、前記gRNAはc.802-8_810del17bpinsGC変異部位を特異的に標的とし、前記gRNAは前記変異部位に対して良好な切断効果を有するので、オリジナル変異のCYP4V2 遺伝子産物は細胞に存在しなくなる。また、本願はドナー核酸分子を提供し、前記ドナー核酸分子は、c.802-8_810del17bpinsGC変異部位を含有しない正確なCYP4V2 のヌクレオチド配列を含有し、前記ドナー核酸分子は、内在性CYP4V2 が前記gRNAによって切断された後、遺伝子変異の細胞において、CYP4V2 の変異部位を修復することで、正常な機能を有するCYP4V2 タンパク質を作り、優れた修復効果を有する。本願は、前記gRNAおよび/または前記ドナー核酸分子を含有するベクターを提供するものであって、CYP4V2 変異の細胞が正確にシトクロムP450ファミリー4サブファミリーVポリペプチド2を発現することを可能にし、良好な遺伝子の編集修復効率を有する。

30

【0006】

一方、本願は、シトクロムP450ファミリー4サブファミリーVポリペプチド2 (CYP4V2) 遺伝子を特異的に標的とするgRNAを提供するものであって、前記gRNAはc.802-8_810del17bpinsGC変異部位の上流および/または下流200bp以内のヌクレオチド配列に特異的に結合する。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

一実施形態において、前記gRNAはSEQ ID NO: 74、78-80、82-84のいずれかのヌクレオチド配列を含有する。

【0008】

一実施形態において、前記gRNAは5'-(X)_n-SEQ ID NO: 74、78-80、82-84-バックボーン配列-3'を含有し、XはA、U、CおよびGから選択されるいずれかの塩基であり、かつnは0-15のいずれの整数である。

50

【 0 0 0 9 】

一実施形態において、前記 g R N A は一本鎖ガイド R N A (s g R N A) である。

【 0 0 1 0 】

他方、本願は、前記 C Y P 4 V 2 遺伝子の特異的に標的とする g R N A をコードする、一種または複数種の単離された核酸分子を提供するものである。

【 0 0 1 1 】

他方、本願は、C Y P 4 V 2 遺伝子 c . 8 0 2 - 8 _ 8 1 0 d e l 1 7 b p i n s G C 変異部位の上流および/または下流 8 0 0 b p 以内の正常野生型のヌクレオチド配列を含有するドナー核酸分子を提供するものである。

【 0 0 1 2 】

一実施形態において、前記核酸分子は S E Q I D N O : 6 4 - 6 6 のいずれかのヌクレオチド配列を含有する。

【 0 0 1 3 】

他方、本願は、前記単離された核酸分子および/または前記ドナー核酸分子を含有する、ベクターを提供するものである。

【 0 0 1 4 】

一実施形態において、前記単離された核酸分子と前記ドナー核酸分子が同一ベクター上に存在する。

【 0 0 1 5 】

一実施形態において、前記ベクターはウイルスベクターである。

【 0 0 1 6 】

他方、本願は、前記単離された核酸分子、前記ドナー核酸分子および/または前記ベクターを含有する、細胞を提供するものである。

【 0 0 1 7 】

一実施形態において、前記細胞は H E K 2 9 3 細胞、腎上皮細胞および/または人工多能性幹細胞を含む。

【 0 0 1 8 】

一実施形態において、前記細胞は修飾により分化能を有する。

【 0 0 1 9 】

一実施形態において、前記細胞は 3 D - 網膜オルガノイドに分化することができる。

【 0 0 2 0 】

他方、本願は、前記 g R N A 、前記一種または複数種の単離された核酸分子、前記ドナー核酸分子、および/または前記ベクター、および薬学的に許容される担体を含有する、医薬組成物を提供するものである。

【 0 0 2 1 】

他方、本願は、疾患の治療のための医薬の製造における、前記 g R N A 、前記一種または複数種の単離された核酸分子、前記ドナー核酸分子、および/または前記ベクターの使用を提供するものであって、前記疾患は C Y P 4 V 2 遺伝子における c . 8 0 2 - 8 _ 8 1 0 d e l 1 7 b p i n s G C 変異による疾患を含む。

【 0 0 2 2 】

一実施形態において、前記疾患はピエッティ結晶性ジストロフィーを含む。

【 0 0 2 3 】

他方、本願は、必要とする被験者に前記 g R N A 、前記一種または複数種の単離された核酸分子、前記ドナー核酸分子、および/または前記ベクターを導入する工程を含む、ピエッティ結晶性ジストロフィーを治療する方法を提供するものである。

【 0 0 2 4 】

一実施形態において、前記導入で、正常な機能を有する C Y P 4 V 2 タンパク質が獲得される。

【 0 0 2 5 】

一実施形態において、前記導入は注射を含む。

10

20

30

40

50

【0026】

一実施形態において、前記導入は網膜下注射を含む。

【0027】

他方、本願は、細胞に前記 gRNA、前記一種または複数種の単離された核酸分子、および/または前記ベクターを導入することを含む、細胞における CYP4V2 遺伝子の発現を調節する方法を提供するものである。

【0028】

当業者なら以下の詳細な説明から本願の他の態様や利点を容易に了解する。以下の詳細な説明では、本願の例示的な実施形態のみを示し、説明している。当業者ならわかるように、本願の内容を理解すれば、当業者は本願発明の精神及び範囲から逸脱することなく、開示された特定の実施形態に変更を加えることが可能である。したがって、本願の図面及び明細書の記載は、例示的なものに過ぎず、限定的なものではない。

【図面の簡単な説明】

【0029】

本願発明の具体的な特徴は、添付の特許請求の範囲に示されている。以下で詳細に説明する例示的な実施形態と図面を参照することによって、より確実に理解されるだろう。図面に関して、以下のように簡単に説明する。

【0030】

【図1A】本願に記載の sgRNA 1 - 2 による前記変異遺伝子の dsDNA 切断結果を示す図である。

【図1B】本願に記載の sgRNA 3 - 5 による前記変異遺伝子の dsDNA 切断結果を示す図である。

【図1C】本願に記載の sgRNA 6 - 8 による前記変異遺伝子の dsDNA 切断結果を示す図である。

【図1D】本願に記載の sgRNA 9 - 11 による前記変異遺伝子の dsDNA 切断結果を示す図である。

【図1E】本願に記載の sgRNA 12 - 14 による前記変異遺伝子の dsDNA 切断結果を示す図である。

【図1F】本願に記載の sgRNA 15 による前記変異遺伝子の dsDNA 切断結果を示す図である。

【図1G】本願に記載の sgRNA 16 - 19 による前記変異遺伝子の dsDNA 切断結果を示す図である。

【図1H】本願に記載の sgRNA 20 - 22 による前記変異遺伝子の dsDNA 切断結果を示す図である。

【図1I】本願に記載の sgRNA 23 による前記変異遺伝子の dsDNA 切断結果を示す図である。

【図2】本願に記載の AAV-saCas9-puroベクターのプラスミドマップを示す図である。

【図3】sgRNA 8、sgRNA 12、sgRNA 13、sgRNA 14、sgRNA 16、sgRNA 17、sgRNA 18 切断後の断片の T7E1 酵素切断実験の結果を示す図である。

【図4A】sgRNA 13 切断後のゲノムDNAが切断部位を含むPCR断片の遺伝子配列決定結果を示す図である。

【図4B】sgRNA 17 切断後のゲノムDNAが切断部位を含むPCR断片の遺伝子配列決定結果を示す図である。

【図4C】sgRNA 18 切断後のゲノムDNAが切断部位を含むPCR断片の遺伝子配列決定結果を示す図である。

【図5】sgRNA 13、sgRNA 17、sgRNA 18、sgRNA 13+17、sgRNA 13+18 の 293T 細胞中の切断効率の柱状図を示す図である。

【図6】ドナー配列の設計図を示す図である。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0031】

以下では、特定の具体的な実施例を参照して本発明の実施形態を説明するが、本発明の他の利点および効果は、本願明細書で開示される内容から、当業者には容易に理解されると思われる。

【0032】

用語の定義

【0033】

本願において、用語「CYP4V2」とは、一般的に、シトクロムP450ファミリー4サブファミリーVメンバー2であるタンパク質を指す。用語「シトクロムP450」とは、cytochrome P450またはCYP450と呼ばれてもよく、一般的に、内在性物質または薬物、環境化合物を含む外在性物質の代謝に関与する、モノオキシゲナーゼの一種類である、一類のヘムタンパク質ファミリーを指す。アミノ酸配列の相同性により、そのメンバーはそれぞれ、ファミリー、サブファミリーおよび酵素個体という三つに分類される。シトクロムP450酵素系はCYPと略記されることができ、ただし、ファミリーはアラビア数字で、サブファミリーはアルファベットの大文字で、酵素個体はアラビア数字で表され、例えば本願におけるCYP4V2のように示される。ヒトCYP4V2遺伝子(HGNC:23198;NCBI ID:285440)は、通常全長が19.28 kbであり、4q35に位置し、11個のエクソンを有し、脂肪酸代謝に重要な役割を果たす(Kumar S., Bioinformatics, 2011, 7:360-365)。本願に記載のCYP4V2は、その機能的変異体、断片、ホモログ等を含むことができる。CYP4V2は、ほぼすべての組織で発現するが、網膜および網膜色素上皮では高レベルで、角膜組織ではやや低レベルで発現している。CYP4V2遺伝子の変異は、ピエッティ結晶性ジストロフィーおよび/または網膜色素変性に関連している可能性がある。

【0034】

本願において、用語「c.802-8_810del17bpinsGC」は、比較的一般的なCYP4V2遺伝子変異であり、イントロン6の3'末端とエクソン7の5'末端の17対の塩基対の除去に属し、それによってエクソン7の欠失をもたらす。転写タンパク質の構造と活性変化をもたらす。例示的な野生型CYP4V2のイントロン6とエクソン7との間の配列は、c a a a c a g a a g c a t g t g a t t a t c a t t c a a a T C A T A C A G G T C A T C G C T g a a c g g g c c a a t g a a a t g a a c g c c a a t g a (SEQ ID NO:90)で示することができる。例示的なc.802-8_810del17bpinsGC変異配列は、以下のように示することができる。イントロン6配列とエクソン7との間の配列において、17bpが欠失(野生型では大文字で表される配列)され、GC(大文字で表される)が挿入された:c a a a c a g a a g c a t g t g a t t a t c a t t c a a a G C g a a c g g g c c a a t g a a a t g a a c g c c a a t g a (SEQ ID NO:91)。(Xiao et al. Biochem Biophys Res Commun. 409:181-6, 2011; Meng et al. Mol. Vis., 20:1806-14; Wada et al. Am J Ophthalmol. 139:894-9, 2005; Jiao et al. European Journal of Human Genetics (2017) 25, 461-471.)。本願において、前記「c.802-8_810del17bpinsGC変異部位」は、SEQ ID NO:91で示されるヌクレオチド配列において欠失している部分、またはCGを増加させた位置に存在してもよい。「c.802-8_810del17bpinsGC変異部位の上流および/または下流800bp内」は、c a a a c a g a a g c a t g t g a t t a t c a t t c a a a T C A T A C A G G T C A T C G C T g a a c g g g c c a a t g a a a t g a a c g c c a a t g a (SEQ ID NO:90)において、大文字で標記されるヌクレオチド配列のN末端と結合された塩基(すなわち「a」)から、5'末端方向への約800bp以内のヌクレオチド、または、大文字で標記されるヌ

10

20

30

40

50

クレオチド配列のC末端と結合された塩基（すなわち「g」）から、3'末端方向への約800bp以内のヌクレオチドを含むことができる。

【0035】

本願において、用語「変異」とは、一般的に、特定のタンパク質または核酸（遺伝子、RNA）の野生型タンパク質または核酸のアミノ酸または核酸配列に対する差異を指す。変異されたタンパク質または核酸は、遺伝子の1つの対立遺伝子（ヘテロ接合）または2つの対立遺伝子（ホモ接合）によって発現されてもよく、またはその中で発見されてもよい。変異には、欠失変異、切断、不活性化、破壊、置換変異または転位が含まれる。これらの種類の変異は当該技術分野でよく知られている。本願において、CYP4V2に関連する変異は、CYP4V2遺伝子のミスセンス（missense）、反復、スプライシング位置、フレームシフト、削除、挿入、挿入または欠失（indel）、ナンセンス、多型（例えば、一塩基多型）、および早期終了（premature termination）、およびCYP4V2遺伝子全体の欠失が含まれているが、これらに限定されない。

10

【0036】

本願において、用語「単離された核酸分子」とは、前記核酸の天然源に存在する他の核酸分子から分離されるものを指す。このような単離された核酸分子は、その通常または天然環境から除去されまたは分離され、あるいは前記分子はその通常または天然環境に存在しない方法で製造され、通常または天然環境におけるポリペプチド、ペプチド、脂質、炭水化物、他のポリヌクレオチドその他物質から分離されるものである。本願の単離された核酸分子はRNAをコードすることができ、例えば、CYP4V2遺伝子を特異的に標的とするgRNAをコードすることができる。

20

【0037】

本願において、用語「ドナー核酸分子」とは、一般的に、レシピエント（例えば、レシピエント核酸分子）に異種核酸配列を提供する核酸分子を指す。

【0038】

本願において、用語「バックボーン配列」とは、一般的に、gRNAにおける、標的配列を認識またはハイブリダイズする部分以外の部分を指し、sgRNAにおけるgRNAペアリング配列と転写ターミネーターの間の配列を含んでもよい。バックボーン配列は一般的に標的配列の変化によって変化することなく、gRNAが標的配列を認識することにも影響を与えない。そのため、バックボーン配列は従来技術における利用可能な任意の配列である。バックボーン配列の構造について、文献Nowak et al. *Nucleic Acids Research* 2016, 44:9555-9564のFigure 1（図1）におけるAとB、Figure 3（図3）におけるA、B、C、およびFigure 4（図4）におけるA、B、C、D、Eに記載のスペーサー配列（spacer sequence）以外の部分を参照してもよい。

30

【0039】

本願において、用語「ベクター」とは、一般的に、適切な宿主中で自己複製することができる核酸分子を指し、これは挿入された核酸分子（例えば、外在性配列）を宿主細胞中および/または宿主細胞間に移すことができる。前記ベクターは、主にDNAまたはRNAを細胞に挿入するためのベクター、主にDNAまたはRNAを複製するためのベクター、および主にDNAまたはRNAの転写および/または翻訳の発現のためのベクターを含むことができる。前記ベクターは、また複数種の上記機能を有するベクターを含む。前記ベクターは、適切な宿主細胞を導入する際にポリペプチドに転写および翻訳できるポリヌクレオチドであってもよい。通常、前記ベクターを含む適切な宿主細胞を培養することにより、前記ベクターは所望の発現産物を生成することができる。本願に記載のベクターは、例えば、発現ベクター、ウイルスベクター（レンチウイルスベクターおよび/またはレトロウイルスベクター）、ファージベクター、ファージミド、粘粒、コスミド（cosmid）、人工染色体（酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、またはP1由来の人工染色体（PAC））、および/またはプラスミドを含むことができる。

40

50

【0040】

本願において、用語「gRNA」とは、一般的に、RNA分子であるガイドRNA (guide RNA) を指す。自然界では、crRNAとtracrRNAは通常、2つの別々のRNA分子として存在し、gRNAを構成している。用語「crRNA」とは、CRISPR RNAと呼ばれてもよく、一般的に、標的化された標的DNAに相補的なヌクレオチド配列のストレッチを指し、用語「tracrRNA」とは、一般的に、Casヌクレアーゼに結合できる足場型のRNAを指す。crRNAとtracrRNAはまた、一本鎖に融合されてもよく、その場合、gRNAは一本鎖ガイドRNA (single guide RNA、sgRNA) とも呼ばれる。sgRNAは当業者がCRISPR技術で使用するgRNAの最も一般的な形態となっているため、用語「sgRNA」と「gRNA」は本願において同じ意味を有する場合がある。sgRNAは人工的に合成されるか、DNAテンプレートからインビトロでまたはインビボで製造されることが可能である。sgRNAはCasヌクレアーゼに結合することができ、また、標的DNAを標的化して、Casヌクレアーゼに、gRNAに相補的なDNA部位を切断するように指示することができる。

10

【0041】

本願において、用語「特異的に標的とする」とは、一般的に兩種分子 (例えば、分子Aと分子B) 間の相互作用 (例えば、分子Aが分子Bを特異的に識別および/または結合する (例えば、標的)) を指す。他の非B分子との相互作用と比較して、分子Aは統計学的に有意な程度で分子Bと相互作用する。前記相互作用は共有結合であっても非共有結合であってもよい。ポリヌクレオチドに関する場合、特異的に標的とするとは、分子A (またはその一本鎖) と分子B (またはその一本鎖) が塩基相補的なペアリングの関係を有することを指すことができる。本願において、「特異的に標的とする」とは、gRNAが標的配列を識別および/または結合するプロセスを指すことができる。

20

【0042】

本願において、用語「標的核酸」、「標的核酸」、「標的配列」及び「標的領域」は交換的に使用されてもよく、通常はgRNAによって識別されてもよい核酸配列を指し、前記標的核酸は二本鎖核酸を指してもよく、一本鎖核酸を指してもよい。

【0043】

本願において、用語「3D-網膜オルガノイド」とは、一般的に、三次元構造を有し、自己再生、自己組織化が可能であり、網膜の基本機能 (例えば、光感受性) を示す人工的に培養された網膜を指す。3D-網膜オルガノイドは、一次組織または幹細胞 (例えば、多能性幹細胞) から分化してなることができ、光に反応し、脳へ信号を送るために必要な網膜のすべての細胞を備える。

30

【0044】

本願において、用語「ピエッティ結晶性ジストロフィー」とは、一般的に、一群の常染色体潜性遺伝性眼疾患を指す。主な症状として、角膜における結晶 (透明な被膜)、網膜の光感受性組織に沈着した微細な黄色または白色の結晶性沈着物、ならびに網膜、脈絡膜毛細血管および脈絡膜の進行性萎縮を含む。ピエッティ結晶性ジストロフィーはCYP4V2遺伝子変異に起因する疾患を含むことができる。

40

【0045】

本願において、用語「網膜下注射」とは、一般的に、光受容細胞と網膜色素上皮 (RPE) 層との間に、導入される物質を導入することを指す。網膜下注射の間、物質 (例えば、本願に記載のgRNA、本願に記載の一種または複数種の単離された核酸分子、本願に記載のドナー核酸分子、本願に記載のベクター、および薬学的に許容される担体) は光受容細胞と網膜色素上皮 (RPE) 層との間に導入され、その間に空間が形成される。

【0046】

本願において、用語「細胞」は、当該技術分野において一般的に認められた意味を有する。当該用語は、その通常の生物学的意味で用いられており、完全な多細胞生物、例えば具体的にはヒトを指すものではない。細胞は、鳥類、植物および哺乳動物、例えば、ヒト

50

、ウシ、ヒツジ、類人猿、サル、ブタ、イヌおよびネコなどの生物体に存在することができる。細胞は、前核（例えば、細菌細胞）であってもよく、真核（例えば、哺乳動物または植物細胞）であってもよい。細胞は、体細胞起源または生殖細胞起源、全能性または多能性、分裂または非分裂でありうる。細胞は、配偶子もしくは胚、幹細胞、または完全に分化した細胞に由来するものであってもよく、それらを含んでもよい。

【 0 0 4 7 】

本願において、用語「人工多能性幹細胞」とは、一般的に、体細胞が一定の条件下で全能性状態に戻った細胞を指す。前記全能性とは、それが持つ、生体のあらゆる種類の細胞に分化し、完全な胚を形成したり、さらに新しい個体に成長したりする能力を指す。例えば、本願において、前記人工多能性幹細胞は、腎上皮細胞を培養することにより得られる、網膜細胞に分化する能力を有するものを含む。

10

【 0 0 4 8 】

本願において、用語「H E K 2 9 3 細胞」とは、一般的に、「ヒト胚性腎細胞 2 9 3」を指し、ヒト胚性腎細胞に由来する細胞であり、培養が容易であり、トランスフェクション効率が高いという特徴を持ち、外在性遺伝子の研究にあたり、当該技術分野で一般的に用いられている細胞株である。本願において、用語「2 9 3 T 細胞」または「H E K 2 9 3 T 細胞」は、「H E K 2 9 3 細胞」に由来する細胞であり、当該技術分野で一般的に使用される細胞株である。

【 0 0 4 9 】

本願において、用語「腎上皮細胞」とは、一般的に、ヒト尿から採取される腎臓の上皮細胞を指す。本願において、それは人工多能性幹細胞の供給源となってもよい。当該技術分野では、尿における腎上皮細胞を用いて多能性幹細胞を誘導することは、費用対効果が高く、汎用性があり、様々な年齢、性別および人種に対応することができる。この技術では、他の既存の方法より、患者の検体を大量に取得することはかなり容易かつ経済的になる。

20

【 0 0 5 0 】

本願において、用語「医薬組成物」とは、一般的に、必要とする被験者への投与に適した組成物を指す。例えば、本願に記載の医薬組成物は、本願に記載の g R N A、本願に記載の一種または複数種の単離された核酸分子、本願に記載のドナー核酸分子および/または本願に記載のベクター、ならびに薬学的に許容される担体を含有してもよい。用語「被験者」または「個体」または「動物」または「患者」は、本願において、本願の医薬組成物の投与を需要とする被験者、例えば哺乳動物被験者を指すために互換的に使用される。動物被験者には、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、黄牛、乳牛等、例えばマウスが含まれる。一実施形態において、医薬組成物は、網膜下、非経口、経皮、腔内、動脈内、膜内および/または鼻腔内投薬あるいは組織に直接注射するための組成物を含む。例えば、前記医薬組成物は網膜下注射によって被験者に投薬される。

30

【 0 0 5 1 】

本願に記載の特定のタンパク質とヌクレオチドに加えて、本願では変異体、誘導體、類似体、ホモログおよびその断片の使用を含むことができる。

40

【 0 0 5 2 】

本願の文脈において、任意の所与の配列の変異体とは、前記ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが少なくとも一つの内在性機能を基本的に保持するように、残基の特定の配列（アミノ酸残基またはヌクレオチド残基のいずれか）が修飾されている配列を指す。変異体配列は、天然に存在するタンパク質および/またはポリヌクレオチドに存在する少なくとも一つのアミノ酸残基および/またはヌクレオチド残基の付加、欠失、置換、修飾、代替および/または変異によって得ることができる。

【 0 0 5 3 】

本願において、用語「誘導體」とは、一般的に、本願のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに関して、得られるポリペプチドまたはポリヌクレオチドはその少なくとも一つの

50

内在性機能を基本的に保持する限り、配列からのノへの一つ（または複数）のアミノ酸残基のいかなる置換、変異、修飾、代替、欠失およびノまたは付加を含むものを指す。

【0054】

本願において、用語「類似体」とは、一般的に、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに関して、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドのいかなる模倣体、すなわち、当該模倣体が模倣するポリペプチドまたはポリヌクレオチドの少なくとも一種内在性機能を有する化学化合物を含むものを指す。

【0055】

通常、修飾された配列は所望の活性または能力を基本的に保持する限り、例えば少なくとも1個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または20個以上）のアミノ酸置換を行うことができる。アミノ酸置換は、非天然に存在する類似体を使用することができる。

10

【0056】

本願で使用されるタンパク質またはポリペプチドはまた、前記アミノ酸残基に非表現の変化を生じ、機能的に同等のタンパク質をもたらすアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を有してもよい。内在性機能が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性およびノまたは両親媒性の類似性に基づいて、意図的なアミノ酸置換を行ってもよい。例えば、負の電荷を帯びたアミノ酸としてはアスパラギン酸とグルタミン酸が挙げられ、正の電荷を帯びたアミノ酸としてはリジンとアルギニンが挙げられ、また、電気的に極性のある頭部基を持たない親水性の値が類似したアミノ酸としてはアスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニンとチロシンが挙げられる。

20

【0057】

本願において、用語「ホモログ」とは、一般的に、野生型アミノ酸配列と野生型ヌクレオチド配列と一定の相同性を有するアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を指す。用語「相同性」は「同一性」と等同に理解してもよい。相同配列は、主題配列 (subject sequence) と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%が相同なアミノ酸配列を含むことができる。通常、ホモログは主題アミノ酸配列 (subject amino acid sequence) と相同な活性部位等を含む。相同性は、類似性（すなわち、類似する化学性質/機能を有するアミノ酸残基）の観点から考慮してもよく、配列の同一性の観点から相同性を表現してもよい。本願において、言及されるアミノ酸配列またはヌクレオチド配列のSEQ ID NOのいずれか一項においてパーセント同一性を有する配列とは、言及されるSEQ ID NOの全長にわたり、前記パーセント同一性を有する配列を指す。

30

【0058】

配列同一性を決定するために、配列アラインメントを行うことができる。これは当業者に公知の様々な方法で行われ、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLEまたはMegalign (DNASTAR) ソフトウェア等を使用することができる。当業者は、比較される全長配列にわたって最適なアラインメントを実現するために必要ないかなるアルゴリズムを含む、アラインメントのための適切なパラメータを決定することができる。

40

【0059】

本願において、用語「およびノまたは」、選択肢のいずれか一方、又は選択肢の両方を意味すると理解されるべきである。

【0060】

本願において、用語「含有する」とは、一般的に、明示的に指定された特徴を含むが、他の要素を除外することを意図していないことを指す。

【0061】

本願において、用語「約」とは、一般的に、指定される数値以上または以下0.5% - 10%の範囲内で変化すること、例えば、指定される数値以上または以下0.5%、1%、

50

1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、または10%の範囲内で変化することを指す。

【発明の詳細な説明】

【0062】

gRNA

【0063】

一方、本願は、シトクロムP450ファミリー4サブファミリーVポリペプチド2の遺伝子(CYP4V2遺伝子)を特異的に標的とするgRNAを提供するものであって、前記gRNAはCYP4V2遺伝子の変異部位を特異的に標的とする。

【0064】

特定の実施態様において、CYP4V2の一個または複数個イントロンおよびエクソンには、異なる数(例えば、1対、2対、3対、4対、10対、20対、50対、100対)の塩基対の除去または増加、ヌクレオチドの変異または代替が生じられ、それによってCYP4V2タンパク質構造の変化と機能の損失をもたらす。例えば、前記CYP4V2遺伝子の変異部位は、表1に示す変異部位を含むことができる。

【0065】

【表1-1】

表1 CYP4V2遺伝子の変異部位

エクソン又はイントロン	変異部位	変異結果
E1	c. 31C>T	p. QHX
	c. 64C>G	p. L22V
	c. 71T>C	p. L24P
	c. 77G>A	p. G26D
	c. 130T>A	p. W44R
	c. 134A>C	p. Q45P
	c. 181G>A	p. G61S
	c. 197T>G	p. M66R
IVS1	c. 214+1G>A	エクソン1欠失
	c. 214+25delT	不可用
	c. 215-2A>G	エクソン2欠失
	c. 215-1G>A	エクソン2欠失
E2	c. 219T>A	p. F73L
	c. 237G>T	p. E79D
	c. 253C>T	p. R85C
	c. 277T>C	p. W93R
	c. 283G>A	p. G95R
	c. 327G>A	不可用
IVS2	c. 327+1G>A	p. E72Gfs*5
	c. 327+HG>C	不可用

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

表 1 CYP4V2 遺伝子の変異部位

エクソン又はイントロン	変異部位	変異結果
E3	c. 332T>C	p. I I I T
	c. 335T>G	p. L112*
	c. 367A>G	P. M123V
	c. 400G>T	p. G134*
	c. 413+2T>G	スプライス変異
	c. 283G>A	p. G95R
E4	c. 518T>G	p. L173W
E5	c. 637_641delAGTAA	p. S213*
	c. 655T>C	p. Y219H
E7	c. 802-8_806del13	エクソン7欠失
	c. 802-8_810del17insGC	エクソン7欠失
	c. 802-8_810del17bpinsGT	スプライス変異
	c. 810delT	p. (Glu 271 Argfs* 34)
	c. 838G>T	p. E280*
	c. 958C>T	p. R320*
	c. 971A>T	p. D324V
	c. 974C>T	p. T325I
	c. 965_7delAAG	p. 321delE
IVS7	c. 985+3A>G-	不可用
E8	c. 992A>C	p. H331P
	c. 998C>A	p. T333K
	c. 1020G>A	p. W340*
	c. 1021T>C	p. S341P
	c. 1027T>G	p. Y343D
	c. 1062dupA	p. V355Sfs*4
	c. 992A>G	p. H331P
	c. 994G>A	p. D332N
	c. 1062insA	p. V355Sfs*3
	c. 1062-1063insA	p. V355Sfs*2
IVS8	c. 1091-2A>G	エクソン9欠失

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

表 1 CYP4V2 遺伝子の変異部位

エクソン又はイントロン	変異部位	変異結果
E9	c.H5 7A>C	p.K3 8 6T
	c.H6 8C>T	p.R3 9 0C
	c.H6 9G>A	p.R3 9 0H
	c.H7 8C>T	p.P3 9 3L
	c.H8 7C>T	p.P3 9 6L
	c.H9 8C>T	p.R4 0 0C
	c.H9 9G>A	p.R4 0 0H
	c. 1 2 1 9G>T	p.E4 0 7*
	c. 1 2 2 5+1 G>A	p.(G 3 6 4 _V 4 0 8 del)
c. 1 0 9 1-2A>G	スプライス変異	
E10	c. 1 2 2 6-6_1 2 3 5 del16	エクソン10欠失
	c. 1 3 2 8G>A	p.R4 4 3Q
	c. 1 3 4 8C>T	p.Q4 5 0*
	c. 1 3 5 5G>A	p.R4 5 2H
	c. 1 3 7 2G>A	p.V4 5 8M
	c. 1 3 9 3A>G	p.R4 6 5G
	c. 1 3 9 6A>G	p.N4 6 6D
	c. 1 3 9 9T>C	p.C4 6 7R
	c. 1 4 4 1 delT	p.(Ser 4 8 1 Argfs*4)
c. 1 4 4 5C>T	p.S4 8 2*	
E11	c. 1 5 2 3G>A	p.R5 0 8H
	c. 1 5 2 6C>T	p.P5 0 9L
	c. 6 0 4G>A	p.(Glu 2 0 2 Lys)
	c. 2 4 2C>G	p.(Thr 8 1 Arg)
	c. 6 0 4+4A>G	p.(?)
	c. 1 2 4 9 dup	p.(Thr 4 1 7 Asnfs*2)
	CYP4V2 全部欠失	*
	c. 1 5 4 4T>G	p.I5 1 5S

【0066】

特定の実施態様において、前記CYP4V2 遺伝子の変異部位はc.802-8_810 del117bp insGCを含む。本願において、用語「c.802-8_810 del117bp insGC」は、比較的一般的なCYP4V2 遺伝子変異であり、イントロン6の3'末端とエクソン7の5'末端の17対の塩基対の除去に属し、それによってエクソン7の欠失をもたらす。特定の実施態様において、前記c.802-8_810 del117bp insGCはまた、c.992A C(p.H331P)、c.1091-2A G(Exon 9 del)などの他の種類の変異と合併することができる。

【0067】

特定の実施態様において、前記gRNAはc.802-8_810 del117bp insGC変異部位の上流および/または下流100bp、120bp、140bp、160bp

、180bp、200bp、250bp、300bp、350bp、400bpまたは500bpのヌクレオチド配列に特異的に結合することができる。特定の実施態様において、前記gRNAは、c.802-8_810del17bp ins GC変異部位の上流および/または下流200bpのヌクレオチド配列に特異的に結合することができる。特定の実施態様において、前記gRNAは、c.802-8_810del17bp ins GC変異部位の上流および/または下流200bpのヌクレオチド配列と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%）配列同一性を有するヌクレオチド配列に特異的に結合することができる。

10

【0068】

特定の実施態様において、前記gRNAは、c.802-8_810del17bp ins GC変異部位の上流および/または下流100bp、100bp、120bp、140bp、160bp、180bp、200bp、250bp、300bp、350bp、400bp、500bpのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列に特異的に結合することができる。特定の実施態様において、前記gRNAは、c.802-8_810del17bp ins GC変異部位の上流および/または下流200bp配列に相補的なヌクレオチド配列に特異的に結合することができる。特定の実施態様において、前記gRNAは、c.802-8_810del17bp ins GC変異部位の上流および/または下流200bp配列に相補的なアミノ酸配列と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%）配列同一性を有するヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列に特異的に結合することができる。

20

【0069】

本願に記載のgRNAは、目標の標的核酸（例えば、CYP4V2遺伝子の変異部位）中の配列に結合することができる。gRNAは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基ペアリング）により、配列特異的に標的核酸と相互作用することができる。gRNAのヌクレオチド配列は、目標の標的核酸の配列に応じて変化することができる。

30

【0070】

本願において、前記gRNAは、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84のいずれかのヌクレオチド配列を含むことができる。本願において、前記gRNAは、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84のいずれかのヌクレオチド配列と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%）配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むことができる。

40

【0071】

本願において、前記gRNAは、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84のいずれかのヌクレオチド配列を含むことができる。本願において、前記gRNAは、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84のいずれかのヌクレオチド配列と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少

50

なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%)配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むことができる。

【0072】

本願において、前記gRNAは、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84のいずれかのヌクレオチド配列を含むことができる。本願において、前記gRNAは、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84のいずれかのヌクレオチド配列と少なくとも70%(例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%)配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むことができる。

10

【0073】

本願において、前記gRNAは、5'端から3'端まで、(X)_n、SEQ ID NO:74、78-80、82-84のいずれかのヌクレオチド配列とバックボーン配列を含有することができる。ただし、XはA、U、CおよびGから選択されるいずれかの塩基であり、かつnは0-15のいずれの整数である。本願において、前記gRNAは、5'-(X)_n-SEQ ID NO:74、78-80、82-84のいずれかのヌクレオチド配列-バックボーン配列-3'を含有することができる。ただし、XはA、U、CおよびGから選択されるいずれかの塩基であり、かつnは0-15のいずれの整数である。例えば、本願に記載のバックボーン配列は、AAV-saCas9-puroに由来するバックボーン配列を含むことができる。

20

【0074】

特定の実施態様において、前記gRNAは一本鎖ガイドRNA(sgRNA)であってもよい。

【0075】

また、本願はsgRNA組み合わせを提供し、前記sgRNA組み合わせは本願に記載のsgRNAを含むことができる。例えば、前記sgRNAは、2つまたは2つ以上の本願に示されたsgRNAを含むことができる。例えば、前記sgRNAの組み合わせは、sgRNA13とsgRNA17とを含むことができ、また例えば、前記sgRNAの組み合わせは、sgRNA13とsgRNA18とを含むことができ、また例えば、前記sgRNAの組み合わせは、sgRNA17とsgRNA18とを含むことができ、また例えば、前記sgRNAの組み合わせは、sgRNA13、sgRNA17、およびsgRNA18を含むことができる。

30

【0076】

本願は、一種または複数種の単離された核酸分子を提供するものであって、前記単離された核酸分子は上述したCYP4V2変異遺伝子を特異的に標的とするgRNAをコードすることができる。例えば、前記単離された核酸分子はSEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18のいずれかのヌクレオチド配列を含有することができる。

40

【0077】

本願において、前記gRNA配列は、Casヌクレアーゼによって認識可能なPAM配列の近傍で標的核酸にハイブリダイズするように設計することができる。前記gRNAは、標的配列と完全に相補的であっても、不完全に相補的であってもよい。gRNAとそれに対応する標的配列との相補性の程度は、少なくとも50%(例えば、少なくとも約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、またはそれ以上)である。前記「Casヌクレアーゼ」とは、一般的に、CRISPR配列(例えば、gRNA)をガイドとして、特定のDNA鎖を認識・切断する能力を有するものを指す。例えば、Cas9ヌクレアーゼ、Csn1またはCsx12

50

が挙げられる。Cas9ヌクレアーゼは通常RuvCヌクレアーゼドメインおよびHNHヌクレアーゼドメインを含み、それぞれは二本鎖DNA分子の二つの異なる鎖を切断する。Cas9ヌクレアーゼはこれまで、ストレプトコッカス・サーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)、リステリア・イノキュア(*Listeria innocua*) (Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012) およびストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*) (Deltcheva, Chylinski et al. 2011)などの異なるバクテリア種で確認されてきた。例えば、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)のCas9タンパク質のアミノ酸配列はSwissProtデータベースアクセス番号Q99ZW2に; ナイセリア・メンギティディス(*Neisseria meningitidis*)のCas9タンパク質のアミノ酸配列はUniProtデータベースアクセス番号A1IQ68に; ストレプトコッカス・サーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)のCas9タンパク質のアミノ酸配列はUniProtデータベースアクセス番号Q03LF7に; 黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のCas9タンパク質(例えば、本願に記載のベクターにおけるSaCas9)のアミノ酸配列はUniProtデータベースアクセス番号J7RUA5に示されている。Casヌクレアーゼは通常、DNAから特定のPAM配列を認識することができる。前記「PAM」とは、プロト Spacer 隣接モチーフ(*protospacer adjacent motif*)を指し、それはCRISPRヌクレアーゼによって切断部位として識別され、PAMはヌクレアーゼ(例えば、Cas9、Cpf1など)によって変化する。プロトSpacer要素配列は通常、PAM部位の上流に直接位置している。例えば、前記PAMはSEQ ID NO: 24 - 38のいずれかに記載のヌクレオチド配列を含有することができる。

【0078】

本願に記載のgRNAおよび/または単離された核酸分子はベクターを使って運搬することができる。本願において、前記ベクター(例えばpX601)はCasヌクレアーゼをコードする核酸を含有してもよいし、それを含有しなくてもよい。本願において、Casヌクレアーゼは一種または複数種のポリペプチドとして別々に運搬されることができる。または、前記Casヌクレアーゼをコードする核酸分子は、一種または複数種のガイドRNA、または一種または複数種のcrRNAおよびtracrRNAと、別々に運搬してもよいし、またはそれらを複合体にしておいてから運搬してもよい。例えば、前記本願の核酸分子(例えば、前記CYP4V2遺伝子の特異的に標的とするsgRNAをコードする単離された核酸分子)とCas9ヌクレアーゼをコードする核酸分子は、同一ベクター(例えば、プラスミド)に存在することができる。前記ベクターは当該技術分野では公知のウイルス性または非ウイルスベクターを含むことができる。

【0079】

非ウイルス性運搬ベクターとしては、ナノ粒子、リポソーム、リボ核タンパク質、正の電荷を帯びたペプチド、低分子RNAコンジュゲート、アプタマー-RNAキメラとRNA融合タンパク質複合体などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0080】

本願において、前記単離された核酸分子および/または前記DNAエンドヌクレアーゼをコードする核酸分子はプラスミドを通じて運搬されることができる。

【0081】

特定の実施態様において、前記ベクターはウイルスベクターであってもよく、例えば、AAV、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスおよび肝炎ウイルスが挙げられる。ベクターゲノムの一部として核酸分子(例えば、本願に記載の単離された核酸分子)を含有するウイルスベクターを製造する方法は当該技術分野では公知のものであり、当業者には過度の実験なくとも実行することができる。他の実施態様において、前記ベクターは、本願に記載の核酸分子をパッケージした組換えAAVウイルス

10

20

30

40

50

粒子であってもよい。前記組換え AAV を製造する方法として、本願に記載の核酸分子をパッケージング細胞株に導入し、AAV を発現する rep と cap 遺伝子のパッケージングプラスミドを細胞株に導入し、およびパッケージング細胞株上清から組換え AAV を収集することを含むことができる。パッケージング細胞株は様々な種類の細胞であってもよい。例えば、使用可能なパッケージング細胞株として、HEK 293 細胞、HeLa 細胞および Vero 細胞などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0082】

特定の実施態様において、前記ベクターはアデノ随伴ウイルス (AAV) であってもよい。本願において、用語「アデノ随伴ウイルス」とは、一般的に、天然に存在し、かつ有用なアデノウイルス及び人工 AAV に由来するベクターを指す。前記 AAV は、異なる血清型 AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、AAV 10、AAV 11、AAV 12 または AAV 13、および任意の AAV 変異体または混合物を含むことができる。AAV ゲノムの両端には、一般的に末端逆位反復配列 (ITR) があり、用語「ITR」または「末端逆位反復」とは、AAV および/または組換え AAV 中に存在する核酸配列セグメントを指し、それは AAV の溶解および潜伏ライフサイクルを完了するのに必要な T 字形回文構造を形成することができる。AAV ベクターを製造する技術は、当技術分野の標準技術であり、運搬されるポリヌクレオチド、rep および cap 遺伝子、およびウイルス機能を補助するパッケージングされる AAV ゲノムを細胞に提供することを含む。AAV ベクターの生産は、通常、単一細胞 (ここではパッケージング細胞と呼ぶ) 内に以下の成分が存在する必要がある: rAAV ゲノム、rAAV ゲノムから単離された (例えば、そこには存在しない) AAV rep および cap 遺伝子、および補助ウイルス。AAV rep および cap 遺伝子は、本文に記載の AAV 血清型を含むが、これらに限定されず、任意の AAV 血清型に由来してもよく、また AAV ゲノム ITR とは異なる AAV 血清型に由来してもよい。

【0083】

ドナー核酸分子とベクター

【0084】

他方、本願はドナー核酸分子を提供するものである。本願において、用語「ドナー核酸分子」とは、一般的に、レシピエント (例えば、レシピエント核酸分子) に異種核酸配列を提供する核酸分子を指す。特定の実施態様において、前記ドナー核酸分子はレシピエント細胞に導入されることで、前記単離された核酸分子によって切断された DNA 断片 (例えば、断片化した二本鎖 DNA) を修復することができる。他の特定の実施態様において、断片化した DNA はドナー核酸分子を通じて修復されることができる。修復の方法として、DNA 相同性に依存する相同組換え (Homologous recombination, HR) による修復と非相同末端結合 (Non-homologous end joining, NHEJ) による修復方法があるが、これらに限定されるものではない。

【0085】

特定の実施態様において、HDR を用いて外在性ポリヌクレオチド配列を標的核酸切断部位に挿入することができる。外在性ポリヌクレオチド配列は、ドナーポリヌクレオチド (またはドナー、またはドナー配列、またはポリヌクレオチドドナーテンプレート) と呼ばれる。ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピーまたはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部を標的核酸切断部位に挿入することができる。ドナーポリヌクレオチドは、標的核酸切断部位に天然に存在する配列ではなく、外在性ポリヌクレオチド配列であってもよい。HDR は、相同配列またはドナー配列 (例えば、前記ドナー核酸分子) をテンプレートとして用いて、特定の DNA 配列を切断部位に挿入する方法である。相同配列は、例えば姉妹染色分体 (sister chromatid) のような内在性ゲノムに存在してもよい。または、前記ドナーは、例えばプラスミド、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチドまたはウイルスのような外在性核酸であってもよい。それらの外在性核酸は、与 DNA ヌクレアーゼによって切断される遺伝子座と相同性の高い領域を含有することが

10

20

30

40

50

でき、さらに追加の配列または配列変化（切断された標的遺伝子座に組み込むことができる欠失を含む）を含有することができる。例えば、本願では、ホモログアームを用いて、このホモログアームに結合された外在性遺伝子断片（例えば、本願に記載のドナー核酸分子）を標的部位（例えば、本願に記載の gRNA が標的とする部位）に挿入することができる。本願に記載の「ホモログアーム」とは、一般的に、DNA 切断所のヌクレオチド配列と相同性を有するヌクレオチド配列を指す。

【0086】

外在性ドナーテンプレートを利用して、相同フランキング領域の間に追加の核酸配列（例えば、前記標的化ベクター）または修飾（例えば単一または複数の塩基改変または欠失）を導入することで、追加のまたは改変された核酸配列を目標遺伝子座に組み込むことができる。外在性ドナーはプラスミドベクター、例えば、AAVベクターおよび/またはTAクローニングベクター（例えば、ZT4ベクター）によって運搬されることのできる。

10

【0087】

本願に記載のドナー核酸分子に関して、ドナー核酸分子は野生型のヒトCYP4V2のヌクレオチド配列、遺伝子断片、グであってもよい。例えば、前記ドナー核酸分子は c.802-8_810del17bp insGC 変異部位の上流および/または下流500bp、700bp、750bp、800bp、850bp、900bp、1000bp、2000bp、3000bp、5000bp 以内のヌクレオチド配列を含有することができる。特定の実施態様において、前記ドナー核酸分子は、c.802-8_810del17bp insGC 変異部位の上流および/または下流800bpを含有することができる。特定の実施態様において、前記ドナー核酸は、c.802-8_810del17bp insGC 変異部位の上流および/または下流800bpと少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%）配列同一性を有するヌクレオチド配列を含有することができる。本願に記載のCYP4V2ヌクレオチド配列を含有することができる「核酸分子」と本願に記載のCYP4V2を特異的に標的とするgRNAまたは「単離された核酸分子」とは別のものである。

20

【0088】

例えば、本願において、前記ドナー核酸分子はSEQ ID NO: 64 - 66のいずれかのヌクレオチド配列を含有することができる。また例えば、前記ドナー核酸分子は、SEQ ID NO: 64 - 66のいずれかのヌクレオチド配列と少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%）配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むことができる。

30

【0089】

他方、本願は、前記単離された核酸分子（例えば、前記CYP4V2遺伝子の特異的に標的とするsgRNAをコードする単離された核酸分子）および/または前記ドナー核酸分子（例えば、前記ヒトCYP4V2遺伝子をコードするヌクレオチド分子）を含有するベクターを提供するものである。

40

【0090】

特定の実施態様において、前記単離された核酸分子と前記ドナー核酸分子は異なるベクター上に存在してもよい。他の特定の実施態様において、前記単離された核酸分子と前記ドナー核酸分子は同一ベクター上に存在することができる。本願において、前記単離された核酸分子を含有するベクターと前記ドナー核酸分子を含有するベクターが同時に細胞に導入されると、Casヌクレアーゼはドナー核酸分子と細胞ゲノムDNAを切断し、ドナー核酸分子を細胞ゲノムの正確な位置（例えば、CYP4V2遺伝子断片）に挿入する。

50

【 0 0 9 1 】

本願において、前記ベクターは一個または複数個の前記 s g R N A を含むことができる。例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個または7 個以上の本願に記載の s g R N A を含むことができる。特定の実施態様において、複数個の s g R N A を使用する場合、前記複数個の s g R N A は1 つまたは複数のベクター中に存在してもよく、同時にまたは前後に投与されてもよい。例えば、前記 s g R N A はそれぞれ異なるベクターに存在して投与されてもよく、同一ベクターに存在して投与されてもよい。例えば、前記 s g R N A は同一 A A V ベクターに存在して投与されてもよい。例えば、前記 s g R N A は異なるベクターに位置して同時に投与されてもよい。例えば、前記 s g R N A は同一ベクターに位置して、前後に投与されてもよい。

10

【 0 0 9 2 】

一実施形態において、前記ベクターはウイルスベクターである。例えば、A A V、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスと肝炎ウイルスが挙げられる。ベクターゲノムの一部として核酸分子（例えば、本願に記載の単離された核酸分子）を含有するウイルスベクターを製造する方法は、当該技術分野では公知のものであり、当業者には過度の実験なくとも実行することができる。

【 0 0 9 3 】

細胞、医薬組成物、用途および方法

【 0 0 9 4 】

本願は、細胞を提供するものであって、前記細胞は前記単離された核酸分子および/または前記ドナー核酸分子を含有することができる。本願に記載の細胞は s g R N A と C a s ヌクレアーゼを発現することができ、優れた D N A 切断効果を有する。本願に記載の細胞は、正常な機能を有する C Y P 4 V 2 タンパク質を発現することができる。前記細胞は、哺乳動物細胞、例えば、ヒトに由来する細胞を含むことができる。例えば、前記細胞は C O S 細胞、C O S - 1 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、H e L a 細胞、H E K 2 9 3 細胞、N S 0 細胞または骨髄腫細胞、幹細胞（例えば、多能性幹細胞および/または全能性幹細胞）、および/または上皮細胞（例えば、腎上皮細胞および/または網膜上皮細胞）を含むことができる。本願において、前記細胞は、H E K 2 9 3 細胞および/または尿中腎上皮細胞を含むことができる。本願において、前記細胞は修飾により分化能を有することができる。前記分化能は、生体のあらゆる種類の細胞（神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、網膜上皮細胞、表皮、毛髪とケラチノサイト、肝細胞、細胞、腸上皮細胞、肺泡細胞、造血細胞、内皮細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、腎細胞、脂肪細胞、軟骨細胞および/または骨細胞）に分化する能力を含むことができる。例えば、前記細胞は、重要な初期化遺伝子（例えば、O C T 4、K L F 4、S O X 2、c M Y C、N A N O G および/または L I N 2 8）が過剰発現した人工多能性幹細胞 (i P S C) に初期化することができる。

20

30

【 0 0 9 5 】

本願に記載の細胞は、遺伝子編集療法に必要な物質（例えば、s g R N A とドナー核酸分子）の有効性および安全性を評価するために使用することができる。また、本願は正確なヒト C Y P 4 V 2 c D N A を含有する 3 D - 網膜オルガノイドを含むことができる組織モデルを提供する。前記細胞と前記組織モデルは、遺伝子編集療法に必要な物質（例えば、s g R N A とドナー核酸分子）の有効性および安全性を評価するために使用することができる。例えば、前記 g R N A をコードするポリヌクレオチド、前記ドナー核酸分子および/またはベクターを前記細胞および/または前記組織モデルに導入した後、例えば、P C R 配列決定又はゲル電気泳動を用いて、g R N A、正確な C Y P 4 V 2 タンパク質の発現を検査することができ、あるいは、該当細胞および/または組織モデルは免疫拒絶反応、毒性を産生せず、および/または、導入された物質は前記細胞および/または前記組織モデルの他の機能に影響を与えない。例えば、遺伝子編集の有効性を評価する指標として修復効率検査を使用することができ、例示的な方法は実施例 4 に示されている。例えば、遺伝子編集の安全性を評価する指標として脱標的効率を検査することができ、例えば、

40

50

全ゲノム配列決定法を用いて脱標的効率を検査することができる。

【0096】

本願は、疾患の治療のための医薬の製造における、前記gRNA、前記一種または複数種の単離された核酸分子、前記ドナー核酸分子、および/または前記ベクターの使用を提供するものであって、前記疾患はCYP4V2遺伝子変異による疾患を含む。例えば、CYP4V2遺伝子におけるc.802-8_810del17bpinsGC変異による疾患である。例えば、前記疾患は網膜色素変性を含むことができる。例えば、前記疾患は結晶性網膜色素変性症を含むことができる。

【0097】

本願は、医薬組成物を提供するものであって、前記医薬組成物は前記gRNA、前記一種または複数種の単離された核酸分子、前記ドナー核酸分子、前記ベクター、および薬学的に許容される担体を含有する。前記担体は非毒性であり、有効成分の効果を妨げてはならない。

10

【0098】

本願に記載の医薬組成物は、様々な方法によって導入することができ、例えば、硝子体内注射（例えば、前方、内側または後方の硝子体内注射）、結膜下注射、前房内注射、側頭縁部を介する前眼房への注射、基質内注射、脈絡膜下空間への注射、角膜内注射、網膜下注射と眼内注射により、眼に局所投与することが挙げられるが、それらに限定するものではない。前記導入は、網膜下腔すなわち感覚神経網膜の下への注射である網膜下注射を含むことができる。網膜下注射の間、注射される（例えば、前記標的化ベクター、前記gRNA、および/または前記プラスミド）を光受容細胞と網膜色素上皮（RPE）層の間に直接導入し、その間に空間を形成する。

20

【0099】

本願は、必要とする被験者に前記gRNA（例えば、CYP4V2遺伝子の特異的に標的とするsgRNA）、前記一種または複数種の単離された核酸分子（前記CYP4V2遺伝子の特異的に標的とするsgRNAをコードする単離された核酸分子）、前記ドナー核酸分子（前記ヒトCYP4V2遺伝子をコードするヌクレオチド分子）、および/または前記ベクター、を導入する工程を含むピエッティ結晶性ジストロフィーを治療する方法を提供するものである。そのうち、前記導入により、被験者は正常な機能を有するCYP4V2タンパク質を獲得する。

30

【0100】

本願に記載の方法は、エクスピボ法（*ex vivo*）を含むことができる。特定の実施態様において、被験者特異的な人工多能性幹細胞（iPSC）を獲得することができる。次に、本願に記載の方法を使って、これらのiPSC細胞のゲノムDNAを編集することができる。例えば、当該方法は、iPSCのCYP4V2遺伝子の変異部位内またはその近傍を、変異を有するCYP4V2タンパク質をコードしないように編集することを含むことができる。次に、遺伝子編集されたiPSCを、例えば光受容細胞または網膜祖細胞などの他の細胞に分化することができる。最後に、分化された細胞（例えば光受容細胞または網膜祖細胞）を被験者体内に移植することができる。

【0101】

40

特定の実施態様において、被験者特異的な人工多能性幹細胞（iPSC）を獲得することができる。さらに、人工多能性幹細胞をあらゆる種類の細胞、例えば光受容細胞または網膜祖細胞に分化させることができる。本願においては、3D網膜オルガノイドであってもよい。次に、本願に記載の方法を使って、これらの3D網膜オルガノイド細胞のゲノムDNAを編集することができる。例えば、当該方法は、3D網膜オルガノイド細胞のCYP4V2遺伝子の変異部位内またはその近傍を、変異を有するCYP4V2タンパク質をコードしないように編集することを含むことができる。最後に、3D網膜オルガノイド細胞を被験者体内に移植することができる。

【0102】

他の特定の実施態様において、被験者から光受容細胞または網膜祖細胞を分離すること

50

ができる。次に、本願に記載の方法を使って、これらの光受容細胞または網膜祖細胞のゲノムDNAを編集することができる。例えば、当該方法は、光受容細胞または網膜祖細胞のCYP4V2遺伝子の変異部位内またはその近傍を、変異を有するCYP4V2をコードしないように編集することを含むことができる。最後に、遺伝子編集された光受容細胞または網膜祖細胞を被験者体内に移植することができる。

【0103】

前記方法、投薬する前に、治療薬に対する全面的な分析をすることを含むことができる。例えば、校正細胞に対して全ゲノム配列決定を行い、被験者への最小限のリスクと関連するゲノム位置にオフターゲット効果（もしあれば）がないことを保証することができる。さらに、移植する前に、クローン細胞集団を含む特定の細胞の集団を分離することができる。

10

【0104】

本願に記載の方法は、部位特異的ヌクレアーゼを使って、ゲノムにおいて正確な標的位置でDNAを切断することで、ゲノムにおける特定の位置に一本鎖または二本鎖DNAの切断を生成する方法を含むことができる。このような切断は、内在性細胞プロセス、例えば相同組換え、非同相末端結合によって周期的に修復することができる。

【0105】

本願に記載の方法は、目標遺伝子座において標的配列の近傍の位置に一つまたは二つのDNAの切断を生成することを含むことができ、二つのDNAの切断は二本鎖切断または二つの一本鎖切断であってもよい。前記切断は、部位特異的（site-directed）ポリペプチドによって実現することができる。部位特異的ポリペプチド（例えばDNAエンドヌクレアーゼ）は、核酸（例えばゲノムDNA）に二本鎖切断または一本鎖切断を導入することができる。二本鎖切断は、細胞の内在性DNA修復経路、例えば、HR、NHEJを刺激することができる。

20

【0106】

外在性ドナーテンプレートを利用して、相同フランキング領域の間に追加の核酸配列（例えば、前記標的化ベクター）または修飾（例えば単一または複数の塩基改変または欠失）を導入することで、追加のまたは改変された核酸配列を目標遺伝子座に組み込むことができる。外在性ドナーはプラスミドベクター、例えば、AAVベクターおよび/またはTAクローニングベクター（例えば、ZT4ベクター）によって運搬されることことができる。

30

【0107】

本願は、細胞に、前記gRNA、前記一種または複数種の単離された核酸分子、および/または前記ベクターを導入することを含む、細胞におけるCYP4V2遺伝子の発現を調節する方法を提供するものである。

【0108】

本願において、前記方法は、前記gRNAを前記細胞に導入することであってもよい。例えば、前記gRNAは、レシピエント細胞のゲノムのCYP4V2遺伝子断片を標的化し、ヌクレアーゼによってそれを切断することで、CYP4V2遺伝子がタンパク質に翻訳される機会が少なくなり、翻訳されたタンパク質は正常な機能を発揮できなくなるという効果をもたらす。

40

【0109】

本願において、前記方法は、前記一種または複数種の単離された核酸分子前記細胞に導入することであってもよい。例えば、前記CYP4V2遺伝子の特異的に標的とするsgRNAをコードする単離された核酸分子は、前記CYP4V2遺伝子断片を破壊させることで、CYP4V2遺伝子がタンパク質に翻訳される機会が少なくなり、翻訳されたタンパク質は正常な機能を発揮できなくなるという効果をもたらす。

【0110】

本願において、前記方法は、前記ベクターを前記細胞に導入することであってもよい。前記ベクターは、前記単離された核酸分子および/または前記ドナー核酸分子を含有する。特定の実施態様において、前記ベクターは、前記単離された核酸分子と前記ドナー核酸

50

分子を含有することで、前記細胞におけるCYP4V2遺伝子は前記ドナー核酸分子に代替されて、CYP4V2遺伝子がタンパク質に翻訳される機会の变化(例えば、CYP4V2タンパク質の発現がない状態から正常な発現の量へ変化する)、翻訳されたタンパク質の機能が異常から正常になる効果をもたらす。特定の実施態様において、前記ベクターは前記単離された核酸分子を含有することで、前記CYP4V2遺伝子断片が破壊されて、CYP4V2遺伝子がタンパク質に翻訳される機会が少なくなり、翻訳されたタンパク質は正常な機能を発揮できなくなるという効果をもたらす。他の特定の実施態様において、前記ベクターは前記ドナー核酸分子を含有することで、前記細胞内により多くのCYP4V2遺伝子断片を含有し、より多くのCYP4V2タンパク質に転写および翻訳することができる。

10

【0111】

特定の理論に縛られることを望むものではないが、以下の実施例は、本願発明の核酸分子、タンパク質、製造方法、用途等を説明することのみを意図しており、本願発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例】**【0112】**

実施例1 sgRNAの合成

1、sgRNAの標的部

CYP4V2変異遺伝子の変異部位c.802-8_810del117bpinsGCに対して、sgRNAを設計する。CRISPR-Cas9システムを用いて、1本染色体中のCYP4V2変異遺伝子を変異細胞からノックアウトし、2本染色体中の変異が同じであれば、2本染色体中の変異を同時にノックアウトすることができる。

20

【0113】

2、sgRNAの設計

CYP4V2の変異部位領域に、PAM配列がNNGRRTおよびNNGRR(Staphylococcus aureus(黄色ブドウ球菌、SA; SaCas9))であり、長さが21bpであるsgRNA配列を設計した。設計された23本sgRNA配列は、それぞれSEQ ID NO: 67~89に記載される。前記sgRNAをコードする核酸配列を表2に示す。

【0114】

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2 sgRNA をコードする核酸配列

	フォワード/ リバース	配列	PAM
sgRNA 1	-1	CATTCATTGGCCCGTTCGCT (SEQ ID NO: 1)	TTGAA (SEQ ID NO: 24)
sgRNA 2	-1	ATCACATGCTTCTGTTTGGAC (SEQ ID NO: 2)	TTGGA (SEQ ID NO: 25)
sgRNA 3	1	AGCATGTGATTATCATTCAAA (SEQ ID NO: 3)	GCGAA (SEQ ID NO: 26)
sgRNA 4	1	TGTGATTATCATTCAAAGCGA (SEQ ID NO: 4)	ACGGG (SEQ ID NO: 27)
sgRNA 5	1	TCATTCAAAGCGAACGGGCCA (SEQ ID NO: 5)	ATGAA (SEQ ID NO: 28)
sgRNA 6	1	CAAAGCGAACGGGCCAATGAA (SEQ ID NO: 6)	ATGAA (SEQ ID NO: 28)
sgRNA 7	1	TAGGGTGCATCCAAGTCCAAA (SEQ ID NO: 7)	CAGAA (SEQ ID NO: 29)
sgRNA 8	1	GGCCAATGAAATGAACGCCA (SEQ ID NO: 8)	ATGAA (SEQ ID NO: 28)
sgRNA 9	1	GAAGACTGTAGAGGTGATGGC (SEQ ID NO: 9)	AGGGG (SEQ ID NO: 30)
sgRNA 10	-1	GGCCCTGCGTTTATTTTGGGA (SEQ ID NO: 10)	GGGGG (SEQ ID NO: 31)
sgRNA 11	1	TGCCCCCTCCAAAAATAAACG (SEQ ID NO: 11)	CAGGG (SEQ ID NO: 32)
sgRNA 12	1	GAAATAGGCTTAGAAAAATAA (SEQ ID NO: 12)	ATGAA (SEQ ID NO: 28)
sgRNA 13	1	TAGGCTTAGAAAAATAATGA (SEQ ID NO: 13)	AAGAA (SEQ ID NO: 33)
sgRNA 14	1	AAAGAACTAGCATATTTTAT (SEQ ID NO: 14)	AAGAA (SEQ ID NO: 33)
sgRNA 15	1	TTTATAAGAAAATGTGTTAAC (SEQ ID NO: 15)	TAGGG (SEQ ID NO: 34)

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

表 2 sgRNA をコードする核酸配列

	フォワード/ リバース	配列	PAM
sgRNA 1 6	-1	ATGATAATCACATGCTTCTGT (SEQ ID NO: 1 6)	TTGGA (SEQ ID NO: 2 5)
sgRNA 1 7	1	AATGAACGCCAATGAAGACTG (SEQ ID NO: 1 7)	TAGAG (SEQ ID NO: 3 5)
sgRNA 1 8	1	TGAAGACTGTAGAGGTGATGG (SEQ ID NO: 1 8)	CAGGG (SEQ ID NO: 3 2)
sgRNA 1 9	-1	TGCGTTTATTTTGGAGGGGG (SEQ ID NO: 1 9)	CAGAG (SEQ ID NO: 3 6)
sgRNA 2 0	-1	AGGCCCTGCGTTTATTTTGG (SEQ ID NO: 2 0)	AGGGG (SEQ ID NO: 3 0)
sgRNA 2 1	-1	AAGGCCCTGCGTTTATTTTG (SEQ ID NO: 2 1)	GAGGG (SEQ ID NO: 3 7)
sgRNA 2 2	-1	GAAAGGCCCTGCGTTTATTT (SEQ ID NO: 2 2)	TGGAG (SEQ ID NO: 3 8)
sgRNA 2 3	-1	AGAAAGGCCCTGCGTTATTT (SEQ ID NO: 2 3)	TTGGA (SEQ ID NO: 2 5)

10

20

【0 1 1 5】

3、sgRNA インビトロ編集有効性検査

(1) sgRNA のインビトロ転写：

【0 1 1 6】

1) sgRNA のインビトロ転写のプライマー設計を表 3 に示す。

30

【表 3】

表 3 sgRNA のインビトロ転写のプライマー

プライマー名前	プライマー配列
F-CYP-sgRNA	TAATACGACTCACTATAGGTTTTAGTACTCTGGAAACAG (SEQ ID NO: 3 9)
R-CYP-sgRNA	ATCTCGCCAACAAGTTGACGAG (SEQ ID NO: 4 0)

注：F:Forward フォワード R:Reverse リバース

40

【0 1 1 7】

2) sgRNA のインビトロ転写テンプレートの構築

PCR 反応系は、以下のとおりである。

50

【表 4】

試薬	体積 (μL)
2×KOD-FXバッファー	25
2mM dNTP混合物	10
フォワードプライマー	1.5
リバースプライマー	1.5
pX601プラスミド	0.5
KOD-FX DNA ポリメラーゼ	2
酵素フリーH ₂ O	50まで

10

【0118】

PCR反応プログラムは、以下のとおりである。

【表 5】

94℃	2min
98℃	10s
58℃	30s
68℃	30s
68℃	5min

40サイクル

20

【0119】

3) 2.0% DNAゲル電気泳動を用い、OMEGAゲル回収キットを用いて、gRNAインビトロ転写テンプレートゲルを回収する工程は以下のとおりである：

【0120】

a) PCR反応産物に等体積の膜結合液を加え、ゲルカットからの回収は1mgあたり1μLの膜結合液を加える必要があり、すべてのゲルが完全に溶解するまで50 - 60

30

で7min加熱し、ボルテックスにより混合し、カラムで回収した。

b) 上記の液体を回収用カラムに入れ、10000×gで1min遠心分離し、ろ液を除去した。

c) 700μLの洗浄バッファーを加え、13000×gで1min遠心分離し、ろ液を除去した。

d) 工程c)を繰り返した。

【0121】

e) 空管を用いて13000×gで10min遠心分離した。

f) 遠心カラムを新しい1.5mLのEPチューブに移し、マークし、20 - 30μLの溶出バッファーまたはddH₂Oを加え、室温で2min静置した。

40

g) 13000×gで1min遠心分離し、吸着カラムを除去し、DNAを2 - 8で保存し、濃度を測定・記録し、-20で長期保存した。

【0122】

4) sgRNAのインビトロ転写(20μL系)：

50

【表 6】

試薬	体積 (μL)
10×転写バッファー	2
rNTP混合物	2
T7 RNAポリメラーゼ混合物	2
gRNAゲル回収テンプレート	1 μg (≤14 μL)
DEPC (ジエチルピロカーボネート) H ₂ O	20まで

10

【0123】

注：T7 RNAポリメラーゼ混合物を最後に入れ、混合した後、37 °Cの恒温インキュベータに置き、反応させた。反応終了後、2 μL DNA酵素Iを加え、37 °Cで30 min反応した後、電気泳動した。

【0124】

5) OMEGAゲル回収キット説明書に従って、gRNAを回収し、工程は上記と同じである。

【0125】

(2) CYP4V2 sgRNAの切断テンプレートの製造

20

CYP4V2 c.802-8_810del17bpinsGCホモ接合された患者由来のiPSCsのDNAを抽出し、これをテンプレートとして、CYP4V2 sgRNA切断テンプレートdsDNAを製造した。

【0126】

1) ゲノムDNAの抽出：

a) 400×gで5 min遠心分離し細胞を収集し、上清を除去した。220 μLのPBS (リン酸バッファー)、10 mLのRNase溶液と20 μLのPKワーキング溶液をサンプルに加え、細胞を再懸濁させた。室温で15 min以上静置した。

【0127】

b) 250 μLのGBバッファーを細胞再懸濁液に加え、ボルテックスにより混合し、65 °Cで15 - 30 min水浴し、カラムで精製した。

30

c) 250 μLの無水エタノールを消化液に加え、ボルテックスにより15 - 20 s混合した。

【0128】

d) gDNA吸着カラムを2 mL収集試験管にセットした。前工程で得られた混合液 (沈殿物を含む) を吸着カラムに移した。12000×gで1 min遠心分離した。カラムの閉塞現象が生じた場合は、再び14000×gで3 - 5 min遠心分離する。混合液が750 μLを超える場合は、数回でカラムに供した。

【0129】

e) ろ液を廃棄し、吸着カラムを収集試験管にセットした。500 μLの洗浄バッファーAを吸着カラムに加えた。12000×gで1 min遠心分離した。

40

f) ろ液を廃棄し、吸着カラムを収集試験管にセットした。650 μLの洗浄バッファーBを吸着カラムに加えた。12000×gで1 min遠心分離した。

g) 工程4を繰り返した。

h) ろ液を廃棄し、吸着カラムを収集試験管にセットした。12000×g空管で2 min遠心分離した。

【0130】

i) 吸着カラムを新しい1.5 mL遠心チューブにセットした。30 - 100 μLの70 °Cに予熱した溶出バッファーを吸着カラムの膜中央に加え、室温で3 min静置した。12000×gで1 min遠心分離した。

50

注：DNA含量が多い組織は、30 - 100 μ Lの溶出バッファーをさらに加えて溶出を繰り返すことができる。

吸着カラムを除去し、DNAを2 - 8 で保存し、濃度を測定・記録し、-20 で長期保存した。

【0131】

2) PCRプロセスで使用されたプライマーを表4に示す：

【表7】

表4 sgRNAのインビトロ切断実験 dsDNA断片PCRプライマー

プライマー名前	プライマー配列	PCR産物の長さ	適用 sgRNA
F 1 -S-CYP 4 V 2 -dsDNA	TTAGCGCAATCCAATCTCTAGG (SEQ ID NO: 4 1)	4 4 9 bp	sgRNA 1 ~ 1 2
R 1 -S-CYP 4 V 2 -dsDNA	CTTCATGACTTAGCCTGTTCCT (SEQ ID NO: 4 2)		
F 2 -S-CYP 4 V 2 -dsDNA	TTAGCGCAATCCAATCTCTAGG (SEQ ID NO: 4 1)	7 9 1 bp	sgRNA 1 3 ~ 2 3
R 2 -S-CYP 4 V 2 -dsDNA	CCACATGGAGAAGCTGAGAGCA (SEQ ID NO: 4 3)		

10

20

【0132】

3) PCR反応系は、以下のとおりである。

【表8】

試薬	体積 (μ L)
DNA	0.4
5× PrimeSTAR バッファー	1.0
dNTP混合物	4
フォワードプライマー	3
リバースプライマー	3
PrimeSTAR HS DNA ポリメラーゼ	0.5
DEPC処理水	29.1

30

【0133】

PCR反応プログラムは、以下のとおりである。

【表9】

95°C	2 min
95°C	10 s
56°C	30 s
72°C	30 s
72°C	5 min
16°C	10 min
30サイクル	

40

50

【0134】

4) 1.5% DNAゲル電気泳動を用い、OMEGAゲル回収キットを用いて、PCR産物を回収し、工程は上記と同じである。

【0135】

(3) SaCas9-SgRNAインビトロ酵素切断反応：

反応系は、以下のとおりである。

【表10】

試薬	体積 (μL)
SaCas9	1
10×SaCas9 バッファー	2
sgRNA (インビトロ転写)	50 ng
RHO sgRNAの切断テンプレート	50 ng
DEPC H ₂ O	20まで

10

【0136】

十分に混合し、37 で30min反応し、3μLのDNAローディングバッファーを加えて混合した後、65 で5min煮て、2%アガロースゲル分析によって酵素切断結果を分析した。

20

【0137】

理論切断断片の長さを表5に示し、実験結果を図1A-1Iに示す。結果は、以下のことを示している。sgRNA 8、sgRNA 12、sgRNA 13、sgRNA 14、sgRNA 16、sgRNA 17、sgRNA 18は、すべて目標断片に対して良い切断効果を持ち、dsDNAを相応の長さの断片に切断することができる。しかし、他のsgRNAは、dsDNAを対応する断片に切断することができない。

【0138】

30

40

50

【表 1 1】

表 5 sgRNA のインビトロ切断実験 dsDNA 断片理論切断長さ

	dsDNA 長さ	切断された断片の長さ	
sgRNA 1	4 4 9 bp	1 5 4 bp	2 9 5 bp
sgRNA 2	4 4 9 bp	1 8 5 bp	2 6 4 bp
sgRNA 3	4 4 9 bp	1 4 7 bp	3 0 2 bp
sgRNA 4	4 4 9 bp	1 4 3 bp	3 0 6 bp
sgRNA 5	4 4 9 bp	1 3 5 bp	3 1 4 bp
sgRNA 6	4 4 9 bp	1 5 0 bp	2 9 9 bp
sgRNA 7	4 4 9 bp	1 7 2 bp	2 7 7 bp
sgRNA 8	4 4 9 bp	1 2 0 bp	3 2 9 bp
sgRNA 9	4 4 9 bp	9 6 bp	3 5 3 bp
sgRNA 1 0	4 4 9 bp	7 6 bp	3 7 3 bp
sgRNA 1 1	4 4 9 bp	6 8 bp	3 8 1 bp
sgRNA 1 2	7 9 1 bp	2 1 6 bp	5 7 5 bp
sgRNA 1 3	7 9 1 bp	2 2 0 bp	5 7 1 bp
sgRNA 1 4	7 9 1 bp	2 4 0 bp	5 5 1 bp
sgRNA 1 5	7 9 1 bp	2 5 6 bp	5 3 5 bp
sgRNA 1 6	7 9 1 bp	2 8 2 bp	5 0 9 bp
sgRNA 1 7	7 9 1 bp	3 3 9 bp	4 5 2 bp
sgRNA 1 8	7 9 1 bp	3 5 1 bp	4 4 0 bp
sgRNA 1 9	7 9 1 bp	3 6 8 bp	4 2 3 bp
sgRNA 2 0	7 9 1 bp	3 7 4 bp	4 1 7 bp
sgRNA 2 1	7 9 1 bp	3 7 5 bp	4 1 6 bp
sgRNA 2 2	7 9 1 bp	3 7 7 bp	4 1 4 bp
sgRNA 2 3	7 9 1 bp	3 7 8 bp	4 1 3 bp

10

20

30

【 0 1 3 9 】

実施例 2 細胞レベル sgRNA 標的部局検証

1、sgRNA の合成

インビトロ切断実験に基づいて、有効な sgRNA : sgRNA 8; sgRNA 1 2; sgRNA 1 3; sgRNA 1 4; sgRNA 1 6; sgRNA 1 7; sgRNA 1 8 を選択した。酵素切断部位 B b s 1 の配列に基づいて、設計された sgRNA の上流と下流に B b s 1 酵素切断部局 (大文字) を付加し、前記 sgRNA をコードする核酸分子を表 6 に示す。

【 0 1 4 0 】

40

50

【表 1 2】

表 6 前記 s g R N A をコードする核酸配列

番号	配列
CYP 4 V 2 -sgRNA 8 -F	ACACGgggccaatgaaatgaacgccaG (SEQ ID NO: 4 4)
CYP 4 V 2 -sgRNA 8 -R	AAAACtggcggttcatttcattggcccC (SEQ ID NO: 4 5)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 2 -F	ACACGgaaataggcttagaaaaataaG (SEQ ID NO: 4 6)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 2 -R	AAAACttatTTTTTCTAAGCCTATTTcC (SEQ ID NO: 4 7)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 3 -F	ACACGtaggcttagaaaaataaatgaG (SEQ ID NO: 4 8)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 3 -R	AAAACtcatTTTATTTTTCTAAGCCTaC (SEQ ID NO: 4 9)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 4 -F	ACACGaaagaaactagcatatTTTtG (SEQ ID NO: 5 0)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 4 -R	AAAACataaaatatgctagTTTcttC (SEQ ID NO: 5 1)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 6 -F	ACACGAtgataatcacatgcttctgtG (SEQ ID NO: 5 2)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 6 -R	AAAACatgataatcacatgcttctgtC (SEQ ID NO: 5 3)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 7 -F	ACACGaatgaacgccaatgaagactgG (SEQ ID NO: 5 4)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 7 -R	AAAACcagtcttcattggcgttcattC (SEQ ID NO: 5 5)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 8 -F	ACACGtgaagactgtagaggatgatggG (SEQ ID NO: 5 6)
CYP 4 V 2 -sgRNA 1 8 -R	AAAACccatcacctctacagtcttcaC (SEQ ID NO: 5 7)

10

20

【 0 1 4 1】

2、s g R N A ベクターの構築とプラスミドの抽出

(1) s g R N A のアニーリング

上記で合成されたそれぞれの s g R N A (F、R) を $50 \mu\text{mol}$ に希釈し、s g R N A A F、R をそれぞれ $5 \mu\text{L}$ 採取し、s g R N A 混合物 1 - 7 を調製した。

T 4 P N K および $10 \times$ T 4 ライゲーションバッファーを、使用可能な状態まで氷上で解凍しておいた。以下の反応系を調製した。

【表 1 3】

試薬	体積 (μL)
s g R N A 混合物	7
$10 \times$ T 4 ライゲーションバッファー	1
T 4 P N K	2
総体積	10

30

【 0 1 4 2】

第 5 工程で調製した反応系を P C R 装置に設置し、以下の反応プログラムを開始した。

【表 1 4】

37°C	30 min
95°C	5 min
$5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で 25°C までゆっくりと下げる	
25°C	Forever

40

反応産物を回収した。

【 0 1 4 3】

(2) ベクターゼ酵素切断

50

sgRNAベクターを構築し、使用したプラスミドはAAV-saCas9-puroベクターであった。プラスミドマップを図2に示す。

【0144】

BbsI酵素切断を用いて、sgRNAの結合部位を放出させ、1.5mLのPCRチューブで以下の酵素切断反応系を調製した。

【表15】

プラスミド	15 μ g	
2×Cutsmart™バッファ	30 μ L	
アー		10
酵素	12 μ L	
H ₂ O	258 μ Lまで	
総体積	300 μ L	

【0145】

1-2hの酵素切断（または4 での一晩の酵素切断）を行い、生成物を回収・精製し、濃度を測定し、50ng/ μ Lに希釈した。

【0146】

(3)ライゲーション

前工程で回収したベクターとアニーリングしたsgRNAを使って、以下のようなライゲーション系（200 μ L PCRチューブ）を調製した。

【表16】

試薬	体積 (μ L)
酵素切断ベクター	1
アニーリングするsgRNA	1
2×T4ライゲーションバッファ	5
T4ライゲーション酵素	1
H ₂ O	3
総体積	11

【0147】

前工程におけるライゲーション反応系を37 に置いて約1-2hライゲートし、sgRNAベクターの構築を完成させた。

【0148】

(4)プラスミド形質転換

【0149】

(1) TransStb13ケミカルコンピテントセル(chemically competent cells。北京全式金生物技術有限公司CD-521-02)を取り出して、氷上で解凍しておきた。

(2) 1 μ Lのライゲーション産物を50 μ Lのコンピテントセルに添加し、氷上で30分インキュベートし、42 で90sヒートショックし、氷上で2min静置した。

(3) 非抗菌性培養液500 μ Lを加え、37、200rpmで1h振とうした。

(4) 800rpm/minで5min遠心分離し、上清を除去して約100 μ Lを得て、アンピシリン含有のLB寒天培地を用いてポジティブクローンをスクリーニングした。

(5) 翌日に、スクリーニングされたポジティブクローン菌(培地500 μ L)を3-4時間振とうし、200 μ Lのサンプルに対して配列決定を行った。

【0150】

5. プラスミドの抽出 (Omega社 Endo free Plasmid Maxi Kitによる)

【0151】

1) 配列決定で正確とされたプラスミドを一晩振とうし (50 - 200 mL)、37で12 - 16 h振とう培養してプラスミドを増幅させて、翌日に抽出した (振とう時間は16 h未満である)。

【0152】

2) 菌液を50 - 200 mL取り出して、室温下で4000 x gで10 min遠心分離して、菌体を収集した。

【0153】

3) 培地を廃棄した。沈殿物に10 mLの溶液 I / RNA酵素混合液を加え、ピペッティングまたはボルテックスにより、細胞を完全に再懸濁させた。

【0154】

4) 10 mLの溶液 IIを加え、蓋を締め、遠心チューブを8 - 10回軽く上下をひっくり返して透明なライセートを得た。

【0155】

5) 予め冷却したN3バッファーを5 mL加え、蓋を締め、白色の凝集沈殿物が形成するまで、遠心チューブを10回軽く上下をひっくり返した。室温下で2 min静置してインキュベートしてもよい。

【0156】

6) シリンジフィルターを用意し、シリンジの中のピストンを引き抜き、シリンジを適切な試験管ラックに垂直に置き、インジェクター下端の出口に収集試験管を置き、シリンジの開口部を上向きにした。ライセートを直ちにフィルターのシリンジに注ぎ込んだ。細胞ライセートをシリンジ内で5 min静置した。そして、ライセートの表面には白色の凝集物が浮くようになる。細胞ライセートはろ過インジェクターの出口から流れ出した可能性がある。新しい50 mLの試験管で細胞ライセートを収集した。慎重にインジェクターピストンをシリンジに軽く挿入し、ライセートが収集試験管に流れ込むように、ピストンをゆっくりと押した。

【0157】

7) 流れ出したろ過ライセートに0.1倍体積のETR溶液 (青色)を加え、試験管を10回ひっくり返して、氷浴中で10 min静置した。

【0158】

8) 上記ライセートを42℃で5 min水浴させた。ライセートには混濁が再度出た。そこで、25℃、4000 x gで5 minの遠心分離をし、ETRバッファーは試験管の底部に青色の層が形成した。

【0159】

9) 上清を別の新しい50 mL試験管に移し、0.5倍体積の室温の無水エタノールを加え、試験管を6 - 7回軽くひっくり返して、室温で1 - 2 min静置した。

【0160】

10) HiBind (登録商標) DNA Maxi結合カラムを50 mLの収集試験管にセットし、20 mLのろ液をHiBind (登録商標) DNA Maxi結合カラムに加えた。室温下で、4000 x gで3 min遠心分離を行った。ろ液を廃棄した。

【0161】

11) HiBind (登録商標) DNA Maxi結合カラムを同一の収集試験管にセットし、残りのろ液が全部HiBind (登録商標) DNA Maxi結合カラムに結合するまで、工程10を繰り返して、同じ条件で遠心分離を行った。

【0162】

12) HiBind (登録商標) DNA Maxi結合カラムを同一の収集試験管にセットし、HiBind (登録商標) DNA Maxi結合カラムに10 mLのHBCバッファーを加え、室温下で4000 x gで3 min遠心分離を行って、ろ液を廃棄した。

10

20

30

40

50

【0163】

13) HiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムを同一の収集試験管にセットし、HiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムに15 mLのDNA洗浄液(無水エタノールで希釈したもの)を加え、室温下で4000 x gで3 min遠心分離を行って、ろ液を廃棄した。

【0164】

14) HiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムを同一の収集試験管にセットし、HiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムに10 mLのDNA洗浄液(無水エタノールで希釈したもの)を加え、室温下で4000 x gで3 min遠心分離を行って、ろ液を廃棄した。

10

【0165】

15) 最高速度(6000 x g未満)で回転させて、HiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムのマトリックスを10 min乾燥させた。

【0166】

16) (オプション)さらにHiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムを風乾燥させる。(任意に)以下のいずれかの方法でHiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムをさらに乾燥させた後、DNAの溶出を行う(必要に応じて):

【0167】

a) HiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムを真空容器に15 min静置してエタノールを乾燥させる:室温下で、カラムを真空チャンバーに移して、真空チャンバーの全ての装置を接続する。真空チャンバーを密閉させ、15 minの真空を行う。HiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムを移動して、次の工程に供する。
b) 真空オープンでカラムを乾燥させまたは65 °Cで10 - 15 min乾燥させる。HiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムを移動して、次の工程に供する。

20

【0168】

17) HiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムを清潔な50 mLの遠心チューブにセットし、1 - 3 mLのエンドトキシンフリーの溶出バッファーをHiBind (登録商標) DNA Maxi 結合カラムのマトリックスに直接加え(その量は目の最終製品の濃度による)、室温で5 min静置した。

【0169】

18) 4000 x gで5 min遠心分離して、DNAを溶出させた。
19) カラムを廃棄して、DNA産物を-20 °Cで保存した。
20) 構築されたプラスミドが正確であることを保証するために、抽出されたプラスミドに対して、再度配列決定を行った。

30

【0170】

3、293T細胞でのsgRNAの有効性の検証
(1) 293T細胞の培養
1) 凍結保存細胞の融解

【0171】

a) 恒温水槽の温度を37 °Cに調節し、液体窒素から凍結保存細胞を取り出して、ピンセットで蓋を保持して、水中ですばやく振とうした。

40

【0172】

b) 凍結保存液を15 mL目盛付の遠心チューブに移し、ゆっくりと10 mLの細胞の培養液を加え、軽く振とうして液体を混合させた。蓋を締め、火入れを行い、1000 rpm/minで3 min遠心分離を行った。

【0173】

c) 火入れを行い、適量の培養液を加え、底部の細胞沈殿物を軽くピペティングした後、細胞を培養瓶に移してインキュベーターで培養した。293T細胞は、使われる培地が10%ウシ胎児血清と100 U/mL二重抗体を添加した高グルコースDMEMであり、37 °C、5%CO₂で培養された。

50

【 0 1 7 4 】

2) 細胞の継代

a) 倒立顕微鏡で細胞の形態と密度を観察し、培養瓶内の細胞のコンフルエントが 80% - 90% に達した時点で、細胞の継代を開始した。

【 0 1 7 5 】

b) 細胞培養瓶の中の古い培養液を洗い出し、PBS で 3 回洗浄した。培養瓶に 500 μ L の EDTA 含有のトリプシンを加え、インキュベーターに置いて 1 min くらいインキュベートして、細胞の隙間が大きくなり、細胞が丸くなったら、直ちに培養瓶に 1 mL の培養液を加えて消化をとめ、吸引管で細胞を軽くピペティングし、瓶の底から細胞が全部浮いてから、培養瓶の中の液体を遠心チューブに移し、1000 rpm/min で 2 min 遠心分離した。

10

【 0 1 7 6 】

c) 上清を除去し、遠心チューブに 2 mL の培地を加えて、沈殿物の細胞を再懸濁させた。細胞浮遊液をそれぞれ 4 つの新しい培養瓶に入れ、それぞれに 4 mL の培養液を加え、培養瓶を軽く振とうし、細胞を混合し、それを培養瓶に均一に広げた後、細胞のインキュベーターに置いて培養を行った。

【 0 1 7 7 】

d) トランスフェクションの 1 日前に、1 ウェルあたり、密度 80%、細胞伸展、細胞の隙間が均一である 293T 細胞 100w を加え、翌日に細胞のコンフルエントが 80 - 90% に達した時点でプラスミドトランスフェクションを行った。

20

【 0 1 7 8 】

(2) PEI (ポリエチレンジアミン) 法による 293T 細胞のトランスフェクション

1) 1.5 mL の EP チューブを取って、上記の順番で番号付けて、チューブごとに 250 μ L の DMEM 培地 (血清なし) を加え、それぞれ 1.5 μ g の AA V-C Y P 4 V 2 - s g R N A 8、s g R N A 1 2、s g R N A 1 3、s g R N A 1 4、s g R N A 1 6、s g R N A 1 7、s g R N A 1 8 プラスミドとエンブティープラスミドを加え、ボルテックスにより十分に混合した後、チューブごとに 7.5 μ L の PEI トランスフェクション試薬を加え、ボルテックスにより混合し、室温で 20 min 静置した後トランスフェクションを行った。また、ネガティブコントロールを設置した。

【 0 1 7 9 】

2) 培地 (6 ウェルプレート培地、血清なし DMEM = 2 mL / ウェル) に滴下し、インキュベーターで培養し、12 - 18 h で培地の半分量を交換した。翌日に、蛍光顕微鏡で GFP の発現状況を観察して、トランスフェクション効率を評価し、トランスフェクション効率が良好であれば、トランスフェクトされたプラスミドの培養を継続した。

30

【 0 1 8 0 】

3) 耐性細胞のスクリーニング

a) 液の調製: 10 mg/mL (母液) を 1 μ g/mL に希釈したピューロマイシン、スクリーニングされた細胞。

【 0 1 8 1 】

b) 液の交換: トランスフェクションの 2 日後に、(ネガティブコントロールを含めて) 1 ウェルあたり 3 mL のピューロマイシン含有の 293T 細胞培地を加え、トランスフェクションポジティブの細胞のスクリーニングを開始し、その後毎日細胞の生存状況を観察し、2 日ごとに液の交換をし、液を交換する時に、対応する量のピューロマイシンを加えた。ネガティブコントロールのウェルの細胞が完全に死滅し、実験グループとコントロールグループの細胞は生存している場合 (トランスフェクションが成功したことを示す)、抗生物質によるスクリーニングを中止し、代わりに通常の培地を使用した。

40

【 0 1 8 2 】

(3) 293T 細胞ゲノム DNA の抽出

【 0 1 8 3 】

(1) 6 ウェルプレートの細胞のコンフルエントが 80 - 90% に達した後、6 cm 培

50

養皿に継代して培養した。

【0184】

(2) 細胞のコンフルエントが80 - 90%に達した後、細胞を回収し、ゲノムDNAの抽出の準備をする。全工程は7 - 10日くらいである。ゲノムの抽出は、Nanjin g Vazyme Biotech社の細胞抽出キットを使用し、実験工程は以下のとおりである：

【0185】

a) 400 × gで5 min遠心分離し細胞を収集し、上清を除去した。220 μLのPBS、10 mLのRNaseバッファーと20 μLのPKワーキング溶液をサンプルに加え、細胞を再懸濁させた。室温で15 min以上静置した。

10

【0186】

b) 250 μLのGBバッファーを細胞再懸濁液に加え、ボルテックスにより混合し、65 °Cで15 - 30 min水浴し、カラムで精製した。

c) 250 μLの無水エタノールを消化液に加え、ボルテックスにより15 - 20 s混合した。

【0187】

d) gDNA吸着カラムを2 mL収集試験管にセットした。前工程で得られた混合液(沈殿物を含む)を吸着カラムに移した。12000 × gで1 min遠心分離した。カラムの閉塞現象が生じた場合は、再び14000 × gで3 - 5 min遠心分離する。混合液が750 μLを超える場合は、数回でカラムに供した。

20

【0188】

e) ろ液を廃棄し、吸着カラムを収集試験管にセットした。500 μLの洗浄バッファーAを吸着カラムに加えた。12000 × gで1 min遠心分離した。

f) ろ液を廃棄し、吸着カラムを収集試験管にセットした。650 μLの洗浄バッファーBを吸着カラムに加えた。12000 × gで1 min遠心分離した。

g) 工程4を繰り返した。

h) ろ液を廃棄し、吸着カラムを収集試験管にセットした。12000 × g空管で2 min遠心分離した。

【0189】

i) 吸着カラムを新しい1.5 mL遠心チューブにセットした。30 - 100 μLの70 °Cに予熱した溶出バッファーを吸着カラムの膜中央に加え、室温で3 min静置した。12000 × gで1 min遠心分離した。

30

注：DNA含量が多い組織は、30 - 100 μLの溶出バッファーをさらに加えて溶出を繰り返すことができる。

【0190】

j) 吸着カラムを除去し、DNAを2 - 8 °Cで保存し、濃度を測定・記録し、-20 °Cで長期保存した。

【0191】

(4) T7E1 酵素切断実験

1) 上記のAAV-CYP4V2-sgRNA8、sgRNA12、sgRNA13、sgRNA14、sgRNA16、sgRNA17、sgRNA18プラスミドをトランスフェクトした293T細胞から抽出したゲノムDNAをテンプレートとして、標的部位の近傍で、上流と下流のプライマーを利用して抽出されたゲノムDNAを増幅させ、DNA断片のPCRを行った。プライマー配列を表7に示す。

40

【0192】

【表 17】

表 7 T7E1 酵素切断実験のプライマー

プライマー名前	配列	PCR 産物の長さ
T7E1-F	CTCATTAGCGCAATCCAATCTC (SEQ ID NO: 58)	793bp
T7E1-R	AGCAATCTCTGGCTGCTCTT (SEQ ID NO: 59)	

10

【0193】

2) 液体回収キット (OMEGA Gel Extraction Kit (200) D2500-02) を使って、上記の PCR 産物に対して液体 DNA の回収を行った。DNA 回収工程は以下のとおりである：

【0194】

a) PCR 反応産物に等体積の膜結合液を加え、ゲルカットからの回収は 1mg あたり 1 μ L の膜結合液を加える必要があり、すべてのゲルが完全に溶解するまで 50 - 60 で 7min 加熱し、ボルテックスにより混合し、カラムで回収した。

b) 上記の液体を回収用カラムに入れ、10000 \times g で 1min 遠心分離し、ろ液を除去した。

20

c) 700 μ L の洗浄バッファーを加え、13000 \times g で 1min 遠心分離し、ろ液を除去した。

d) 工程 c) を繰り返した。

e) 空管を用いて 13000 \times g で 10min 遠心分離した。

f) 遠心カラムを新しい 1.5mL の EP チューブに移し、マークし、20 - 30 μ L の溶出バッファーまたは ddH₂O を加え、室温で 2min 静置した。

g) 13000 \times g で 1min 遠心分離し、吸着カラムを除去し、DNA を 2 - 8 で保存し、濃度を測定・記録し、-20 で長期保存した。

【0195】

3) T7E1 酵素切断実験による sgRNA の効率の検証

30

上記で獲得した PCR 回収またはゲルカット回収産物に対して、T7E1 酵素切断反応を行った。

【0196】

【表 18】

a) T7E1 酵素切断アニーリング系 (19.5 μ L)	
試薬	体積 (μ L)
NEB バッファー 2	2
PCR またはゲルカット回収産物	X (500ng または 1000ng)
脱イオン H ₂ O	19.5 まで

40

【0197】

50

【表 19】

b) T7E1 酵素切断アニーリングのプログラム

95°C	2 min	
95°C	~85°C	温度は2°C/sで下げる
85°C	~25°C	温度は0.1°C/sで下げる
16°C	∞	

10

【0198】

【表 20】

c) T7E1 酵素切断反応系

試薬	体積 (μL)
アニーリングした産物	9.75 または 9.5
T7E1 酵素	0.25 または 0.5

前記反応系を 37 で 20 min インキュベートした。

20

【0199】

d) 酵素切断産物の電気泳動

ゲルの作成：2.5%ゲル、2倍の染料

電気泳動のプログラム：140V、20minから30min

【0200】

e) 電気泳動の結果の確認

酵素切断結果を図3に示し、各断片切断後の断片長さを表8に示す。

【0201】

【表 21】

表8. sgRNAによって切断された断片の長さ

30

テンプレート番号	PCR断片の長さ	酵素切断された断片の長さ	
CYP4V2-sgRNA 8	793 bp	348 bp	445 bp
CYP4V2-sgRNA 13		224 bp	569 bp
CYP4V2-sgRNA 17		358 bp	435 bp
CYP4V2-sgRNA 18		370 bp	423 bp

【0202】

その結果、sgRNA 8、sgRNA 13、sgRNA 17、sgRNA 18は、いずれも標的部位に対して切断効果があり、切断後の断片は表8に示すものと一致した。

40

【0203】

(5) ゲノムDNAにおける切断部位を含有するPCR断片の遺伝子配列決定、マルチピークテスト

上記のDNA増幅断片に対して配列決定し、配列決定スペクトルは図4A-Cに示されている。その結果、sgRNA 13、sgRNA 17、sgRNA 18の切断効率は高く、sgRNA切断部位近傍にはマルチピークが出現した。

【0204】

4、ダブルsgRNA切断効率有効性の検証

(1) ダブルsgRNA-AAV-saCas9-puroプラスミドの構築、抽出

【0205】

50

上記の実験結果によると、sgRNA13.17.18の切断効率が高い。上記実験で構築されたAAV-saCas9-sgRNA13プラスミドにおいて、sa-gRNA ScaffoldとAAV ITR領域の間をNotI酵素で切断処理した後、U6 promoter (プロモーター) - sgRNA17-saScaffold (sa足場) 断片とU6 promoter - sgRNA18-sa-gRNA Scaffoldをそれぞれ挿入し、AAV-saCas9-sgRNA13-sgRNA17、AAV-saCas9-sgRNA13-sgRNA18プラスミドを構築した。

【0206】

1) U6 promoter-sgRNA17-saScaffold断片とU6 promoter-sgRNA18-sa-gRNA Scaffold断片PCRプライマー配列を表9に示す。

10

【0207】

【表22】

表9 U6-SACFFOLDプライマー配列

プライマー名前	配列
U6-SACFFOLD-F:	CTTGTTGGCGAGATTTTTGCGGCC gagggcctatttcccatgattc (SEQ ID NO: 60)
U6-SACFFOLD-R:	CCATCACTAGGGGTTCTGC (SEQ ID NO: 61)

ここで、大文字部分はホモログアーム配列である。

20

【0208】

PCR反応系は、以下のとおりである。

【表23】

試薬	体積 (μL)
2×KOD-FXバッファー	25
2mM dNTP混合物	10
フォワードプライマー	1.5
リバースプライマー	1.5
AAV-saCas9-puro プラスミド	0.5
KOD-FX DNA ポリメラーゼ	2
酵素フリーH ₂ O	50まで

30

【0209】

PCR反応プログラムは、以下のとおりである。

【表24】

94°C	2min
98°C	10s
58°C	30s
68°C	30s
68°C	5min

40

40サイクル

【0210】

2) 2.0% DNAゲル電気泳動を用い、OMEGAゲル回収キットを用いて、gRNA

50

インビトロ転写テンプレートゲルを回収する工程は以下のとおりである：

【0211】

a) PCR反応産物に等体積の膜結合液を加え、ゲルカットからの回収は1mgあたり1μLの膜結合液を加える必要があり、すべてのゲルが完全に溶解するまで50 - 60分で7min加熱し、ボルテックスにより混合し、カラムで回収した。

b) 上記の液体を回収用カラムに入れ、10000×gで1min遠心分離し、ろ液を除去した。

c) 700μLの洗浄バッファーを加え、13000×gで1min遠心分離し、ろ液を除去した。

d) 工程c)を繰り返した。

10

【0212】

e) 空管を用いて13000×gで10min遠心分離した。

f) 遠心カラムを新しい1.5mLのEPチューブに移し、マークし、20 - 30μLの溶出バッファーまたはddH₂Oを加え、室温で2min静置した。

g) 13000×gで1min遠心分離し、吸着カラムを除去し、DNAを2 - 8で保存し、濃度を測定・記録し、-20で長期保存した。

【0213】

3) 酵素切断ベクター

NotI酵素切断を使って、部位を放出させ、1.5mLのPCRチューブで以下のような酵素切断反応系を調製した。

20

【表25】

プラスミド	15μg
2×Cutsmartバッファー	30μL
酵素	12μL
水	258μLまで
総体積	300μL

【0214】

30

1 - 2hの酵素切断（または一晩の酵素切断）を行い、生成物を回収・精製し、濃度を測定し、50ng/μLに希釈した。

【0215】

4) ライゲーション

前工程で回収したベクターとアニーリングしたsgRNAを使って、以下のようなライゲーション系（200μL PCRチューブ）を調製した。

【表26】

試薬	体積 (μL)
酵素切断ベクター	1
アニーリングするsgRNA	1
2×T4ライゲーションバッファー	5
T4ライゲーション酵素	1
水	3
総体積	11

40

【0216】

前工程におけるライゲーション反応系を37に置いて約1 - 2hライゲートし、sgRNAベクターの構築を完成させた。

50

【 0 2 1 7 】

5) プラスミド形質転換

- a) TransStbl3ケミカルコンピテントセルを取り出して、氷上で解凍した。
- b) 1 μ Lのライゲーション産物を取って、50 μ Lコンピテントセルに加え、氷上で30分インキュベートし、42 $^{\circ}$ Cで90sヒートショックし、氷上で2min静置した。
- c) 非抗菌性培養液500 μ Lを加え、37 $^{\circ}$ C、200rpmで1h振とうした。
- d) 800rpm/minで5min遠心分離し、上清を除去して約100 μ Lを得て、アンピシリン含有のLB寒天培地を用いてポジティブクローンをスクリーニングした。
- e) 翌日に、スクリーニングされたポジティブクローン菌(培地500 μ L)を3-4時間振とうし、200 μ Lのサンプルに対して配列決定を行った。

10

【 0 2 1 8 】

6) プラスミドの抽出(Omega社Endofree Plasmid Maxi Kitによる)工程は上記と同じである。

【 0 2 1 9 】

(2) 293T細胞でのダブルsgRNAとシングルsgRNAの有効性の検証

1) 293T細胞の培養

a) 凍結保存細胞の融解

- i) 恒温水槽の温度を37 $^{\circ}$ Cに調節し、液体窒素から凍結保存細胞を取り出して、ピンセットで蓋を保持して、水中ですばやく振とうした。
- ii) 凍結保存液を15mL目盛付の遠心チューブに移し、ゆっくりと10mLの細胞の培養液を加え、軽く振とうして液体を混合させた。蓋を締め、火入れを行い、1000rpm/minで3min遠心分離を行った。
- iii) 火入れを行い、適量の培養液を加え、底部の細胞沈殿物を軽くピペティングした後、細胞を培養瓶に移してインキュベーターで培養した。293T細胞は、使われる培地が10%ウシ胎児血清と100U/mL二重抗体を添加した高グルコースDMEMであり、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で培養された。

20

【 0 2 2 0 】

b) 細胞の継代

- i) 倒立顕微鏡で細胞の形態と密度を観察し、培養瓶内の細胞のコンフルエントが80%-90%に達した時点で、細胞の継代を開始した。

30

【 0 2 2 1 】

- ii) 細胞培養瓶の中の古い培養液を洗い出し、PBSで3回洗浄した。培養瓶に500 μ LのEDTA含有のトリプシンを加え、インキュベーターに置いて1minくらいインキュベートして、細胞の隙間が大きくなり、細胞が丸くなったら、直ちに培養瓶に1mLの培養液を加えて消化をとめ、吸引管で細胞を軽くピペティングし、瓶の底から細胞が全部浮いてから、培養瓶の中の液体を遠心チューブに移し、1000rpm/minで2min遠心分離した。

【 0 2 2 2 】

- iii) 上清を除去し、遠心チューブに2mLの培地を加えて、沈殿物の細胞を再懸濁させた。細胞浮遊液をそれぞれ4つの新しい培養瓶に入れ、それぞれに4mLの培養液を加え、培養瓶を軽く振とうし、細胞を混合し、それを培養瓶に均一に広げた後、細胞のインキュベーターに置いて培養を行った。

40

【 0 2 2 3 】

- iv) トランスフェクションの1日前に、1ウェルあたり、密度80%、細胞伸展、細胞の隙間が均一である293T細胞100wを加え、翌日に細胞のコンフルエントが80%-90%に達した時点でプラスミドトランスフェクションを行った。

【 0 2 2 4 】

(2) PEI(ポリエチレンイミン)法による293T細胞のトランスフェクション

- a) 1.5mLのEPチューブを取って、上記の順番で番号付けて、チューブごとに250 μ LのDMEM培地(血清なし)を加え、順に1.5mgのAAV-CYP4V2-s

50

gRNA13プラスミド、AAV-CYP4V2-sgRNA17プラスミド、AAV-CYP4V2-sgRNA18プラスミド、AAV-CYP4V2-sgRNA13-sgRNA17プラスミド、AAV-CYP4V2-sgRNA13-sgRNA18プラスミドとエンブティープラスミドを加え、ボルテックスにより十分に混合した後、チューブごとに7.5µLのPEITransフェクション試薬を加え、ボルテックスにより混合し、室温で20min静置した後トランスフェクションを行った。また、ネガティブコントロールを設置した。

【0225】

b) 培地 (6ウェルプレート培地、血清なしDMEM = 2mL/ウェル) に滴下し、インキュベーターで培養し、12 - 18hで培地の半分量を交換した。翌日に、蛍光顕微鏡でGFPの発現状況を観察して、トランスフェクション効率を評価し、トランスフェクション効率が良好であれば、トランスフェクトされたプラスミドの培養を継続した。

10

【0226】

c) 耐性細胞のスクリーニング

i) 液の調製: 10mg/mL (母液) を1µg/mLに希釈したピューロマイシン、スクリーニングされた細胞

ii) 液の交換: トランスフェクションの2日後に、(ネガティブコントロールを含めて) 1ウェルあたり3mLのピューロマイシン含有の293T細胞培地を加え、トランスフェクションポジティブの細胞のスクリーニングを開始し、その後毎日細胞の生存状況を観察し、2日ごとに液の交換をし、液を交換する時に、対応する量のピューロマイシンを加えた。ネガティブコントロールのウェルの細胞が完全に死滅し、実験グループとコントロールグループの細胞は生存している場合 (トランスフェクションが成功したことを示す)、抗生物質によるスクリーニングを中止し、代わりに通常の培地を使用した。

20

【0227】

3) 293T細胞ゲノムDNAの抽出

a) 6ウェルプレートの細胞のコンフルエントが80 - 90%に達した後、6cm培養皿に継代して培養した。

【0228】

b) 細胞のコンフルエントが80 - 90%に達した後、細胞を回収し、ゲノムDNAの抽出の準備をする。全工程は7 - 10日くらいである。ゲノムの抽出は、Nanjing Vazyme Biotech社の細胞抽出キットを使用し、実験工程は以下のとおりである:

30

【0229】

i) 400xgで5min遠心分離し細胞を収集し、上清を除去した。220µLのPBS、10mLのRNase溶液と20µLのPKワーキング溶液をサンプルに加え、細胞を再懸濁させた。室温で15min以上静置した。

ii) 250µLのGBバッファーを細胞再懸濁液に加え、ボルテックスにより混合し、65で15 - 30min水浴し、カラムで精製した。

iii) 250µLの無水エタノールを消化液に加え、ボルテックスにより15 - 20s混合した。

40

iv) gDNA吸着カラムを2mL収集試験管にセットした。前工程で得られた混合液 (沈殿物を含む) を吸着カラムに移した。12000xgで1min遠心分離した。カラムの閉塞現象が生じた場合は、再び14000xgで3 - 5min遠心分離する。混合液が750µLを超える場合は、数回でカラムに供した。

v) ろ液を廃棄し、吸着カラムを収集試験管にセットした。500µLの洗浄バッファーAを吸着カラムに加えた。12000xgで1min遠心分離した。

【0230】

vi) ろ液を廃棄し、吸着カラムを収集試験管にセットした。650µLの洗浄バッファーBを吸着カラムに加えた。12000xgで1min遠心分離した。

vii) 工程4を繰り返した。

50

v i i i) ろ液を廃棄し、吸着カラムを収集試験管にセットした。12000 × g 空管で2 min 遠心分離した。

i x) 吸着カラムを新しい1.5 mL 遠心チューブにセットした。30 - 100 μ L の70 に予熱した溶出バッファーを吸着カラムの膜中央に加え、室温で3 min 静置した。12000 × g で1 min 遠心分離した。

注：DNA 含量が多い組織は、30 - 100 μ L の溶出バッファーをさらに加えて溶出を繰り返すことができる。

x) 吸着カラムを除去し、DNA を2 - 8 で保存し、濃度を測定・記録し、-20 で長期保存した。

【0231】

4) ゲノムDNA における切断部位を含有するPCR 断片の遺伝子配列決定、マルチピークテスト

a) 前記DNA の切断標的部位に基づいて、プライマーを設計し、断片を増幅した。プライマー配列を表10に示す。

【0232】

【表27】

表10 ゲノムDNA における切断部位配列を含有する増幅プライマー

プライマー名 前	配列	PCR 産物の長さ
F	AGAGATTTTAATTAAGGTACctcattagcgcaatccaatctc (SEQ ID NO: 62)	833bp
R	GAAACATGTATTAATACGCGagcaatctcttggtgctctt (SEQ ID NO: 63)	

大文字部分は、ホモログアーム配列 (PMD-19T-MCSベクターMluIとKpnI酵素切断後のホモログアーム) である。

【0233】

b) ベクター線状化及びライゲーション

プラスミドベクターはPMD-19T-MCSベクターであり、ベクター線状化方法は上記と同じであり、使用された酵素はMluI酵素とKpnI酵素であり、ここでは贅言しない。PCR産物を回収して精製し、配列決定し、PMD-19T-MCS線状化ベクターにライゲーションした。方法は上記と同じであり、ここでは贅言しない。

【0234】

c) プラスミド形質転換

i) TransStb13ケミカルコンピテントセルを取り出して、氷上で解凍した。

ii) 1 μ L のライゲーション産物を取って、50 μ L コンピテントセルに加え、氷上で30分インキュベートし、42 で90sヒートショックし、氷上で2 min 静置した。

iii) 非抗菌性培養液500 μ L を加え、37、200rpmで1h振とうした。

iv) 800rpm/minで5min遠心分離し、上清を除去して約100 μ L を得て、アンピシリン含有のLB寒天培地を用いてポジティブクローンをスクリーニングした。

v) 翌日に、スクリーニングされたポジティブクローン菌をそれぞれ80個ずつ摘み取って、配列決定に供した。

【0235】

d) 陽性率分析

配列決定スペクトルを計算した結果、陽性率は以下のとおりである：

sgRNA13陽性率は54%、sgRNA17陽性率は48.5%、sgRNA18陽性率は62.5%、sgRNA13+17陽性率は64%、sgRNA13+18陽性率は5

10

20

30

40

50

1.2%であった。

ある程度、ダブルsgRNA陽性率は上昇することが分かった。

実験結果を図5に示す。

【0236】

実施例3 Donor(ドナー核酸分子)のスクリーニング

1、Donor設計

Donor設計は、HDR方法を採用した。sgRNA13の切断部位がイントロン6にあり、sgRNA17、sgRNA18の切断部位がエクソン7にあることを考慮し、sgRNA17とsgRNA18切断部位の間に(具体的にはエクソン7:c.802+42部位)EGFP遺伝子を選択して挿入し、同時にEGFP遺伝子の左右に800bpのホモログアームを追加した。

10

Donor設計図を図6に示す。

Donor配列は、SEQ ID NO:64-66のいずれかに記載されている。

【0237】

2、PMD19-T-donorプラスミドの構築、抽出工程は上記と同じであり、ここでは贅言しない。

【0238】

3、293T細胞でのdonorの有効性の検証

(1)293T細胞の培養

工程は上記と同じであり、ここでは贅言しない。

20

【0239】

(2)PEI(ポリエチレンジアミン)法による293T細胞のトランスフェクション

1)1.5mLのEPチューブを取って、上記の順番で番号付けて、チューブごとに250µLのDMEM培地(血清なし)を加え、順に1.5µgのAAV-CYP4V2-sgRNA13プラスミド、AAV-CYP4V2-sgRNA17プラスミド、AAV-CYP4V2-sgRNA18プラスミド、AAV-CYP4V2-sgRNA13-sgRNA17プラスミド、AAV-CYP4V2-sgRNA13-sgRNA18プラスミドとエンブティープラスミドを加え、ボルテックスにより十分に混合した後、チューブごとにそれぞれ対応する1.5µgのPMD19-T-donorプラスミド(対応関係は以下の表を参照)を加え、混合した後、7.5µLのPEIトランスフェクション試薬を加え、ボルテックスにより混合し、室温で20min静置した後トランスフェクションを行った。また、ネガティブコントロールを設置した。

30

【0240】

【表28】

表11 sgRNAとdonor配列対応表

sgRNA	対応 donor
AAV-CYP4V2-sgRNA13	PMD19-T-dono13
AAV-CYP4V2-sgRNA17	PMD19-T-dono17
AAV-CYP4V2-sgRNA18	PMD19-T-dono18
AAV-CYP4V2-sgRNA13-sgRNA17	PMD19-T-dono13
	PMD19-T-dono17
AAV-CYP4V2-sgRNA13-sgRNA18	PMD19-T-dono13
	PMD19-T-dono18

40

50

【0241】

2) 培地 (6 ウェルプレート培地、血清なし DMEM = 2 mL / ウェル) に滴下し、インキュベーターで培養し、12 - 18 h で培地の半分を交換した。翌日に、蛍光顕微鏡で GFP の発現状況を観察して、トランスフェクション効率を評価し、トランスフェクション効率が良いであれば、トランスフェクトされたプラスミドの培養を継続した。

【0242】

3) 耐性細胞のスクリーニング

a) 液の調製: 10 mg / mL (母液) を 1 μg / mL に希釈したピューロマイシン、スクリーニングされた細胞。

【0243】

b) 液の交換: トランスフェクションの2日後に、(ネガティブコントロールを含めて) 1 ウェルあたり 3 mL のピューロマイシン含有の 293T 細胞培地を加え、トランスフェクションポジティブの細胞のスクリーニングを開始し、その後毎日細胞の生存状況を観察し、2日ごとに液の交換をし、液を交換する時に、対応する量のピューロマイシンを加えた。ネガティブコントロールのウェルの細胞が完全に死滅し、実験グループとコントロールグループの細胞は生存している場合 (トランスフェクションが成功したことを示す)、抗生物質によるスクリーニングを中止し、代わりに通常の培地を使用した。

【0244】

4) フローサイトメトリースクリーニング

抗生物質によるスクリーニング後の細胞 (約7日) を以下の工程でフローサイトメトリースクリーニングした。

【0245】

a) 6 ウェルプレート中の培地を吸引除去し、DPBS (Dulbecco's リン酸塩バッファー) で2回洗浄した。

b) 500 μL の 0.05% トリプシンを加え、37 °C で 4 min インキュベート消化した。

c) 3-5 倍体積の DMEM 中和トリプシンを加え、800 r/min で 2 min 遠心分離した。

d) 上清を吸引除去し、PBS 重懸濁細胞、800 r/min、2 min 遠心分離を加え、1回繰り返す、

e) 上清を吸引除去し、200 μL の 2% FBS を含む PBS 再懸濁細胞を加えた。

f) 上記工程で得られた液体をろ過チューブに加えて、全部をろ過網に通させた。

g) 上機し、スクリーニング後の陽性細胞を 12 ウェルプレートまたは 6 ウェルプレートに移して培養した。

【0246】

5) 293T 細胞ゲノム DNA の抽出

a) 6 ウェルプレートの細胞のコンフルエントが 80 - 90% に達した後、6 cm 培養皿に継代して培養した。

b) 細胞のコンフルエントが 80 - 90% に達した後、細胞を回収し、ゲノム DNA の抽出の準備をする。全工程は 7 - 10 日くらいである。ゲノムの抽出は、Nanjing Vazyme Biotech 社の細胞抽出キットを使用し、実験工程は上記と同じであり、ここでは贅言しない。

【0247】

6) 目的断片配列決定

a) donor の上流と下流で、プライマーを設計し、同時にプライマーの上流と下流に酵素切断部位を添加した。

【0248】

b) ベクター線状化及びライゲーション

プラスミドベクターは PMD-19T-MCS ベクターであり、ベクター線状化方法は上記と同じであり、使用された酵素は MluI 酵素と KpnI 酵素であり、ここでは贅言し

10

20

30

40

50

ない。PCR産物を回収して精製し、配列決定し、PMD-19T-MCS線状化ベクターにライゲーションした。方法は上記と同じであり、ここでは贅言しない。

【0249】

c) プラスミド形質転換

方法は上記と同じである。

【0250】

d) 配列決定

各プラスミドを摘み取って配列決定に供し、配列決定結果を統計した。

【0251】

実施例4 患者の3D網膜組織を使用したsgRNAの遺伝子編集効率のインビトロ検証 10

1、患者の腎上皮細胞の抽出と培養

北京賽貝社が提供する腎上皮細胞分離と培養キットを使用して行った。実験工程は以下のとおりである：

【0252】

1) UrinEasy分離完全培地、添加剤、ゼラチン(Gelatin)、洗浄液を細胞培養室に持ち込んだ。

2) 紫外線ランプをつけ、12ウェルプレート、50mL遠心チューブ、15mL遠心チューブ、電動ピペット、ピペット、吸引管、5mLマイクロピペットおよびチップ、1mLマイクロピペットおよびチップを用意した。37℃の水槽を開けた。

3) 採尿：手袋を着用し、消毒し、中間尿を採取し、シールフィルムで密封した。 20

4) 750μL/ウェルでゼラチンを、皿(3つのウェル)の底に塗布して、30分超えで、37℃で静置した。

5) 75%アルコールで尿瓶の外表面を消毒し、50mL円錐底型遠心チューブに小分けしてシールし、400×gで10min遠心分離した。

【0253】

6) UrinEasy分離完全培地と添加剤を取り出して調製した(0.5mLの添加剤あたり、5mLの基礎培地と混合)。

7) 最小限の速度で上部の液面に沿ってピペットを動かし、上清を1mLになるまでゆっくりと吸引した。

8) 再懸濁させて、15mL遠心チューブに入れ、10mLの洗浄液を加えて混合し、200×gで10min遠心分離した。 30

9) 12ウェルプレートを取り出し、ゼラチンを吸引除去し、洗浄液で一回(500μL)洗浄し、1ウェルあたり750μLのUrinEasy分離完全培地を加え、37℃で静置した。

10) 15mL遠心チューブを取り出して、0.2mLの細胞ペレットが残った。

11) UrinEasy分離完全培地で細胞ペレットを再懸濁させた：男性のものは1ウェル、女性のものは2ウェルとして、D0(0日目)とした。

【0254】

12) 観察：

1日目：汚染の有無の観察； 40

2日目：分離培地の補充 - 女性：500μL/ウェル；男性：250μL/ウェル；

4日目：付着がない場合：培地の半分を交換し、2日ごとに液を交換し、表面に沿って1mLの分離完全培地を加えた。

【0255】

13) 付着が出た後：細胞が表面に付着したら(3~7日または9~10日)、UrinEasy増幅完全培地で培養を行い、2日間の培養後、500μLの培養液で全量を交換した。

表面に付着した後、約9~12日(未滿14日)で、コンフルエントが80~90%に達したときに継代し、順に6ウェルプレート、6cm培養皿と10cm培養皿に継代し、後で使用するために凍結保存した。 50

【0256】

(2) iPSCsの誘導

患者由来の(c.802-8_810del117bpinsGC)腎上皮細胞をiPSCsに誘導し、工程は以下のとおりである：

【0257】

1) 体細胞のコンフルエントが70 - 90%に達したら、消化・継代を行うことができる。細胞を96ウェルプレートに播種し；播種密度は5000-15000個/ウェルとなるようにコントロールし、細胞の状況に応じて3つの密度勾配を設定でき、各勾配ではトリプルウェルを設置した。細胞播種の当日は-1日目とした。

【0258】

2) 0日目：細胞のコンフルエントおよびその状態を鏡下観察し、異なる勾配のマルチウェルに対して消化・計数を行って、細胞の量が10000 - 20000個に達したウェルに対して初期化を行った。初期化培地Aの配合は、以下のとおりである：

【表29】

初期化培地A	体積
体細胞培地	10 mL
初期化添加剤I	10 μ L

10

20

【0259】

3) 初期化添加剤IIを遠心分離しておいて、97 μ Lの初期化培地Aを初期化添加剤IIの試験管に加え、均一に混合して初期化培地Bとして、96ウェルプレートから選定された条件を満たしたウェルに100 μ Lの初期化培地Bを加え、培養プレートをインキュベーターに戻した。

【0260】

4) 1 - 2日目：鏡下観察を行い、細胞の形態の変化を写真で記録した。細胞の形態が明らかに変化している場合は、初期化培地Bを除去し、代わりに、初期化培地Aで培養を継続した。形態変化が明らかでない場合は、液の交換を行わなくても良い。

【0261】

5) 3日目：最初の2日間で細胞の形態が明らかに変化しており、かつ細胞の増殖速度が速い場合に、トリプシン消化で継代を行うことができる。細胞の状況とその量に従って、細胞を6ウェルプレートの2つ - 6つのウェルに継代し、初期化培地Cを加え、可能な限り単一の細胞の付着を形成させる。初期化培地Cの配合は、以下のとおりである：

【表30】

初期化培地C	体積
初期化培地A	9.8 mL
初期化添加剤III	5 μ L

30

40

【0262】

6) 4日目：細胞の容器に付着する状況を観察し、大部分の細胞が良好に容器に付着すれば、新鮮な体細胞培地に交換して、培養を継続した。

【0263】

7) 5日目：鏡下観察し、小クラスターのクローン(細胞が四つ以上のクローン集団)が形成したら、体細胞培地をReproeasyヒト体細胞初期化培地に変更する。小クラスターのクローンがまだ形成していなければ、1 - 2日間観察を継続して、Reproeasyヒト体細胞初期化培地に交換することができる。

【0264】

8) 6 - 8日目：鏡下観察し、小クラスターのクローンが大きくなり、一つのクローン

50

細胞集団は10個以上の細胞有すれば、Reproeasyヒト体細胞初期化培地をPSCeasyヒト多能性幹細胞培地（またはPGM1ヒト多能性幹細胞培地）に直接変更することができる。液を交換する前の観察では、死滅した細胞が多ければ、室温で平衡させたPBSで洗浄した後、液の交換をすることができる。

【0265】

9) 9 - 20日目：鏡下観察し、細胞の形態変化を写真で記録した。室温で平衡させた新鮮なPSCeasyヒト多能性幹細胞培地に毎日交換した。

【0266】

10) 21日目：鏡下観察し、単独の細胞クローンが10倍視野全体を満たした場合、1mLの注射針（またはガラス針などの器具）でクローンを切り、予めマトリゲルでコーティングされた48ウェルプレートに摘み取った（クローンの状態がよく、細胞が厚くかつ増殖が早い場合、24ウェルプレートに直接摘み取ることができる）。

10

【0267】

11) クローンを摘み取った後、PSCeasyヒト多能性幹細胞融解培地に播種し、細胞付着後は、PSCeasyヒト多能性幹細胞培地に交換し、必要な世代数になるまで培養を継続した。

【0268】

(3) 患者由来の3D網膜細胞の誘導
具体的な工程を表12に示す。

20

30

40

50

【表 3 1】

表 1 2 患者由来の 3D 網膜細胞の誘導工程

段階 1	0 日目	i P S C s を、 $3 \text{ 万} / \text{cm}^2$ の密度で T 2 5 フラスコに播種し、細胞密度が 7 0 % くらいになるまで培養。	E 8 培地	
段階 2	1 日目	中性プロテアーゼ ($2 \text{ mg} / \text{mL}$) で消化し、 $3 : 1 = \text{E} 8 : \text{NIM} + \text{rock 阻害剤 (Y27632)}$ が加えられた培地で 10 cm 皿で細胞を懸濁培養。(翌日に EB (胚様体) が形成し単独で存在。)	E 8 + NIM	10
	2 日目	液を交換 E 8 : NIM = $1 : 1$ 。		
	3 日目	液を交換 E 8 : NIM = $1 : 3$ 。		
	4 - 5 日目	液を交換 NIM のみ。		
	6 日目	液を交換 NIM + $50 \text{ ng} / \text{mL}$ の BMP 4。	NIM	
7 日目	形態が良好な EB s (単房、明瞭), 1 mL (約 2 0 0 個くらいの EB s) の培地を吸い取って、接着細胞用 6 ウェルプレートに滴下し、ウェルあたり 1 mL の NIM + $250 \mu \text{L}$ の FBS を添加。			
8 日目	液を交換 (4 mL の NIM + $25 \text{ ng} / \text{mL}$ の BMP 4) / ウェル。			
9 - 1 5 日目	1 日おきに NIM 培地で培地の半分を交換。			
段階 3	1 6 日目	$10 \mu \text{L}$ チップで、集まった細胞ペレットを 15 mL 遠心チューブに移し、自然に底部に沈んだ後、上清を除去し、 5 mL の RDM を加えて再懸濁させ、 6 cm 皿に播種し、2 - 3 日で液を交換。機械的分離を行い、RDM で懸濁培養。	RDM	30
	1 8 - 2 0 日目	$4 \times$ で鏡下観察し、表面に明瞭な外環を有する網膜神経節を非常に丁寧にゆっくりと収集し、 5 mL の RDM を含む 15 mL 遠心チューブに移動。収集した網膜神経節を 6 cm 皿に移動。		
	2 0 - 3 0 日目	2 - 3 日で液を交換し、外観から、明瞭な外環の有無で網膜オルガノイドの選別を継続し、その間、徐々に非網膜神経節に転換するオルガノイドもある。30 日後、残りの網膜神経節は、これからその形態を保つことができる。		

【 0 2 6 9 】

(4) A A V 8 ウイルスの構築とコーティング

1) プラスミド増幅。構築された A A V ベクター (s g R N A とドナーはいずれもプラスミド p X 6 0 1 - A A V - C M V - S a C a s 9 (A d d g e n e P l a s m i d # 6 1 5 9 1) から改造され、説明の便宜上、以下に s g R N A のプラスミドを A A V - C Y P 4 V 2 - s g R N A と命名し、ドナープラスミドを A A V - C Y P 4 V 2 - d o n o r と命名し、ここで A A V - C Y P 4 V 2 - d o n o r は一部の E G F P 配列を含み、上述の P M D - 1 9 T - d o n o r 配列と同じである)、パッケージングプラスミドと補助プラスミドは、大量のエンドトキシンフリー抽出を経なければならず、Q i a g e n M a x i K i t を用いてプラスミドの大量抽出を行い、工程は上記と同じである。

【 0 2 7 0 】

10

20

30

40

50

2) AAV8-293T細胞のトランスフェクション。トランスフェクション当日の細胞密度を観察し、80 - 90%に達したとき、ベクタープラスミド、パッケージングプラスミドと補助プラスミドをトランスフェクトすることができる。

3) AAV8ウイルスの収集：ウイルス粒子はパッケージング細胞と培養上清に同時存在する。最良の収率を得るために、細胞と培養上清を収集することができる。

4) AAVの精製、-80 °Cでの長期保存。

【0271】

(5) 3D網膜組織を用いたインビトロでのsgRNA遺伝子の編集効率の検証

1) AAV8を用いて、3D Retina (網膜) 組織を感染した。

2) 遺伝子編集効率を検証した。

10

【0272】

1) T7E1酵素切断実験

工程は上記と同じである。

【0273】

2) TOPO PCRクローニング

AAV-CYP4V2-sgRNA、AAV-CYP4V2-donorの編集効率を定量化し、実験グループとコントロールグループの切断効率に対して統計解析をするために、invitrogen社のZero Blunt TOPO PCRクローニングキットで実験を行い、菌体選択後サンガー (Sanger) で配列決定を行った。

【0274】

a) 3D網膜組織にAAVウイルスを感染させた後に獲得したDNAを増幅テンプレートとして、invitrogen社のPlatinum SuperFi (登録商標) シリーズのDNAポリメラーゼを用いてPCR反応を行った。

20

【表32】

5×SuperFi™ バッファー	10 μL	
10mM dNTP混合物	1 μL	
フォワードプライマー	1.25 μL	
リバースプライマー	1.25 μL	
gDNA	50 ng	30
Platinum™ SuperFi™ DNAポリメラーゼ	0.5 μL	
DEPC H ₂ O	50 μLまで	

【0275】

b) タッチダウンPCR (Touch down PCR) プログラム：

工程は上記と同じである。

【0276】

c) TOPO PCRクローニングの反応系は以下のとおりである。

40

【表 3 3】

試薬	体積 (μL)
新鮮な PCR 産物	0.5 - 4
塩溶液	1
ddH ₂ O	5 まで
pCR™-Blunt II-TOPO®	1
総体積	6

10

【0277】

上記反応系を調製して、軽く混合し、室温で 5 min 静置した。

氷上に置き、コンピテントセルを除去し、形質転換に備えた。

【0278】

d) TOPO PCR クローニング反応によるコンピテントセルの形質転換

コンピテントセルを 50 または 100 μL を取り、2 μL の上記 TOPO PCR クローニング反応液を加え、氷上で 5 - 30 min を静置し；振とうせずに、42 °C で 30 s ヒートショックし；速やかに反応系を氷上に移し、250 μL の S.O.C. 培地を加え；37 °C で 200 rpm で 1 h 振とう・融解し；対応する量の LB 培養プレート (25 μg/mL のブレオマイシン (Zeocin) を添加) を取り出し、100 μL の上記菌液をプレートに塗布し、37 °C のインキュベーターで一晩培養した。

20

【0279】

e) 選択された菌体に対する Sanger 配列決定。

翌朝、菌体プレートを取り出し、各プレートから 80 個の菌体を選択し；37 °C で 200 rpm で 3 - 4 h 振とうし；各菌体サンプルに対して 200 μL を採用しサンガー (Sanger) 配列決定を行った。

【0280】

実施例 5 ヒト化マウスモデルにおける遺伝子編集効率の検証

30

1、ヒト化マウスモデルにおける遺伝子編集効率の検証

1) ヒト化マウスの構築

ヒト化マウスの構築は、Biocytogen Pharmaceuticals (Beijing) Co., Ltd. が実施した。

ヒト変異部位について、Biocytogen Pharmaceuticals (Beijing) Co., Ltd. に依頼して、CYP4V2 ヒト化マウスモデルを構築してもらった。

【0281】

2) 技術の内容：

- a) 標的配列を認識するための sgRNA の設計・構築；
 - b) 標的遺伝子の切断を引き起こす CRISPR/Cas9 ベクターの構築；
 - c) sgRNA/Cas9 の活性検査；
 - d) ノックインターゲットベクターの設計・構築、設計に従ってエクソン 6 - 8 (イントロン配列を含む) の置換；
- インビトロ転写による sgRNA/Cas9 mRNA；

40

【0282】

e) マウス受精卵への sgRNA/Cas9 mRNA とターゲットベクターの注射；

f) CYP4V2 ノックイン F0 マウスの検査及び増殖；

g) CYP4V2 ノックイン F1 ヘテロ接合体マウスの獲得とジェノタイピング (so

50

u t h e r n b l o t t i n g (D N A ハ イ ブ リ ダ イ ズ) 検 定 。 外 在 性 及 内 在 性 プ ロ ー プ を 1 つ づ つ 含 む) 。

【 0 2 8 3 】

3) 技 術 の 方 法 :

a) マウスゲノムの標的配列の増幅と配列決定を行い、標的配列を狙った C R I S P R / C a s 9 ベクタープラスミドを設計と構築し、活性検査を行った。

b) マウスゲノム DNA を抽出し、標的配列を認識する s g R N A を増幅した。

c) 標的遺伝子の切断を引き起こす C R I S P R / C a s 9 ベクタープラスミドを設計と構築した。

【 0 2 8 4 】

d) 利 用 B i o c y t o g e n P h a r m a c e u t i c a l s (B e i j i n g) C o . , L t d . が 独 自 に 開 発 し た 検 査 キ ャ ッ ト で s g R N A / C a s 9 に 対 し て 活 性 検 査 を 行 っ た 。

e) 活 性 の 高 い s g R N A / C a s 9 標 的 部 位 配 列 情 報 を 選 択 し 、 C Y P 4 V 2 ノ ッ ク イ ン ター ゲ ティ ン グ ベ ク ター を 設 計 ・ 構 築 し た 。

【 0 2 8 5 】

f) マウス受精卵前核に s g R N A / C a s 9 m R N A と ター ゲ ティ ン グ ベ ク ター を 注 射 し 、 F 0 / F 1 陽 性 マウス を 得 た 。 こ の 実 験 は 主 に 以 下 の よ う な 内 容 を 含 む 。

s g R N A / C a s 9 m R N A の イ ン ビ ト ロ 転 写 ;

マウス受精卵の収集 ;

マウス受精卵への RNA と ター ゲ ティ ン グ ベ ク ター の 注 射 ;

代理母マウスの輸卵管への受精卵の移植 ;

C Y P 4 V 2 遺 伝 子 ヒ ト 化 で 点 変 異 の F 0 マウス の ジェ ノ タイ ピ ン グ お よ び 増 殖 ;

C Y P 4 V 2 遺 伝 子 ヒ ト 化 で 点 変 異 の F 1 マウス の 獲 得 及 び ジェ ノ タイ ピ ン グ (P C R 検 査 と s o u t h e r n b l o t t i n g ハ イ ブ リ ダ イ ズ 検 定 を 含 有 す る) 。

【 0 2 8 6 】

(2) 飼 育 と 繁 殖

両種類のヒト化マウスを獲得した後、F 1 ヘテロ接合体マウスにインタークロスさせ、AAV ウイルス注射のために、できるだけ早く十分な数の F 2 または F 3 ホモ接合体のヒト化マウスを得た。

【 0 2 8 7 】

(3) マウス網膜下腔への AAV ウイルス注射

AAV-CYP4V2-sgRNA (SaCas9 を提供) と AAV-CYP4V2-donor ベクターをアデノ随伴ウイルスにパッケージし、CYP4V2 変異モデルマウスの網膜に注射し、設計された sgRNA と Donor がインビボにおける編集と修復効率を検証した。AAV-CYP4V2-sgRNA 13+AAV-CYP4V2-donor 13 を例にすると、具体的な工程は以下のとおりである。sgRNA 17-18 のグループの実験方法についても同様である。

【 0 2 8 8 】

1) 実 験 の 設 計

a) プランクコントロールグループ : 生理塩水。

b) 実 験 グループ : AAV-CYP4V2-sgRNA 13 (SaCas9 を提供) と AAV-CYP4V2-donor 13 。

【 0 2 8 9 】

2) AAV (アデノ随伴ウイルス) 血清型の選択

網膜への嗜好性がより良い AAV 2 / 8 血清型を選択した。

【 0 2 9 0 】

3) ウイルスパッケージング

AAV-CYP4V2-donor 13、AAV-CYP4V2-sgRNA 13 ベクターを、それぞれ AAV 2 / 8、AAV-helper で、アデノ随伴ウイルス (AAV) に

10

20

30

40

50

パッケージした。

【0291】

4) マウスへの注射実験

20匹のCYP4V2変異モデルマウスを取り、1グループ5匹で4つのグループに分けて実験を行った。

【0292】

実験の計画は以下のとおりである。

a) ブランクコントロールグループ：マウスの片目あたりに2 μ Lの生理塩水を注射した。

b) 実験グループ：パッケージされたAAV-CYP4V2-sgRNA13とAAV-CYP4V2-donor13ウイルスを、1:1の割合で等量混合し、マウスの片目あたりに2 μ L(1E10vg)注射した。

c) 一ヶ月後に治療効果を検査した。

【0293】

実験の工程は以下のとおりである：

a) 注射の30分前に、1%アトロピンで散瞳し；麻酔前に再度の散瞳を行った。

【0294】

b) ケタミン80mg/kgとキシラジン8mg/kgをマウスに腹腔内注射し、マウスを麻酔した後、マウスを眼科手術用顕微鏡の動物実験台の前に置き、マウスの眼に一滴の0.5%のプロパラカインを滴下し、局所麻酔を行った。100:1の割合で、AAVウイルスにフルオレセインナトリウムの原液を加え、低速で遠心混合した。

【0295】

c) インスリン注射針でマウスの眼球の毛様体平面部に小孔を予め刺し、その小孔にマイクロインジェクターの針を通し、マウスの眼球の硝子体腔に入り、そのとき、鏡下でマウスの眼球底がはっきり見えるように、マウスの眼球に適量の2%ヒドロキシメチルセルロースを滴下し、硝子体を避けながら、反対側の網膜周辺部に針を刺し、フルオレセインナトリウム含有のAAVウイルスをゆっくりと押し出し、片目あたりの注射量は1 μ Lであり、フルオレセインナトリウムを指示薬として、網膜下腔へ注入したかどうかの判断をした。

【0296】

d) 術後、マウスに異常がないか観察し、感染予防のためネオマイシン眼軟膏を投与した。

【0297】

5) 遺伝子編集療法の効果の評価

実験結果では、各実験グループの治療効果は基本的に一致しているため、AAV-CYP4V2-sgRNA13とAAV-CYP4V2-donor13ウイルスグループを代表として、遺伝子編集療法の効果を説明する。

【0298】

(4) ヒト化マウスにおけるAAV8-AAV-CYP4V2-sgRNAの編集効率の評価

検証方法は、「実施例4中の(5)3D網膜組織を用いたインビトロでのsgRNA遺伝子の編集効率の検証」を参照する。

【0299】

実験結果では、各実験グループの治療効果は基本的に一致しているため、AAV-CYP4V2-sgRNA13とAAV-CYP4V2-donor13ウイルスグループを代表として、遺伝子編集療法の効果を説明する。

【0300】

治療後のマウス機能変化をERG(網膜電生理)により評価したところ、治療後、変異マウスモデルの網膜機能が改善された。

【0301】

10

20

30

40

50

サンプルを切片した後、H E 染色でマウス網膜の形態変化を観察したところ、野生型マウスの網膜状態に近い形態であった。

【 0 3 0 2 】

免疫蛍光染色により、遺伝子編集治療用ベクターが網膜の対応位置で発現しているかどうかを観察したところ、遺伝子編集治療用ベクターは網膜の対応位置で発現した。

【 0 3 0 3 】

網膜組織の形態変化を特殊な網膜 M a r k e r の一連の染色跡を通して観察したところ、治療後、マウスの網膜組織の形態が改善されていることが認められる。

【 0 3 0 4 】

最後に、以下の点に留意すべきである：上記の実施例は、本願の技術的思想を説明するために使用されただけであり、これを限定するものではない。前述した実施例を参照して本願を詳細に説明したものの、当業者なら本願発明の精神及び範囲から逸脱しない限り、前述の実施例に記載の技術的思想を修正し、またはいくつかの技術的特徴を均等に置換することができることを、当業者は理解すると思われる。

10

20

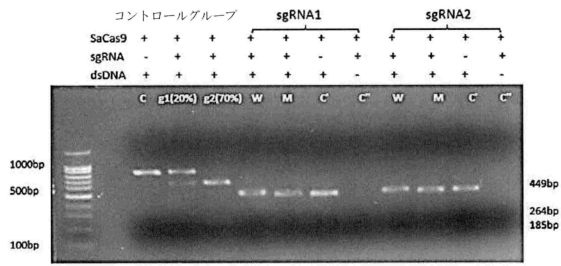
30

40

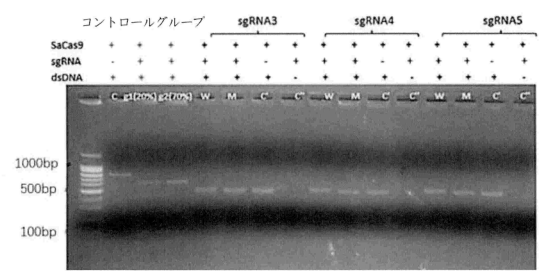
50

【図面】

【図 1 A】

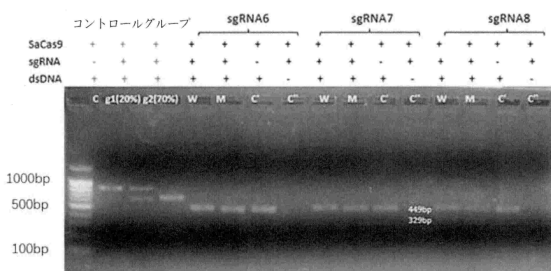


【図 1 B】

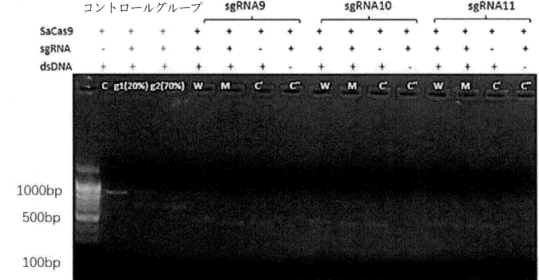


10

【図 1 C】

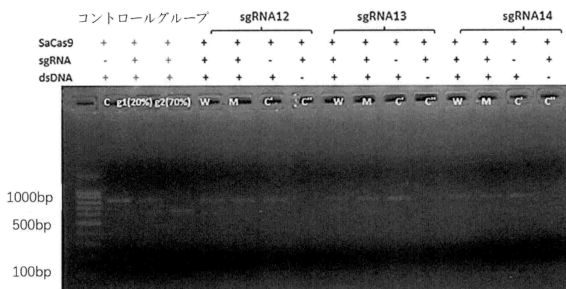


【図 1 D】

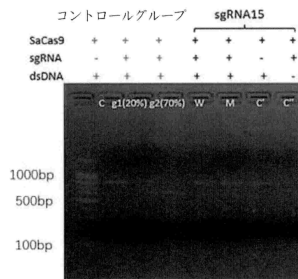


20

【図 1 E】



【図 1 F】

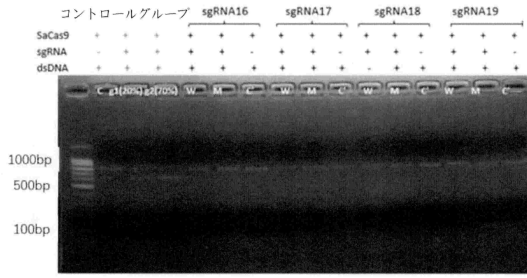


30

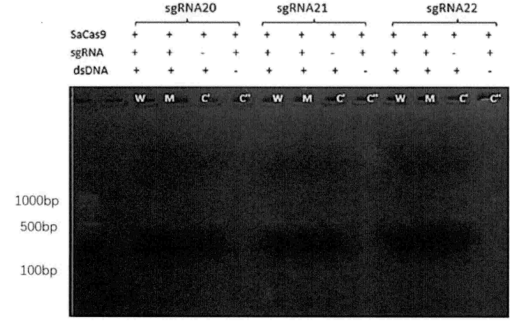
40

50

【図 1 G】

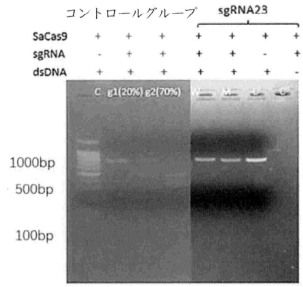


【図 1 H】

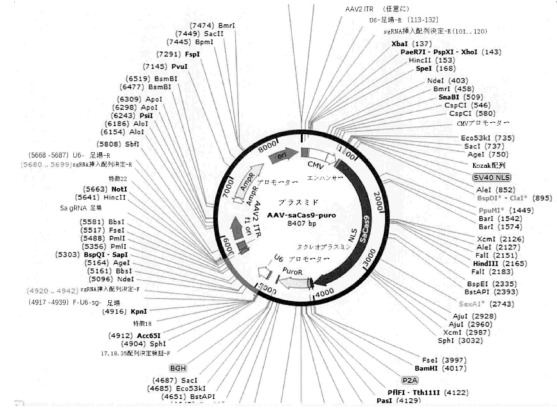


10

【図 1 I】



【図 2】

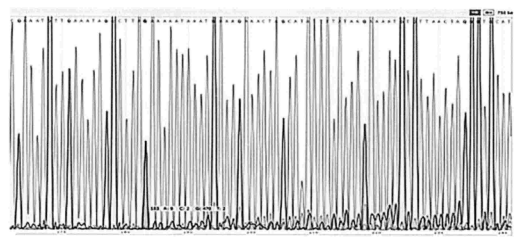


20

【図 3】



【図 4 A】

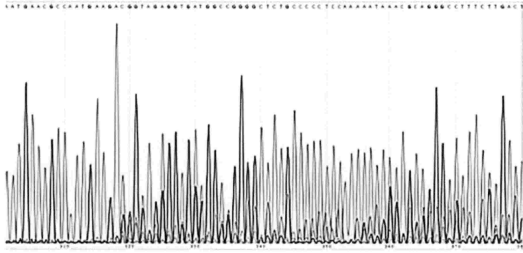


30

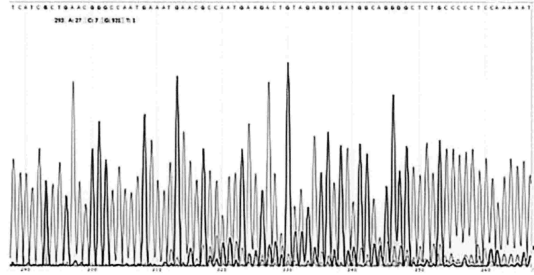
40

50

【 図 4 B 】

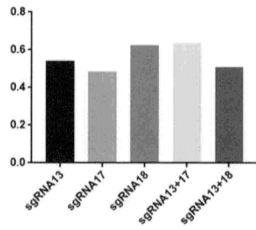


【 図 4 C 】

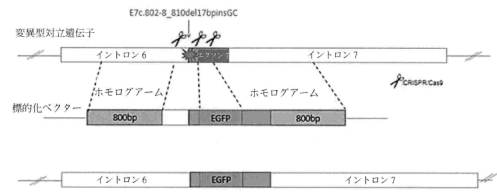


10

【 図 5 】



【 図 6 】



20

【 配列表 】

0007616716000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5

(72)発明者 楊麗萍

中国北京市海淀区花園北路49号

(72)発明者 孟祥

中国北京市海淀区花園北路49号

(72)発明者 陳邵宏

中国北京市昌平区科技園区生命園路9号院1号楼S-402室

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献

国際公開第2019/025984(WO, A1)

中国特許出願公開第111500635(CN, A)

Clinical Ophthalmology, 2019年, Vol.13, pp.1379-1399

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 15/90

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed