

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-544688

(P2022-544688A)

(43)公表日 令和4年10月20日(2022.10.20)

(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 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0 4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861	Z 4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z 4 C 0 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全66頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-509707(P2022-509707)	(71)出願人	596060697
(86)(22)出願日	令和2年8月14日(2020.8.14)		マサチューセッツ インスティテュート
(85)翻訳文提出日	令和4年4月14日(2022.4.14)		オブ テクノロジー
(86)国際出願番号	PCT/US2020/046523		アメリカ合衆国マサチューセッツ州02
(87)国際公開番号	WO2021/034717		139ケンブリッジ, マサチューセッツ
(87)国際公開日	令和3年2月25日(2021.2.25)		・アヴェニュー・77
(31)優先権主張番号	62/888,210	(74)代理人	100101454
(32)優先日	令和1年8月16日(2019.8.16)		弁理士 山田 卓二
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
(31)優先権主張番号	62/985,633	(74)代理人	100157956
(32)優先日	令和2年3月5日(2020.3.5)		弁理士 稲井 史生
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100170520
			弁理士 笹倉 真奈美
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)	(74)代理人	100221545
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C R I S P R / C A S 1 3 を使用する標的化トランススプライシング

(57)【要約】

本開示は、細胞のプレmRNAにおける標的化トランススプライシング事象を媒介するための組成物およびこれらの組成物を使用する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

核酸ターゲティング C R I S P R / C a s システム；  
 核酸ガイド；  
 特異的 R N A 結合ドメイン；ならびに  
 スプライドナーおよび/またはアクセプターおよび生理的条件下において特異的 R N A 結合ドメインにハイブリダイズする R N A 配列を含む修復鋳型  
 を含む標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 2】

前記核酸ガイドが、R N A ガイドである、請求項 1 に記載の標的化トランススプライシ  
 ングシステム。 10

## 【請求項 3】

前記核酸ガイドが、D N A ガイドである、請求項 1 に記載の標的化トランススプライシ  
 ングシステム。

## 【請求項 4】

1 つの核酸ガイドを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の標的化トランススプラ  
 イシングシステム。

## 【請求項 5】

2 つ以上の核酸ガイドを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の標的化トランスス  
 プライシングシステム。 20

## 【請求項 6】

前記核酸ガイドが、複数の標的を認識する、請求項 5 に記載の標的化トランススプラ  
 イシングシステム。

## 【請求項 7】

前記核酸ガイドが、スプライスアクセプター ( S A ) 部位を標的にする、請求項 1 ~ 6  
 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 8】

前記核酸ガイドが、スプライドナー ( S D ) 部位を標的にする、請求項 1 ~ 6 のい  
 ずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 9】

前記核酸ガイドが、スプライス部位近くの領域を標的にする、請求項 1 ~ 8 のい  
 ずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。 30

## 【請求項 10】

前記核酸ガイドが、スプライス部位の 200 ヌクレオチド内の領域を標的にする、請求  
 項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 11】

前記核酸ガイドが、スプライス部位から 100 ヌクレオチド以下の領域を標的にする、  
 請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 12】

前記 2 つ以上の核酸ガイドが、関心対象の 1 つの核酸を標的にする、請求項 1 ~ 11 の  
 いずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。 40

## 【請求項 13】

前記 2 つ以上の核酸ガイドが、関心対象の複数の核酸を標的にする、請求項 1 ~ 11 の  
 いずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 14】

前記 C R I S P R / C a s システムが、C a s 13 ポリペプチドを含む、請求項 1 に記  
 載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 15】

前記 C a s 13 が、ヌクレアーゼ不活性 C a s 13 ポリペプチド ( d C a s 13 ) であ  
 る、請求項 14 に記載の標的化トランススプライシングシステム。 50

- 【請求項 16】  
前記 Cas 13 が、ヌクレアーゼ活性 Cas 13 ポリペプチドである、請求項 14 に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 17】  
前記特異的 RNA 結合ドメインが、ウイルスタンパク質を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 18】  
前記ウイルスタンパク質が、MS2 結合タンパク質である、請求項 17 に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 19】  
前記ウイルスタンパク質が、N タンパク質である、請求項 17 に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 20】  
前記ウイルスタンパク質が、PP7 コートタンパク質である、請求項 17 に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 21】  
前記ウイルスタンパク質が、Q Beta コートタンパク質である、請求項 17 に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 22】  
前記ウイルスタンパク質が、前記 CRISPR / Cas システムに共有結合している、請求項 17 ~ 21 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 23】  
前記ウイルスタンパク質が、前記 CRISPR / Cas システムに共有結合していない、請求項 17 ~ 21 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 24】  
前記ウイルスタンパク質および CRISPR / Cas システムが、融合タンパク質である、請求項 17 ~ 21 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 25】  
1 つの修復鋳型を含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 26】  
2 つ以上の修復鋳型を含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 27】  
前記修復鋳型が、DNA として導入される、請求項 25 または 26 に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 28】  
前記修復鋳型が、RNA としてデリバリーされる、請求項 25 または 26 に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 29】  
前記修復鋳型が、RNA として発現される、請求項 25 ~ 28 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 30】  
前記修復鋳型が、スプライサクセプターを含む、請求項 25 ~ 29 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 31】  
前記修復鋳型が、スプライドナーを含む、請求項 25 ~ 29 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。
- 【請求項 32】  
前記修復鋳型が、1 つまたは複数のスプライス部位を含む、請求項 25 ~ 31 のいずれ

10

20

30

40

50

か一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 33】

前記修復鋳型が、エキソンを含む、請求項 25 ~ 32 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 34】

前記修復鋳型が、2つ以上のエキソンを含む、請求項 25 ~ 33 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 35】

前記修復鋳型が、イントロンを含む、請求項 25 ~ 34 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

10

【請求項 36】

前記修復鋳型が、2つ以上のイントロンを含む、請求項 25 ~ 35 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 37】

前記修復鋳型が、関心対象の前記標的核酸にハイブリダイズする1つまたは複数の配列を含む、請求項 25 ~ 36 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 38】

前記修復鋳型の少なくとも一部分が、前記 MS2 結合タンパク質に特異的に結合する ms2ヘアピンを含む、請求項 25 ~ 37 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

20

【請求項 39】

前記修復鋳型が、前記 N タンパク質に特異的に結合する box Bヘアピンを含む、請求項 25 ~ 37 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 40】

前記修復鋳型が、前記 PP7 コートタンパク質に特異的に結合する PP7ヘアピンを含む、請求項 25 ~ 37 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 41】

前記修復鋳型が、前記 Q Beta コートタンパク質に特異的に結合する Q Betaヘアピンを含む、請求項 25 ~ 37 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

30

【請求項 42】

さらに細胞を含む、請求項 1 ~ 41 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 43】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分が、前記細胞内に導入される、請求項 42 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 44】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の発現および/または活性が、一過性である、請求項 42 または 43 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

40

【請求項 45】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性が、小分子によって調節される、請求項 44 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 46】

前記小分子が、アブシシン酸 (ABA)、ラパマイシン (またはラパログ)、FK506、サイクロスポリン A、FK1012、ジベレリン 3-AM、FKCsA、AP1903/AP、およびオーキシンから選択される、請求項 45 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 47】

50

前記少なくとも一部分が、C a s 1 3 タンパク質である、請求項 4 3 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 4 8】

前記 C a s 1 3 タンパク質がさらに、小分子結合ドメインを含む、請求項 4 7 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 4 9】

前記 C a s 1 3 タンパク質および前記小分子結合ドメインが、グリシン - セリンリンカーによって連結されている、請求項 4 8 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 5 0】

前記小分子結合ドメインが、A B A 結合ドメインである、請求項 4 5 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 5 1】

前記 A B A 結合ドメインが、A B I 1 ポリペプチドを含む、請求項 5 0 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 5 2】

さらにウイルスタンパク質を含む、請求項 4 5 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 5 3】

前記ウイルスタンパク質がさらに、小分子結合ドメインを含む、請求項 5 2 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 5 4】

前記ウイルスタンパク質および前記小分子結合ドメインが、グリシン - セリンリンカーによって連結されている、請求項 5 2 または 5 3 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 5 5】

前記小分子結合ドメインが、A B A 結合ドメインである、請求項 5 3 または 5 4 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 5 6】

前記 A B A 結合ドメインが、P Y L 1 ポリペプチドを含む、請求項 5 5 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 5 7】

A B A の追加が、標的プレmRNAの標的化トランススプライシングを誘導する、請求項 5 6 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 5 8】

前記細胞への前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーが、ウイルス性である、請求項 4 2 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 5 9】

前記ウイルスが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、アネロウイルス、またはパキユロウイルスである、請求項 5 8 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 6 0】

細胞への前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーが、非ウイルス性である、請求項 4 2 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 6 1】

前記非ウイルス性デリバリーシステムが、カチオン脂質媒体、電気穿孔法、リン酸カルシウムトランスフェクション、機械的なトランスフェクション、およびナノ粒子デリバリーから選択される、請求項 6 0 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

10

20

30

40

50

## 【請求項 6 2】

前記 C R I S P R / C a s システムが、核酸を標的にする、請求項 1 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 6 3】

前記核酸が R N A である、請求項 6 2 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 6 4】

前記核酸が D N A である、請求項 6 2 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 6 5】

前記 C R I S P R / C a s システムが、前記細胞の R N A と関連している、請求項 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

10

## 【請求項 6 6】

前記 R N A が、プレ m R N A である、請求項 6 5 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 6 7】

C R I S P R / C a s システムが、前記細胞の D N A と関連している、請求項 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 6 8】

前記 C R I S P R / C a s システムが、前記細胞の D N A と関連していない、請求項 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

20

## 【請求項 6 9】

前記 C R I S P R / C a s システムが、前記細胞の核におけるプレ m R N A のトランススプライシングを媒介する、請求項 1 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 7 0】

前記 C R I S P R / C a s システムが、前記細胞の細胞質におけるプレ m R N A のトランススプライシングを媒介する、請求項 1 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 7 1】

前記トランススプライシングが、分裂細胞において生じる、請求項 1 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

30

## 【請求項 7 2】

前記トランススプライシングが、分裂終了細胞において生じる、請求項 1 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 7 3】

分裂終了細胞が、ニューロン、筋細胞、または含脂肪細胞である、請求項 7 2 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 7 4】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の発現が、誘導可能である、請求項 1 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

40

## 【請求項 7 5】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性が、誘導可能である、請求項 1 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

## 【請求項 7 6】

細胞においてプレ m R N A に対する標的化トランススプライシング事象を媒介する方法であって、標的化トランススプライシング C R I S P R / C a s システムの少なくとも一部分を細胞に導入することを含み、前記 C R I S P R / C a s システムが、

核酸ターゲティング C R I S P R / C a s システム；

関心対象の核酸遺伝子座に特異的にハイブリダイズする核酸ガイド；

50

- 特異的 RNA 結合ドメイン；ならびに  
 スプライドナーおよび/またはスプライサクセプターおよび生理的条件下において  
 特異的 RNA 結合ドメインにハイブリダイズする RNA 配列を含む修復鋳型  
 を含む、方法。
- 【請求項 77】  
 前記核酸ガイドが、RNA を含む、請求項 76 に記載の方法。
- 【請求項 78】  
 前記核酸ガイドが、DNA を含む、請求項 76 に記載の方法。
- 【請求項 79】  
 単一の核酸ガイドが、前記細胞に導入される、請求項 76 に記載の方法。 10
- 【請求項 80】  
 複数の核酸ガイドが、前記細胞に導入される、請求項 76 に記載の方法。
- 【請求項 81】  
 前記複数の核酸ガイドが、関心対象の 1 つの核酸を標的にする、請求項 80 に記載の  
 方法。
- 【請求項 82】  
 前記複数の核酸ガイドが、関心対象の 2 つ以上の核酸を標的にする、請求項 81 に記載  
 の方法。
- 【請求項 83】  
 前記核酸ガイドが、スプライサクセプター (SA) 部位を標的にする、請求項 76 ~ 20  
 82 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 84】  
 前記核酸ガイドが、スプライドナー (SD) 部位を標的にする、請求項 76 ~ 82 の  
 いずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 85】  
 前記核酸ガイドが、スプライス部位近くの領域を標的にする、請求項 76 ~ 84 のい  
 ずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 86】  
 前記核酸ガイドが、前記スプライス部位の 200 ヌクレオチド内の領域を標的にする、  
 請求項 76 ~ 85 のいずれか一項に記載の方法。 30
- 【請求項 87】  
 前記核酸ガイドが、前記スプライス部位から 100 ヌクレオチド以下の領域を標的にす  
 る、請求項 76 ~ 86 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 88】  
 複数の核酸ガイドが、複数の細胞にデリバリーされる、請求項 76 に記載の方法。
- 【請求項 89】  
 前記 CRISPR / Cas システムが、Cas13 ポリペプチドを含む、請求項 76 に  
 記載の方法。
- 【請求項 90】  
 前記 Cas13 ポリペプチドが、Cas13b ポリペプチドである、請求項 89 に記載 40  
 の方法。
- 【請求項 91】  
 前記 Cas13b ポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性 Cas13b (dCas13b  
 ) である、請求項 90 に記載の方法。
- 【請求項 92】  
 前記 Cas13b ポリペプチドが、ヌクレアーゼ活性 Cas13b である、請求項 90  
 に記載の方法。
- 【請求項 93】  
 前記特異的 RNA 結合ドメインが、ウイルスタンパク質を含む、請求項 76 ~ 92 のい  
 ずれか一項に記載の方法。 50

## 【請求項 9 4】

前記ウイルスタンパク質が、MS2 結合タンパク質である、請求項 9 3 に記載の方法。

## 【請求項 9 5】

前記ウイルスタンパク質が、N タンパク質である、請求項 9 3 に記載の方法。

## 【請求項 9 6】

前記ウイルスタンパク質が、PP7 コートタンパク質である、請求項 9 3 に記載の方法。

## 【請求項 9 7】

前記ウイルスタンパク質が、Q Beta コートタンパク質である、請求項 9 3 に記載の方法。

10

## 【請求項 9 8】

前記ウイルスタンパク質が、前記 CRISPR / Cas システムに共有結合している、請求項 9 3 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9 9】

前記ウイルスタンパク質が、前記 CRISPR / Cas システムに共有結合していない、請求項 9 3 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 0 0】

前記ウイルスタンパク質および CRISPR / Cas システムが、融合タンパク質である、請求項 9 3 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 0 1】

前記トランススプライシングシステムが、1つのスプライスアクセプター修復鋳型を含む、請求項 7 6 に記載の方法。

20

## 【請求項 1 0 2】

前記トランススプライシングシステムが、2つ以上のスプライスアクセプター修復鋳型を含む、請求項 7 6 に記載の方法。

## 【請求項 1 0 3】

前記トランススプライシングシステムが、1つのスプライドナー修復鋳型を含む、請求項 7 6 に記載の方法。

## 【請求項 1 0 4】

前記トランススプライシングシステムが、2つ以上のスプライドナー修復鋳型を含む、請求項 7 6 に記載の方法。

30

## 【請求項 1 0 5】

前記修復鋳型が、前記 MS2 結合タンパク質に特異的に結合する ms2 ヘアピンを含む、請求項 1 0 1 ~ 1 0 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 0 6】

前記修復鋳型が、前記 N タンパク質に特異的に結合する box B ヘアピンを含む、請求項 1 0 1 ~ 1 0 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 0 7】

前記修復鋳型が、前記 PP7 コートタンパク質に特異的に結合する PP7 ヘアピンを含む、請求項 1 0 1 ~ 1 0 4 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 1 0 8】

前記修復鋳型が、前記 Q Beta コートタンパク質に特異的に結合する Q Beta ヘアピンを含む、請求項 1 0 1 ~ 1 0 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 0 9】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の発現が、一過性である、請求項 7 6 ~ 1 0 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 1 0】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性が、一過性である、請求項 7 6 ~ 1 0 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 1 1】

50

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性が、小分子によって調節される、請求項 109 または 110 に記載の方法。

【請求項 112】

前記小分子が、アブシシン酸 (ABA)、ラパマイシン (またはラパログ)、FK506、サイクロスポリン A、FK1012、ジベレリン 3-AM、FKCsa、AP1903/AP20187、およびオーキシンから選択される、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分が、Cas13 ポリペプチドを含む、請求項 112 に記載の方法。

【請求項 114】

前記 Cas13 ポリペプチドがさらに、小分子結合ドメインを含む、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

前記 Cas13 ポリペプチドおよび前記小分子結合ドメインが、グリシン - セリンリンカーによって連結されている、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】

前記小分子結合ドメインが、ABA 結合ドメインである、請求項 114 または 115 に記載の方法。

【請求項 117】

前記 ABA 結合ドメインが、ABI1 ポリペプチドを含む、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 118】

さらにウイルスタンパク質を含む、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 119】

前記ウイルスタンパク質がさらに、小分子結合ドメインを含む、請求項 118 に記載の方法。

【請求項 120】

前記ウイルスタンパク質および前記小分子結合ドメインが、グリシン - セリンリンカーによって連結されている、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

前記小分子結合ドメインが、ABA 結合ドメインである、請求項 119 または 120 に記載の方法。

【請求項 122】

前記 ABA 結合ドメインが、PYL1 ポリペプチドを含む、請求項 121 に記載の方法。

【請求項 123】

ABA の追加が、標的 premRNA の標的化トランススプライシングを誘導する、請求項 122 に記載の方法。

【請求項 124】

細胞への前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーが、ウイルス性である、請求項 76 ~ 123 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 125】

前記ウイルスが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、アネロウイルス、またはバキュロウイルスである、請求項 124 に記載の方法。

【請求項 126】

細胞への前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーが、非ウイルス性である、請求項 76 ~ 122 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 127】

前記非ウイルス性デリバリーシステムが、カチオン脂質媒体、電気穿孔法、リン酸カル

10

20

30

40

50

シウムトランスフェクション、機械的なトランスフェクション、およびナノ粒子デリバリーから選択される、請求項 126 に記載の方法。

【請求項 128】

前記 CRISPR/Cas システムが、前記細胞の RNA と関連する、請求項 76 ~ 127 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 129】

前記 RNA が、プレ mRNA である、請求項 128 に記載の方法。

【請求項 130】

前記 CRISPR/Cas システムが、細胞の DNA と関連する、請求項 76 ~ 129 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 131】

前記 CRISPR/Cas システムが、細胞の DNA と関連しない、請求項 76 ~ 129 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 132】

前記 CRISPR/Cas システムが、前記細胞の核におけるプレ mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 76 ~ 129 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 133】

前記 CRISPR/Cas システムが、前記細胞の細胞質におけるプレ mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 76 ~ 129 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 134】

前記 CRISPR/Cas システムが、イントロン - エキソン接合部でのプレ mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 132 または 133 に記載の方法。

20

【請求項 135】

前記 CRISPR/Cas システムが、エキソン - イントロン接合部でのプレ mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 132 または 133 に記載の方法。

【請求項 136】

前記スプライス修復鋳型が、スプライサクセプターを含まない、請求項 76 ~ 135 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 137】

前記スプライス修復鋳型が、スプライドナーを含まない、請求項 76 ~ 135 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 138】

前記スプライス修復鋳型が、スプライサクセプターおよびスプライドナーの両方を含む、請求項 76 ~ 135 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 139】

前記 CRISPR/Cas システムが、プレ mRNA の 5' 末端での前記プレ mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 76 ~ 138 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 140】

前記 CRISPR/Cas システムが、プレ mRNA の 3' 末端での前記プレ mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 76 ~ 138 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 141】

前記 CRISPR/Cas システムが、プレ mRNA 内の内部部位でのプレ mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 76 ~ 138 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 142】

前記 CRISPR/Cas システムが、3' 非翻訳領域 (UTR) 内でのプレ mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 76 ~ 138 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 143】

50

前記CRISPR/Casシステムが、5'非翻訳領域(UTR)内でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する、請求項76~138のいずれか一項に記載の方法。

【請求項144】

前記細胞が、分裂細胞である、請求項76~143のいずれか一項に記載の方法。

【請求項145】

前記細胞が、分裂終了細胞である、請求項76~143のいずれか一項に記載の方法。

【請求項146】

前記分裂終了細胞が、ニューロン、筋細胞、および脂肪細胞からなる群から選択される、請求項145に記載の方法。

【請求項147】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の発現が、誘導可能である、請求項76~146のいずれか一項に記載の方法。

【請求項148】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性が、誘導可能である、請求項76~146のいずれか一項に記載の方法。

【請求項149】

前記細胞が、疾患または障害を患う対象に存する、請求項144~146のいずれか一項に記載の方法。

【請求項150】

前記疾患または障害が、神経変性の、神経学的な、または神経筋の疾患または障害である、請求項149に記載の方法。

【請求項151】

前記神経変性の、神経学的な、または神経筋の疾患または障害が、脊髄筋萎縮症、レット症候群、アンジェルマン症候群、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、前頭側頭認知症、リソソーム蓄積症、多発性硬化症、および筋委縮性側索硬化症(ALS)からなる群から選択される、請求項150に記載の方法。

【請求項152】

核酸結合タンパク質ドメイン；

特異的RNA結合ドメイン；ならびに

スプライドナーおよび/またはスプライスアクセプターおよびストリンジェントな条件下において特異的RNA結合ドメインにハイブリダイズするRNA配列を含む修復鋳型を含む標的化トランススプライシングシステム。

【請求項153】

前記核酸結合タンパク質ドメインが、スプライスアクセプター(SA)部位を標的にする、請求項152に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項154】

前記核酸結合タンパク質ドメインが、スプライドナー(SD)部位を標的にする、請求項152に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項155】

前記特異的RNA結合ドメインが、ウイルスタンパク質を含む、請求項152~154のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項156】

前記ウイルスタンパク質が、MS2結合タンパク質である、請求項155に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項157】

前記ウイルスタンパク質が、Nタンパク質である、請求項155に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項158】

前記ウイルスタンパク質が、PP7コートタンパク質である、請求項155に記載の標

10

20

30

40

50

的化トランススプライシングシステム。

【請求項 1 5 9】

前記ウイルスタンパク質が、Q B e t a コートタンパク質である、請求項 1 5 5 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 1 6 0】

前記ウイルスタンパク質が、前記核酸結合タンパク質ドメインに共有結合している、請求項 1 5 5 ~ 1 5 9 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 1 6 1】

前記ウイルスタンパク質が、前記核酸結合タンパク質ドメインに共有結合していない、請求項 1 5 5 ~ 1 5 9 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

10

【請求項 1 6 2】

前記ウイルスタンパク質および核酸結合タンパク質ドメインが、融合タンパク質である、請求項 1 5 5 ~ 1 5 9 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 1 6 3】

1 つのスプライスアクセプター修復鋳型を含む、請求項 1 5 2 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 1 6 4】

2 つ以上のスプライスアクセプター修復鋳型を含む、請求項 1 5 2 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

20

【請求項 1 6 5】

1 つのスプライドナー修復鋳型を含む、請求項 1 5 2 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 1 6 6】

2 つ以上のスプライドナー修復鋳型を含む、請求項 1 5 2 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 1 6 7】

スプライドナーおよび/またはスプライスアクセプターを含む修復鋳型を含む、請求項 1 5 2 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 1 6 8】

前記修復鋳型の少なくとも一部分が、前記 M S 2 結合タンパク質に特異的に結合する m s 2 ヘアピンを含む、請求項 1 6 3 ~ 1 6 7 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

30

【請求項 1 6 9】

前記スプライス修復鋳型が、前記 N タンパク質に特異的に結合する b o x B ヘアピンを含む、請求項 1 6 3 ~ 1 6 7 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 1 7 0】

前記スプライス修復鋳型が、前記 P P 7 コートタンパク質に特異的に結合する P P 7 ヘアピンを含む、請求項 1 6 3 ~ 1 6 7 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

40

【請求項 1 7 1】

前記スプライス修復鋳型が、前記 Q B e t a コートタンパク質に特異的に結合する Q B e t a ヘアピンを含む、請求項 1 6 3 ~ 1 6 7 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 1 7 2】

さらに細胞を含む、請求項 1 5 2 ~ 1 7 1 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 1 7 3】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分が、前記細胞内に導入される

50

、請求項 172 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 174】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の発現および/または活性が、一過性である、請求項 172 または 173 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 175】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性が、小分子によって調節される、請求項 174 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 176】

前記小分子が、アブシシン酸 (ABA)、ラパマイシン (またはラパログ)、FK506、サイクロスポリン A、FK1012、ジベレリン 3-AM、FKCsA、AP1903 / AP20187、およびオーキシンから選択される、請求項 175 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 177】

少なくとも一部分が、前記核酸結合タンパク質ドメインである、請求項 174 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 178】

前記核酸結合タンパク質ドメインはさらに、小分子結合ドメインを含む、請求項 177 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 179】

前記核酸結合タンパク質ドメインおよび前記小分子結合ドメインが、グリシン - セリンリンカーによって連結されている、請求項 178 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 180】

前記小分子結合ドメインが、ABA 結合ドメインである、請求項 178 または 179 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 181】

前記 ABA 結合ドメインが、ABI1 ポリペプチドを含む、請求項 180 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 182】

少なくとも一部分が、ウイルスタンパク質である、請求項 174 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 183】

前記ウイルスタンパク質がさらに、小分子結合ドメインを含む、請求項 182 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 184】

前記ウイルスタンパク質および前記小分子結合ドメインが、グリシン - セリンリンカーによって連結されている、請求項 182 または 183 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 185】

前記小分子結合ドメインが、ABA 結合ドメインである、請求項 184 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 186】

前記 ABA 結合ドメインが、PYL1 ポリペプチドを含む、請求項 185 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 187】

ABA の追加が、標的 pre-mRNA の標的化トランススプライシングを誘導する、請求項 186 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 188】

細胞への前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーが、ウ

10

20

30

40

50

イルス性である、請求項 172 ~ 187 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 189】

前記ウイルスが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、アネロウイルス、またはバキュロウイルスである、請求項 188 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 190】

細胞への前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーが、非ウイルス性である、請求項 172 ~ 187 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

10

【請求項 191】

前記非ウイルス性デリバリーシステムが、カチオン脂質媒体、電気穿孔法、リン酸カルシウムトランスフェクション、機械的なトランスフェクション、およびナノ粒子デリバリーから選択される、請求項 190 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 192】

前記核酸結合タンパク質ドメインが、DNA を標的にする、請求項 152 ~ 191 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 193】

前記核酸結合タンパク質ドメインが、RNA を標的にする、請求項 152 ~ 191 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

20

【請求項 194】

前記核酸結合タンパク質ドメインが、前記細胞における RNA と関連している、請求項 152 ~ 193 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 195】

前記 RNA が、pre-mRNA である、請求項 194 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 196】

前記核酸結合タンパク質ドメインが、前記細胞における DNA と関連している、請求項 152 ~ 192 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 197】

前記核酸結合タンパク質ドメインが、前記細胞における DNA と関連していない、請求項 152 ~ 192 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

30

【請求項 198】

前記細胞の核における pre-mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 152 ~ 197 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 199】

前記細胞の細胞質における pre-mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 152 ~ 197 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 200】

イントロン - エキソン接合部での pre-mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 198 または 199 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

40

【請求項 201】

前記核酸結合タンパク質ドメインが、エキソン - イントロン接合部での pre-mRNA のトランススプライシングを媒介する、請求項 198 または 199 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 202】

前記スプライス修復鑄型が、スプライスドナーを含まない、請求項 152 ~ 201 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 203】

前記スプライス修復鑄型が、スプライスアクセプターを含まない、請求項 152 ~ 20

50

1のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項204】

前記スプライス修復鋳型が、スプライサクセプターおよびスプライドナーの両方を含む、請求項152～201のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項205】

複数のスプライス鋳型を含む、請求項152～204のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項206】

前記複数のスプライス鋳型が、スプライサクセプターを含むスプライス修復鋳型およびスプライドナーを含むスプライス修復鋳型を含む、請求項152～205のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

10

【請求項207】

前記複数のスプライス修復鋳型のうちの少なくともいくつかは、スプライサクセプターおよびスプライドナーを含む、請求項206に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項208】

プレmRNAの5'末端での前記プレmRNAのトランススプライシングを媒介する、請求項152～207のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項209】

プレmRNAの3'末端での前記プレmRNAのトランススプライシングを媒介する、請求項152～207のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

20

【請求項210】

プレmRNA内の内部部位でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する、請求項152～207のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項211】

前記標的mRNAの5'末端または3'末端を置き換える、請求項152～210のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項212】

前記標的RNAが、プレmRNAである、請求項208～211のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

30

【請求項213】

前記標的mRNAの最初および最後のエキソンを除く、前記標的mRNAの1つまたは複数のエキソンを置き換えることを含む、請求項152～212のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項214】

前記核酸結合タンパク質ドメインが、3'非翻訳領域(UTR)内でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する、請求項152～213のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項215】

前記核酸結合タンパク質ドメインが、5'非翻訳領域(UTR)内でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する、請求項152～213のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

40

【請求項216】

前記トランススプライシングが、分裂細胞において生じる、請求項152～215のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項217】

前記トランススプライシングが、分裂終了細胞において生じる、請求項152～215のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項218】

50

前記分裂終了細胞が、ニューロン、筋細胞、または含脂肪細胞である、請求項 217 に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 219】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の発現が、誘導可能である、請求項 152 ~ 218 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 220】

前記トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性が、誘導可能である、請求項 152 ~ 218 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

【請求項 221】

前記核酸結合タンパク質ドメインが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) または P u m b y モジュール由来のドメインであるか、または RNA 認識モチーフである、請求項 152 ~ 220 のいずれか一項に記載の標的化トランススプライシングシステム。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2019年8月16日に出願された米国仮出願第62/888,210号および2020年3月5日に出願された米国仮出願第62/985,633号に対する優先権を主張するものであり、なお、当該仮出願のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

20

【0002】

連邦政府による支援を受けた研究に関する記述

本発明は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health: NIH) によって認められた認可番号 HL141005 の下において政府支援を受けて行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

配列表

本願は、ASCIIフォーマットにおいて電子的に提出された配列表を含んでおり、なお、配列表は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。2020年8月14日に作成された ASCII コピーは、706829\_083474-007PC\_ST25 .txt と命名され、475,491 バイトのサイズである。

30

【0004】

本開示は、疾患の治療のための核酸の CRISPR/Cas 媒介トランススプライシングの分野に関する。

【背景技術】

【0005】

トランススプライシングは、2つの異なる一次プレmRNA 転写物のエキソンが末端相互間で接合されリゲートされる、RNA プロセシングの形態である。このプロセスは、スプライソソームリボ核酸タンパク質複合体を使用する、様々な疾患を治療するための有望な戦略である。しかしながら、現在のシステムのトランススプライシングの効率および特異性は、より効果的な治療戦略を提供するために改良する必要がある。

40

【0006】

CRISPR/Cas システムは、疾患および障害を治療するために、ゲノム遺伝子座を編集するために使用されている。これは、DNA に対する永久的な編集につながる。本発明は、所望のプレmRNA 配列に対するトランススプライシング要素を標的にする CRISPR/Cas システムを提供し、ならびに、トランススプライシング事象の特異性および効率の両方を向上させつつ、一過性 RNA 修復のオプションを可能にする。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、細胞においてプレmRNA に対する標的化トランススプライシング事象を媒

50

介するための方法および組成物を提供する。一態様において、標的化トランススプライシングシステムは、核酸ターゲティングCRISPR/Casシステム；核酸ガイド；特異的RNA結合ドメイン；ならびにスプライドナーおよび/またはアクセプターおよび生理的条件下において特異的RNA結合ドメインにハイブリダイズするRNA配列を含む修復鋳型を含む。

【0008】

様々な実施形態において、核酸ガイドは、RNAガイドである。様々な実施形態において、核酸ガイドは、DNAガイドである。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムは、1つの核酸ガイドを含む。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムは、2つ以上の核酸ガイドを含む。様々な実施形態において、核酸ガイドは、複数の標的を認識する。様々な実施形態において、核酸ガイドは、スプライスアクセプター(SA)部位を標的にする。様々な実施形態において、核酸ガイドは、スプライドナー(SD)部位を標的にする。様々な実施形態において、核酸ガイドは、スプライス部位近くの領域を標的にする。様々な実施形態において、核酸ガイドは、スプライス部位の200ヌクレオチド内の領域を標的にする。様々な実施形態において、核酸ガイドは、スプライス部位から100ヌクレオチド以下の領域を標的にする。様々な実施形態において、2つ以上の核酸ガイドは、関心対象の1つの核酸を標的にする。様々な実施形態において、2つ以上の核酸ガイドは、関心対象の複数の核酸を標的にする。

10

【0009】

様々な実施形態において、CRISPR/Casシステムは、Cas13ポリペプチドを含む。様々な実施形態において、Cas13は、ヌクLEARゼ不活性Cas13ポリペプチド(dCas13)である。様々な実施形態において、Cas13は、ヌクLEARゼ活性Cas13ポリペプチドである。様々な実施形態において、特異的RNA結合ドメインは、ウイルスタンパク質を含む。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、MS2結合タンパク質である。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、Nタンパク質である。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、PP7コートタンパク質である。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、QBetaコートタンパク質である。

20

【0010】

様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、CRISPR/Casシステムに共有結合している。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、CRISPR/Casシステムに共有結合していない。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質およびCRISPR/Casシステムは、融合タンパク質である。

30

【0011】

一実施形態において、トランススプライシングシステムは、1つの修復鋳型を含む。一実施形態において、トランススプライシングシステムは、2つ以上の修復鋳型を含む。様々な実施形態において、修復鋳型は、DNAとして導入される。様々な実施形態において、修復鋳型は、RNAとしてデリバリーされる。

【0012】

様々な実施形態において、修復鋳型は、RNAとして発現される。様々な実施形態において、修復鋳型は、スプライスアクセプターを含む。様々な実施形態において、修復鋳型は、スプライドナーを含む。様々な実施形態において、修復鋳型は、1つまたは複数のスプライス部位を含む。様々な実施形態において、修復鋳型は、エキソンを含む。様々な実施形態において、修復鋳型は、2つ以上のエキソンを含む。様々な実施形態において、修復鋳型は、イントロンを含む。修復鋳型は、2つ以上のイントロンを含む。様々な実施形態において、修復鋳型は、関心対象の標的核酸にハイブリダイズする1つまたは複数の配列を含む。様々な実施形態において、修復鋳型の少なくとも一部分は、MS2結合タンパク質に特異的に結合するms2ヘアピンを含む。様々な実施形態において、修復鋳型は、Nタンパク質に特異的に結合するboxBヘアピンを含む。様々な実施形態において、修復鋳型は、PP7コートタンパク質に特異的に結合するPP7ヘアピンを含む。様々

40

50

な実施形態において、修復鋳型は、Q B e t a コートタンパク質に特異的に結合する Q B e t a ヘアピンを含む。

【0013】

様々な実施形態において、標的化トランススプライシングシステムはさらに、細胞を含む。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分は、細胞内に導入される。

【0014】

様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の発現および/または活性は、一過性である。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性は、小分子によって調節される。様々な実施形態において、小分子は、アブシシン酸 ( A B A )、ラパマイシン ( またはラパログ )、F K 5 0 6、サイクロスポリン A、F K 1 0 1 2、ジベレリン 3 - A M、F K C s A、A P 1 9 0 3 / A P 2 0 1 8 7、およびオーキシンから選択される。様々な実施形態において、少なくとも一部分は、C a s 1 3 タンパク質である。様々な実施形態において、C a s 1 3 タンパク質はさらに、小分子結合ドメインを含む。様々な実施形態において、C a s 1 3 タンパク質および小分子結合ドメインは、グリシン - セリンリンカーによって連結されている。様々な実施形態において、小分子結合ドメインは、A B A 結合ドメインである。様々な実施形態において、A B A 結合ドメインは、A B I 1 ポリペプチドを含む。

10

【0015】

様々な実施形態において、標的化トランススプライシングシステムはさらに、ウイルスタンパク質を含む。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質はさらに、小分子結合ドメインを含む。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質および小分子結合ドメインは、グリシン - セリンリンカーによって連結されている。様々な実施形態において、小分子結合ドメインは、A B A 結合ドメインである。様々な実施形態において、A B A 結合ドメインは、P Y L 1 ポリペプチドを含む。様々な実施形態において、A B A の追加は、標的プレmRNAの標的化トランススプライシングを誘導する。

20

【0016】

様々な実施形態において、細胞へのトランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーは、ウイルス性である。様々な実施形態において、ウイルスは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、アネロウイルス、またはバキュロウイルスである。様々な実施形態において、細胞へのトランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーは、非ウイルス性である。様々な実施形態において、非ウイルス性デリバリーシステムは、カチオン脂質媒体、電気穿孔法、リン酸カルシウムトランスフェクション、機械的なトランスフェクション、およびナノ粒子デリバリーから選択される。

30

【0017】

様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、核酸を標的にする。様々な実施形態において、核酸はRNAである。様々な実施形態において、核酸はDNAである。様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、細胞のRNAと関連している。様々な実施形態において、RNAは、プレmRNAである。様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、細胞のDNAと関連している。様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、細胞のDNAと関連していない。様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、細胞の核におけるプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、細胞の細胞質におけるプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。

40

【0018】

様々な実施形態において、トランススプライシングは、分裂細胞において生じる。様々な実施形態において、トランススプライシングは、分裂終了細胞において生じる。様々な実施形態において、分裂終了細胞は、ニューロン、筋細胞、または含脂肪細胞である。

【0019】

50

様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の発現は、誘導可能である。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性は、誘導可能である。

【0020】

別の態様において、細胞においてプレmRNAに対する標的化トランススプライシング事象を媒介する方法であって、標的化トランススプライシングCRISPR/Casシステムの少なくとも一部分を細胞に導入することを含む方法が、本明細書において提供される。一態様において、CRISPR/Casシステムは、核酸ターゲティングCRISPR/Casシステム；関心対象の核酸遺伝子座に特異的にハイブリダイズする核酸ガイド；特異的RNA結合ドメイン；ならびにスプライスドナーおよび/またはスプライスアクセプターおよび生理的条件下において特異的RNA結合ドメインにハイブリダイズするRNA配列を含む修復鋳型を含む。

10

【0021】

一実施形態において、核酸ガイドは、RNAを含む。別の実施形態において、核酸ガイドは、DNAを含む。

【0022】

一実施形態において、単一の核酸ガイドが、細胞に導入される。別の実施形態において、複数の核酸ガイドが、細胞に導入される。

【0023】

一実施形態において、複数の核酸ガイドは、関心対象の1つの核酸を標的にする。別の実施形態において、複数の核酸ガイドは、関心対象の2つ以上の核酸を標的にする。

20

【0024】

様々な実施形態において、核酸ガイドは、スプライスアクセプター(SA)部位を標的にする。他の実施形態において、核酸ガイドは、スプライスドナー(SD)部位を標的にする。

【0025】

様々な実施形態において、核酸ガイドは、スプライス部位近くの領域を標的にする。

【0026】

様々な実施形態において、核酸ガイドは、スプライス部位の200ヌクレオチド内の領域を標的にする。他の実施形態において、核酸ガイドは、スプライス部位から100ヌクレオチド以下の領域を標的にする。

30

【0027】

様々な実施形態において、複数の核酸ガイドが、複数の細胞にデリバリーされる。様々な実施形態において、CRISPR/Casシステムは、Cas13ポリペプチドを含む。

【0028】

様々な実施形態において、Cas13ポリペプチドは、Cas13bポリペプチドである。様々な実施形態において、Cas13bポリペプチドは、ヌクレアーゼ不活性Cas13b(dCas13b)である。様々な実施形態において、Cas13bポリペプチドは、ヌクレアーゼ活性Cas13bである。

40

【0029】

様々な実施形態において、特異的RNA結合ドメインは、ウイルスタンパク質を含む。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、MS2結合タンパク質である。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、Nタンパク質である。

【0030】

様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、PP7コートタンパク質である。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、QBetaコートタンパク質である。

【0031】

様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、CRISPR/Casシステムに共有結合している。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、CRISPR/Ca

50

s システムに共有結合していない。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質および C R I S P R / C a s システムは、融合タンパク質である。

【 0 0 3 2 】

様々な実施形態において、トランススプライシングシステムは、1つのスプライスアクセプター修復鋳型を含む。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムは、2つ以上のスプライスアクセプター修復鋳型を含む。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムは、1つのスプライドナー修復鋳型を含む。

【 0 0 3 3 】

様々な実施形態において、トランススプライシングシステムは、2つ以上のスプライドナー修復鋳型を含む。

【 0 0 3 4 】

様々な実施形態において、修復鋳型は、M S 2 結合タンパク質に特異的に結合する m s 2 ヘアピンを含む。様々な実施形態において、修復鋳型は、N タンパク質に特異的に結合する b o x B ヘアピンを含む。

【 0 0 3 5 】

様々な実施形態において、修復鋳型は、P P 7 コートタンパク質に特異的に結合する P P 7 ヘアピンを含む。様々な実施形態において、修復鋳型は、Q B e t a コートタンパク質に特異的に結合する Q B e t a ヘアピンを含む。

【 0 0 3 6 】

様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の発現は、一過性である。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性は、一過性である。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性は、小分子によって調節される。様々な実施形態において、小分子は、アブシシン酸 ( A B A )、ラパマイシン ( またはラパログ )、F K 5 0 6、サイクロスポリン A、F K 1 0 1 2、ジベレリン 3 - A M、F K C s A、A P 1 9 0 3 / A P 2 0 1 8 7、およびオーキシンから選択される。

【 0 0 3 7 】

様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分は、C a s 1 3 ポリペプチドを含む。様々な実施形態において、C a s 1 3 ポリペプチドはさらに、小分子結合ドメインを含む。

【 0 0 3 8 】

様々な実施形態において、C a s 1 3 ポリペプチドおよび小分子結合ドメインは、グリシン - セリンリンカーによって連結されている。様々な実施形態において、小分子結合ドメインは、A B A 結合ドメインである。

【 0 0 3 9 】

様々な実施形態において、A B A 結合ドメインは、A B I 1 ポリペプチドを含む。様々な実施形態において、方法はさらに、ウイルスタンパク質を含む。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質はさらに、小分子結合ドメインを含む。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質および小分子結合ドメインは、グリシン - セリンリンカーによって連結されている。

【 0 0 4 0 】

様々な実施形態において、小分子結合ドメインは、A B A 結合ドメインである。

【 0 0 4 1 】

様々な実施形態において、A B A 結合ドメインは、P Y L 1 ポリペプチドを含む。

【 0 0 4 2 】

様々な実施形態において、A B A の追加は、標的プレ m R N A の標的化トランススプライシングを誘導する。

【 0 0 4 3 】

様々な実施形態において、細胞へのトランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーは、ウイルス性である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

様々な実施形態において、ウイルスは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、アネロウイルス、またはバキュロウイルスである。

## 【 0 0 4 5 】

様々な実施形態において、細胞へのトランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーは、非ウイルス性である。

## 【 0 0 4 6 】

様々な実施形態において、非ウイルス性デリバリーシステムは、カチオン脂質媒体、電気穿孔法、リン酸カルシウムトランスフェクション、機械的なトランスフェクション、およびナノ粒子デリバリーから選択される。

10

## 【 0 0 4 7 】

様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、細胞の R N A と関連する。

## 【 0 0 4 8 】

様々な実施形態において、R N A は、プレm R N A である。

## 【 0 0 4 9 】

様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、細胞の D N A と関連する。

## 【 0 0 5 0 】

様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、細胞の D N A と関連しない。

20

## 【 0 0 5 1 】

様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、細胞の核におけるプレm R N A のトランススプライシングを媒介する。

## 【 0 0 5 2 】

様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、細胞の細胞質におけるプレm R N A のトランススプライシングを媒介する。

## 【 0 0 5 3 】

様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、イントロン - エキソン接合部でのプレm R N A のトランススプライシングを媒介する。

30

## 【 0 0 5 4 】

様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、エキソン - イントロン接合部でのプレm R N A のトランススプライシングを媒介する。

## 【 0 0 5 5 】

様々な実施形態において、スプライス修復鑄型は、スプライスアクセプターを含まない。

## 【 0 0 5 6 】

様々な実施形態において、スプライス修復鑄型は、スプライスドナーを含まない。

## 【 0 0 5 7 】

様々な実施形態において、スプライス修復鑄型は、スプライスアクセプターおよびスプライスドナーの両方を含む。

40

## 【 0 0 5 8 】

様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、プレm R N A の 5 ' 末端でのプレm R N A のトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、プレm R N A の 3 ' 末端でのプレm R N A のトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、プレm R N A 内の内部部位でのプレm R N A のトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、3 ' 非翻訳領域 ( U T R ) 内でのプレm R N A のトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、C R I S P R / C a s システムは、5 ' 非翻訳領域 ( U T R ) 内でのプレm R N A のトランススプ

50

ライシングを媒介する。

【0059】

様々な実施形態において、細胞は、分裂細胞である。様々な実施形態において、細胞は、分裂終了細胞である。

【0060】

様々な実施形態において、分裂終了細胞は、ニューロン、筋細胞、および脂肪細胞からなる群から選択される。

【0061】

様々な実施形態において、トランスプライシングシステムの少なくとも一部分の発現は、誘導可能である。

【0062】

様々な実施形態において、トランスプライシングシステムの少なくとも一部分の活性は、誘導可能である。

【0063】

様々な実施形態において、細胞は、疾患または障害を患う対象に存する。

【0064】

様々な実施形態において、疾患または障害は、神経変性の、神経学的な、または神経筋の疾患または障害である。

【0065】

様々な実施形態において、神経変性の、神経学的な、または神経筋の疾患または障害は、脊髄筋萎縮症、レット症候群、アンジェルマン症候群、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、前頭側頭認知症、リソソーム蓄積症、多発性硬化症、および筋萎縮性側索硬化症（ALS）からなる群から選択される。

【0066】

さらなる別の態様において、核酸結合タンパク質ドメイン；特異的RNA結合ドメイン；ならびにスプライドナーおよび/またはスプライサクセプターおよびストリンジェントな条件下において特異的RNA結合ドメインにハイブリダイズするRNA配列を含む修復鋳型を含む標的化トランスプライシングシステムが本明細書において開示される。

【0067】

様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、スプライサクセプター（SA）部位を標的にする。様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、スプライドナー（SD）部位を標的にする。様々な実施形態において、特異的RNA結合ドメインは、ウイルスタンパク質を含む。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、MS2結合タンパク質である。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、Nタンパク質である。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、PP7コートタンパク質である。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、Qbetaコートタンパク質である。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、核酸結合タンパク質ドメインに共有結合している。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、核酸結合タンパク質ドメインに共有結合していない。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質および核酸結合タンパク質ドメインは、融合タンパク質である。

【0068】

様々な実施形態において、トランスプライシングシステムは、1つのスプライサクセプター修復鋳型を含む。様々な実施形態において、トランスプライシングシステムは、2つ以上のスプライサクセプター修復鋳型を含む。様々な実施形態において、トランスプライシングシステムは、1つのスプライドナー修復鋳型を含む。様々な実施形態において、トランスプライシングシステムは、2つ以上のスプライドナー修復鋳型を含む。様々な実施形態において、トランスプライシングシステムは、スプライドナーおよび/またはスプライサクセプターを含む修復鋳型を含む。様々な実施形態において、修復鋳型の少なくとも一部分は、MS2結合タンパク質に特異的に結合するms2ヘアピンを含む。様々な実施形態において、スプライス修復鋳型は、Nタンパク質に特異的

10

20

30

40

50

に結合する b o x B ヘアピンを含む。様々な実施形態において、スプライス修復鋳型は、P P 7 コートタンパク質に特異的に結合する P P 7 ヘアピンを含む。様々な実施形態において、スプライス修復鋳型は、Q B e t a コートタンパク質に特異的に結合する Q B e t a ヘアピンを含む。

【 0 0 6 9 】

様々な実施形態において、標的化トランススプライシングシステムはさらに、細胞を含む。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分は、細胞内に導入される。

【 0 0 7 0 】

様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の発現および/または活性は、一過性である。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性は、小分子によって調節される。様々な実施形態において、小分子は、アブシシン酸 ( A B A )、ラパマイシン ( またはラパログ )、F K 5 0 6、サイクロスポリン A、F K 1 0 1 2、ジベレリン 3 - A M、F K C s A、A P 1 9 0 3 / A P 2 0 1 8 7、およびオーキシンから選択される。様々な実施形態において、少なくとも一部分は、核酸結合タンパク質ドメインである。様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインはさらに、小分子結合ドメインを含む。様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインおよび小分子結合ドメインは、グリシン - セリンリンカーによって連結されている。様々な実施形態において、小分子結合ドメインは、A B A 結合ドメインである。様々な実施形態において、A B A 結合ドメインは、A B I 1 ポリペプチドを含む。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムはさらに、ウイルスタンパク質を含む。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質は、さらに、小分子結合ドメインを含む。様々な実施形態において、ウイルスタンパク質および小分子結合ドメインは、グリシン - セリンリンカーによって連結されている。様々な実施形態において、小分子結合ドメインは、A B A 結合ドメインである。様々な実施形態において、A B A 結合ドメインは、P Y L 1 ポリペプチドを含む。様々な実施形態において、A B A の追加は、標的プレ m R N A の標的化トランススプライシングを誘導する。

【 0 0 7 1 】

様々な実施形態において、細胞へのトランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーは、ウイルス性である。様々な実施形態において、ウイルスは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、アネロウイルス、またはバキュロウイルスである。様々な実施形態において、細胞へのトランススプライシングシステムの少なくとも一部分のデリバリーは、非ウイルス性である。様々な実施形態において、非ウイルス性デリバリーシステムは、カチオン脂質媒体、電気穿孔法、リン酸カルシウムトランスフェクション、機械的なトランスフェクション、およびナノ粒子デリバリーから選択される。

【 0 0 7 2 】

様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、D N A を標的にする。様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、R N A を標的にする。様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、細胞における R N A と関連している。様々な実施形態において、R N A は、プレ m R N A である。様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、細胞における D N A と関連している。様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、細胞における D N A と関連していない。

【 0 0 7 3 】

様々な実施形態において、システムは、細胞の核におけるプレ m R N A のトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、システムは、細胞の細胞質におけるプレ m R N A のトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、システムは、イントロン - エキソン接合部でのプレ m R N A のトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、エキソン - イントロン接合部でのプレ m R N A のトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、スプ

10

20

30

40

50

ライス修復鑄型は、スプライドナーを含まない。様々な実施形態において、スプライス修復鑄型は、スプライアクセプターを含まない。様々な実施形態において、スプライス修復鑄型は、スプライアクセプターおよびスプライドナーの両方を含む。

【0074】

様々な実施形態において、システムは、複数のスプライス鑄型を含む。様々な実施形態において、複数のスプライス鑄型は、スプライアクセプターを含むスプライス修復鑄型およびスプライドナーを含むスプライス修復鑄型を含む。様々な実施形態において、複数のスプライス修復鑄型のうちの少なくともいくつかは、スプライアクセプターおよびスプライドナーを含む。

【0075】

様々な実施形態において、システムは、プレmRNAの5'末端でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、システムは、プレmRNAの3'末端でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、システムは、プレmRNA内の内部部位でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、システムは、標的mRNAの5'末端または3'末端を置き換える。

【0076】

様々な実施形態において、標的mRNAは、プレmRNAである。様々な実施形態において、システムは、標的mRNAの最初および最後のエキソンを除く、標的mRNAの1つまたは複数のエキソンを置き換えることを含む。様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、3'非翻訳領域(UTR)内でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、5'非翻訳領域(UTR)内でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。

【0077】

様々な実施形態において、トランススプライシングは、分裂細胞において生じる。様々な実施形態において、トランススプライシングは、分裂終了細胞において生じる。様々な実施形態において、分裂終了細胞は、ニューロン、筋細胞、または含脂肪細胞である。

【0078】

様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の発現は、誘導可能である。様々な実施形態において、トランススプライシングシステムの少なくとも一部分の活性は、誘導可能である。様々な実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)またはPumbyモジュール由来のドメインであるか、またはRNA認識モチーフである。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】図1A~Eは、CRISPR/Casシステムの構成要素、プレmRNA内において生じ得るシススプライシングおよびトランススプライシング、ならびにCRISPR媒介トランススプライシングを示す。

【図2】図2Aは、エンドリボヌクレアーゼ不活性Cas13(dCas13b)-MS2融合タンパク質をコードするDNAコンストラクト、gRNAコンストラクト、スプライドナー(SD)およびスプライアクセプター(SA)レポーター、ならびにms2イントロン設計を示す。図2Bは、トランススプライシングレポーターアッセイを示す。

【図3A】図3Aは、HEK193FT細胞でのネガティブコントロールと比較したCRISPR/Casシステムのトランススプライシング活性を示す。列1~5は、ネガティブコントロールの活性を表す。列11は、CRISPR/Casシステムの活性である。

【図3B】図3Bは、CRISPR/Casシステムのトランススプライシング特異性を示す。RNAseqライブラリーは、SAレポーターmRNAに結合するプライマーを使用して作製され、リードのオンターゲット反応を算出してプロットした。

【図4】図4Aは、トランススプライシングを実証するためのRNAseqライブラリーのRNAseqマッピングである。図4Bは、SDレポーターのシススプライシングが存

10

20

30

40

50

在したことの検証を示す。

【図5】図5は、gRNA標的部位の概略図である。いくつかのgRNAは、SDレポーターにおける異なる領域を標的にするように設計された。

【図6A】図6Aは、トランケートされたGFPのトランススプライシングレポーターアッセイを使用して測定した、dCas13b-MS2による標的化トランススプライシングの増加倍率を示す。

【図6B】図6Bは、dCas13b-MS2なしでの標的化トランススプライシングを示す。

【図7】図7は、病原性エキソンの修正との関連での、トランススプライシングにおけるCRISPR/Casシステムの構成要素を示す概略図である。

【図8A】図8は、小分子によるトランススプライシング複合体の誘導を示す。図8Aは、アブシシン酸(ABA)-結合タンパク質ABI1に融合したdCas13bポリペプチド、およびPYL1に融合したMS2を示す。図8Bは、ネガティブコントロールとしてのガイドコントロールなしで示された、様々なABA濃度の存在下でのトランススプライシングの誘導後のGFPの発現を実証するグラフである。図8Cは、ABA(mM)の濃度の増加によるGFPの発現の増加倍率を測定することにより、ABAが、誘導された標的化トランススプライシングを制御することができたことを実証する。

【図8B】図8は、小分子によるトランススプライシング複合体の誘導を示す。図8Aは、アブシシン酸(ABA)-結合タンパク質ABI1に融合したdCas13bポリペプチド、およびPYL1に融合したMS2を示す。図8Bは、ネガティブコントロールとしてのガイドコントロールなしで示された、様々なABA濃度の存在下でのトランススプライシングの誘導後のGFPの発現を実証するグラフである。図8Cは、ABA(mM)の濃度の増加によるGFPの発現の増加倍率を測定することにより、ABAが、誘導された標的化トランススプライシングを制御することができたことを実証する。

【図8C】図8は、小分子によるトランススプライシング複合体の誘導を示す。図8Aは、アブシシン酸(ABA)-結合タンパク質ABI1に融合したdCas13bポリペプチド、およびPYL1に融合したMS2を示す。図8Bは、ネガティブコントロールとしてのガイドコントロールなしで示された、様々なABA濃度の存在下でのトランススプライシングの誘導後のGFPの発現を実証するグラフである。図8Cは、ABA(mM)の濃度の増加によるGFPの発現の増加倍率を測定することにより、ABAが、誘導された標的化トランススプライシングを制御することができたことを実証する。

【図9A】図9は、スプライス接合部でのトランススプライシングの測定である。図9Aは、可能な接合部をスパニングするRNAseqリードを示す。図9Bは、全てのトランスフェクション条件に対してトランススプライシングされた、スプライスされたリードのプロットである。図9Cは、全てのトランスフェクション条件に対してシススプライシングされた、スプライスされたリードのプロットである。

【図9B】図9は、スプライス接合部でのトランススプライシングの測定である。図9Aは、可能な接合部をスパニングするRNAseqリードを示す。図9Bは、全てのトランスフェクション条件に対してトランススプライシングされた、スプライスされたリードのプロットである。図9Cは、全てのトランスフェクション条件に対してシススプライシングされた、スプライスされたリードのプロットである。

【図9C】図9は、スプライス接合部でのトランススプライシングの測定である。図9Aは、可能な接合部をスパニングするRNAseqリードを示す。図9Bは、全てのトランスフェクション条件に対してトランススプライシングされた、スプライスされたリードのプロットである。図9Cは、全てのトランスフェクション条件に対してシススプライシングされた、スプライスされたリードのプロットである。

【図10A】図10は、標的化トランススプライシングのための戦略の図である。図10Aは、トランススプライシングの5'ターゲティングのための戦略を示す。図10Bは、内部標的化トランススプライシング戦略を示す。図10Cは、トランススプライシングの3'ターゲティングのための戦略を示す。

10

20

30

40

50

【図10B】図10は、標的化トランススプライシングのための戦略の図である。図10Aは、トランススプライシングの5'ターゲティングのための戦略を示す。図10Bは、内部標的化トランススプライシング戦略を示す。図10Cは、トランススプライシングの3'ターゲティングのための戦略を示す。

【図10C】図10は、標的化トランススプライシングのための戦略の図である。図10Aは、トランススプライシングの5'ターゲティングのための戦略を示す。図10Bは、内部標的化トランススプライシング戦略を示す。図10Cは、トランススプライシングの3'ターゲティングのための戦略を示す。

【図11A】図11は、内部エキソン修復のための戦略を示す。図11Aは、CRISPR媒介内部エキソン修復が可能であるかどうかを試験するための、dPspCas13b-MS2、gRNA、標的、および内部修復鋳型コンストラクトを示す。図11Bは、青色蛍光タンパク質(BFP)の発現を介した標的転写物の発現のモニタリング、および緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現を介した内部エキソン修復のモニタリングを示す。図11Cは、内部エキソン修復の後のGFP発現を測定しており、それは、GFP発現が、スプライス部位をターゲティングするgRNAを伴うCRISPRシステムの存在下においてのみ可能であることを実証するものである。

【図11B】図11は、内部エキソン修復のための戦略を示す。図11Aは、CRISPR媒介内部エキソン修復が可能であるかどうかを試験するための、dPspCas13b-MS2、gRNA、標的、および内部修復鋳型コンストラクトを示す。図11Bは、青色蛍光タンパク質(BFP)の発現を介した標的転写物の発現のモニタリング、および緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現を介した内部エキソン修復のモニタリングを示す。図11Cは、内部エキソン修復の後のGFP発現を測定しており、それは、GFP発現が、スプライス部位をターゲティングするgRNAを伴うCRISPRシステムの存在下においてのみ可能であることを実証するものである。

【図11C】図11は、内部エキソン修復のための戦略を示す。図11Aは、CRISPR媒介内部エキソン修復が可能であるかどうかを試験するための、dPspCas13b-MS2、gRNA、標的、および内部修復鋳型コンストラクトを示す。図11Bは、青色蛍光タンパク質(BFP)の発現を介した標的転写物の発現のモニタリング、および緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現を介した内部エキソン修復のモニタリングを示す。図11Cは、内部エキソン修復の後のGFP発現を測定しており、それは、GFP発現が、スプライス部位をターゲティングするgRNAを伴うCRISPRシステムの存在下においてのみ可能であることを実証するものである。

【図12】図12は、他のCas13オーソログ、例えば、Cas13dなど、を使用してトランススプライシングを媒介することができることを示すための蛍光測定である。

【図13】図13は、マルチベクターAAVベースのアプローチによってデリバリーされるコンストラクトによって達成されるCRISPR媒介トランススプライシングを実証する。

【発明を実施するための形態】

【0080】

この開示は、細胞におけるプレmRNAに対する標的化トランススプライシング事象を媒介するための組成物およびこれらの組成物を使用する方法を提供する。様々な実施形態において、標的化トランススプライシング事象は、CRISPR/Casシステムによって媒介される。様々な実施形態において、標的化トランススプライシング事象を媒介するCRISPR/Casシステムは、神経変性疾患または障害を治療するために使用される。これらの組成物および方法は、ヌクレアーゼ不活性Cas13を含むCRISPR/Casシステムによって媒介されるトランススプライシング事象を含む。

【0081】

特許請求の範囲、本明細書の発明の概要および発明を実施するための形態内において使用される場合、用語「a」または「an」を伴う名詞は、その名詞が1つまたは複数であることを意味し；例えば、「細胞(acell)」は、1つまたは複数の細胞を表すと

10

20

30

40

50

理解される。

【0082】

その上、本明細書において使用される場合、「および/または」は、他方を伴うかまたは伴わない、構成要素の2つの指定された特徴のそれぞれの特定の開示として理解される。したがって、用語「および/または」は、本明細書において「Aおよび/またはB」のような語句において使用される場合、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」(のみ)、および「B」(のみ)を包含することが意図される。

【0083】

態様が、言語「含む (comprising)」によって本明細書において説明される場合、「からなる」の用語において説明される別の類似の態様も提供されることは理解されるべきである。

10

【0084】

用語「スプライス部位の近く」は、スプライス部位の500bp以内を意味する。

【0085】

用語「治療」は、疾患の改善のために使用される1つまたは複数の特定の手順の適用を意味する。ある特定の実施形態において、特定の手順は、1つまたは複数の医薬品の投与である。個体(例えば、ヒトなどの哺乳動物)または細胞の「治療」は、個体または細胞の自然経過を変更する試みにおいて使用される任意のタイプの介入である。治療としては、これらに限定されるわけではないが、医薬組成物の投与が挙げられ、予防的に、あるいは病理学的事象の開始または病原体との接触に続いて、実施され得る。治療は、疾患または状態の症状または病理に対する任意の望ましい効果を含み、ならびに、例えば、疾患または状態の1つまたは複数の測定可能なマーカーにおける微小な変化または改善を含み得、ならびに、例えば、治療されている疾患または状態の1つまたは複数の測定可能なマーカーにおける微小な変化または改善を含み得る。

20

【0086】

用語「患者」、「対象」、「個体」などは、本明細書において相互互換的に使用され、インビトロ (in vitro) またはインサイチューにかかわりなく、本明細書において説明される方法に適している任意の動物またはそれらの細胞を意味する。ある特定の非限定的な実施形態において、患者、対象、または個体は、ヒトである。

【0087】

本発明の態様において、用語「ガイド核酸」、「RNAガイド」、「DNAガイド」、および「単一のガイド核酸」は、相互互換的に使用され、ガイド配列を含むポリヌクレオチド配列、およびトレーサー配列を意味する。ある特定の実施形態において、ガイド核酸は、crisprRNA (crRNA) のみを含む。用語「ガイド配列」は、標的部位を指定するRNAまたはDNAガイド内の10~80bpの配列を意味する。本発明の態様において、用語「ガイド配列」および「スペーサー」は、相互互換的に使用される。本発明の態様において、用語「ダイレクトリポート」および「足場 (scaffold)」は、相互互換的に使用される。

30

【0088】

本明細書において使用される場合、ハイブリダイゼーションに対する「ストリンジェントな条件」は、標的配列に対して相補性を有する核酸が、支配的に標的配列とハイブリダイズし、非標的配列とは実質的にハイブリダイズしないような条件を意味する。ストリンジェントな条件は、概して配列依存性であり、ならびにいくつかの因子に応じて変わる。概して、配列が長ければ長いほど、配列がその標的配列に特異的にハイブリダイズする温度はより高くなる。いくつかの実施形態において、ストリンジェントな条件は、約45での6倍塩化ナトリウム/クエン酸 (SSC) におけるハイブリダイゼーションと、その後の50~65での0.2倍SSC、0.1% SDSでの1回または数回の洗浄を含む。ストリンジェントな条件の他の例は、当業者に既知であり、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al, eds., John Wiley & Sons, Inc. (1995), sections 2, 4, and 6に見出すことができ、なお、文献の教示は、参照により本明細

40

50

書に組み入れられる。さらなるストリンジェントな条件は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), chapters 7, 9, and 11に見出すことができ、なお、文献の教示は、参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0089】

本明細書において使用される場合、用語「生理的条件」は、典型的には、動物、詳細には哺乳動物、より詳細にはヒト、に対して有効な生物学的パラメーターを意味する。当該用語は、哺乳動物、とりわけヒトの身体（とりわけ、体液）において一般的に見出される生物化学的および生物物理的パラメーターに関連し得る。「生理的条件」は、病気の哺乳動物またはヒト患者において見出されるパラメーター、ならびに健康体において見出される対応するパラメーターに関連し得る。例えば、病気の哺乳動物またはヒト患者は、哺乳動物またはヒトが発熱病を患っている場合、高い「生理的」な温度条件を有し得る。「生理的条件」に関連して、最も重要なパラメーターは、温度（人体の場合は37℃）、pH（ヒトの血液の場合は7.35～7.45）、浸透圧（280～300 mmol / Kg H<sub>2</sub>O）、および、必要であれば、タンパク質含有量（66～85 g / 1血清）である。しかしながら、当業者は、これらのパラメーターが変わり得ることを理解しているであろう。例えば、そのような温度、pH、浸透圧、およびタンパク質含有量は、所定の身体または組織、例えば、血液または脳脊髄液など、において異なり得る（Klinke (2005) Physiologie, 5th ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart）。「生理的条件」は、動物における条件を模倣した、緩衝液系、溶媒、および/または賦形剤における条件も意味することができる。

10

20

#### 【0090】

「ハイブリダイゼーション」および「ハイブリダイズする」は、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基の間の水素結合によって安定化される複合体を形成する反応を意味する。水素結合は、ワトソン-クリック塩基対形成、フーグスティーン結合、または任意の他の配列特異的な方法によって生じ得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2本の鎖、多重鎖複合体を形成する3本以上の鎖、自己ハイブリダイゼーションする1本の鎖、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。

#### 【0091】

本明細書において使用される場合、「発現」は、ポリヌクレオチドがDNA鋳型から（例えば、mRNAまたは他のRNA転写物へ）転写されるプロセス、および/または転写されたmRNAが、その後ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質へと翻訳されるプロセスを意味する。転写物およびコードされたポリペプチドは、総称として「遺伝子産物」と呼ばれ得る。ポリヌクレオチドがゲノムDNAから得られる場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含み得る。

30

#### 【0092】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」、および「酵素」は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを意味するために、本明細書において相互互換的に使用される。ポリマーは、直鎖状または分岐鎖状であり得、それは、修飾されたアミノ酸を含み得、ならびに、非アミノ酸によって割り込まれ得る。当該用語は、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸エステル化、または任意の他の操作、例えば、ラベリング成分とのコンジュゲーション、など、修飾されているアミノ酸ポリマーも包含する。本明細書に使用される場合、用語「アミノ酸」は、天然および/または非天然または合成アミノ酸、例えば、グリシンおよびD体またはL体の両方の光学異性体、ならびにアミノ酸類似体およびペプチドミメティックスなど、を包含する。

40

#### 【0093】

用語「核酸」または「核酸配列」は、一本鎖または二本鎖形態のどちらかのデオキシリボ核酸またはリボ核酸オリゴヌクレオチドを意味する。当該用語は、核酸、すなわち、天然のヌクレオチドの既知のアナログを含むオリゴヌクレオチド、を包含する。当該用語は、合成骨格を有する核酸様構造体も包含し、例えば、Eckstein, Biomed Biochim Ac

50

ta. 1991;50(10-11):S114-7; Baserga et al Genes Dev. 1992 Jun;6(6): 1120-30; Milligan et al, Nucleic Acids Res. 1993 Jan 25;21(2):327-33; WO 97 / 03211; WO 96 / 39154; Mata, Toxicol Appl Pharmacol. 1997 May;144(1):189-97; Strauss-Soukup, Biochemistry. 1997 Aug 19;36(33):10026-32;およびSamstag, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1996 Fall;6(3): 153-6を参照されたい。

【0094】

「誘導可能な (Inducible)」は、本明細書において使用される場合、タンパク質またはシステム、例えば、本願のトランススプライシングシステムなど、の発現または活性を誘導することを意味する。既知の誘導可能な遺伝子発現システムは、挿入された核酸配列の化学的に誘導された活性化を可能にするように設計されており、結果として遺伝子の過剰発現または抑制を生じる。タンパク質またはシステムの活性を誘導することは、タンパク質またはシステムの活性を誘導するエフェクター分子の活性または追加を可能にする分子の放出を含むことができる。

10

【0095】

用語「ヌクレアーゼ不活性」は、もはやヌクレアーゼ活性を有さないCas酵素を説明するために使用される。いくつかの実施形態において、もはやヌクレアーゼ活性を有さないCas酵素は、少量の残留活性を有し得る。いくつかの実施形態において、この少量の残留活性は、Cas酵素の野生型ヌクレアーゼ活性の5%未満、1%未満、0.1%未満、0.05%未満、0.01%未満、または0.005%未満である。ヌクレアーゼ不活性Casタンパク質は、相互互換的に、「dCas」タンパク質、例えば、dCas13bなど、と呼ばれ得る。いくつかの実施形態において、dCasタンパク質は、dCas13bタンパク質であり得る。いくつかの実施形態において、配列番号1、62、71、74、77、80、83、86、または89において説明されるポリヌクレオチド配列は、dCas13bタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、dCas13bは、配列番号2、63、72、75、78、81、84、87、または90として説明されるアミノ酸配列に対応するか、またはその一部もしくは全体を含む。いくつかの実施形態において、dCasタンパク質は、dCas13aタンパク質であり得る。いくつかの実施形態において、dCas13aタンパク質は、配列番号17、20、23、26、29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、または59のいずれか1つにおいて説明されるポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、dCas13aは、配列番号18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、または60として説明されるアミノ酸配列のいずれか1つに対応するか、またはその一部もしくは全体を含む。いくつかの実施形態において、dCasタンパク質は、dCas13dタンパク質であり得る。いくつかの実施形態において、dCas13dタンパク質は、配列番号65において説明されるポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、dCas13dタンパク質は、配列番号66において説明されるアミノ酸配列に対応するか、またはその一部もしくは全体を含む。ヌクレアーゼ不活性Casタンパク質は、結果として不活性化されたヌクレアーゼ活性を生じる突然変異を有する変異体であり得る。

20

30

40

【0096】

「標的化 (targeted)」は、関心対象の特定のプレmRNAと関連している1つまたは複数の標的に特異的に結合するターゲティング部分を含む分子、タンパク質、または複合体を説明するために使用される。

【0097】

本明細書において使用される場合、用語「RNA結合 (RNA-binding)」は、RNAに特異的に結合する分子、タンパク質、核酸、または複合体を説明するために使用される。

【0098】

「プレmRNA」は、前駆体mRNAを意味し、エキソンおよびイントロンの両方を含

50

むRNAである。プレmRNAは、プロセッシング後にメッセンジャーRNAになる一次転写物のタイプである。それは、転写によって細胞核においてDNA鋳型から合成される。いくつかの実施形態において、RNAは、哺乳動物細胞に由来する。他の実施形態において、RNAは、哺乳動物細胞のミトコンドリアに由来する。

【0099】

語句「DNAと関連する」は、核酸、システム、タンパク質、および分子がDNAに結合し得るかまたはDNAと同じ近傍に存在し得ることを意味する。

【0100】

用語「分裂終了 (post-mitotic)」は、非複製細胞、例えば、神経系の細胞、骨髄細胞、筋肉細胞、肝臓細胞、および同様のものを意味する。神経系の細胞は、もはや有糸分裂を受けることのない、ニューロン、グリア細胞などを含む。

10

【0101】

用語「非分裂細胞」は、頻繁には有糸分裂を受けない細胞を意味する。多くの非分裂細胞は、細胞の大部分が活発に分裂していない限り、細胞周期の任意の時点 (例えば、G0/G1、G1/S、G2/M) でブロックされ得る。いくつかの実施形態において、非分裂細胞は、頻繁には分裂しないタイプの組織に由来する。身体における非分裂細胞の例としては、これらに限定されるわけではないが、神経細胞、筋肉 (筋細胞)、肝臓、皮膚、心臓、肺、脂肪、および骨髄細胞、ならびにそれらの誘導体が挙げられる。「分裂細胞」は、頻繁に、活発に有糸分裂を受ける細胞であろう。いくつかの実施形態において、分裂細胞は、頻繁には分裂しないタイプの組織に由来する。身体における分裂細胞の例としては、これらに限定されるわけではないが、上皮細胞および造血細胞が挙げられる。

20

【0102】

「疾患」は、動物が恒常性を維持できず、疾患が改善されない場合、動物の健康は悪化し続けるような、動物の健康状態である。対照的に、動物における「障害」は、動物は恒常性を維持することができるが、動物の健康状態は、障害がないときよりも好ましくないような、健康状態である。治療しないままでも、障害は、必ずしも動物の健康状態のさらなる低下を引き起こすわけではない。疾患および障害としては、脊髄筋萎縮症、レット症候群、アンジェルマン症候群、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、前頭側頭認知症、リソソーム蓄積症、多発性硬化症、および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) が挙げられる。

30

【0103】

「ベクター」は、単離された核酸を含み、単離された核酸を細胞の内部へとデリバリーするために使用することができる、組成物である。多数のベクターが当技術分野において知られており、例えば、これらに限定されるわけではないが、直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性化合物または両親媒性化合物と関連しているポリヌクレオチド、プラスミド、およびウイルスが挙げられる。したがって、用語「ベクター」は、自己複製プラスミドまたはウイルスを包含する。用語は、細胞への核酸の移送を促進する非プラスミド化合物および非ウイルス化合物、例えば、ポリリジン化合物、リポソーム、および同様のもの、も包含すると解釈されるべきである。ウイルスベクターの例としては、これらに限定されるわけではないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス、アネロウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルスベクター、および同様のものが挙げられる。

40

【0104】

用語「特異的に結合する」または同様のものは、所定の分子が生理的条件下において比較的安定な別の分子と複合体を形成することを意味する。所定の分子が別の分子に特異的に結合するか否かを特定する方法は、当分野において周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴、および同様のものが挙げられる。例えば、ウイルスタンパク質に「特異的に結合する」RNAヘアピンは、本明細書に使用される場合、表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定した場合の、約1000 nM未満、約500 nM未満、約300 nM未満、約200 nM未満、約100 nM未満、約90 nM未満、約80 nM未満、約70

50

n M未満、約60 n M未満、約50 n M未満、約40 n M未満、約30 n M未満、約20 n M未満、約10 n M未満、約5 n M未満、約4 n M未満、約3 n M未満、約2 n M未満、約1 n M未満、または約0.5 n M未満のKDにおいて、ウイルスタンパク質またはその一部分に結合するRNAヘアピンを包含する。

#### 【0105】

「変異体」は、本明細書に使用される場合、アミノ酸またはヌクレオチドの追加（例えば、挿入）、欠失、または保存的置換によってアミノ酸または核酸配列における所定のポリペプチドまたはヌクレオチド配列とは異なるが、所定のポリペプチドの生物活性を保持する（例えば、変異体核酸は、依然として、同じまたは同様のアミノ酸配列をコードすることができる）ポリペプチドまたはヌクレオチド配列を意味する。アミノ酸の保存的置換、すなわち、同様の特性（例えば、親水性および荷電された領域の程度および分布など）を有する異なるアミノ酸によるアミノ酸の置き換え、は、典型的には軽微な変更を伴うとして当技術分野において認識される。これらの軽微な変更は、当技術分野において理解されるように、ある程度、アミノ酸のハイドロパシー指標（hydrophatic index）を考慮することによって識別することができる（例えば、Kyte et al, J. Mol. Biol., 157: 105-132 (1982)を参照されたい）。アミノ酸のハイドロパシー指標は、その疎水性および電荷の考慮に基づいている。同様のハイドロパシー指標のアミノ酸は、置換することができ、ならびに、依然としてタンパク質機能を保持することが、当技術分野において知られている。一態様において、 $\pm 2$ のハイドロパシー指標を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性も、結果としてタンパク質が生物学的機能を保持する置換を明らかにするために使用することができる。ペプチドとの関連におけるアミノ酸の親水性の考慮は、抗原性および免疫原性と良好に相関することが報告されている有用な指標である、そのペプチドの最大局所平均親水性の計算を可能にする（例えば、米国特許第4,554,101号を参照されたい）。同様の親水性値を有するアミノ酸の置換は、当技術分野において理解されるように、結果として、ペプチドによる生物活性、例えば、免疫原性、の保持を生じることができる。一態様において、置換は、お互いに $\pm 2$ 以内の親水性値を有するアミノ酸によって実施される。アミノ酸の疎水性指標および親水性値の両方は、そのアミノ酸の特定の側鎖によって影響を受ける。その知見と一致して、生物学的機能と互換性のあるアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、サイズ、および他の特性によって明らかにされるように、アミノ酸、特にそれらのアミノ酸の側鎖、の相対的類似性に依存すると理解される。「変異体」は、例えば、その生物活性または抗原反応性を依然として保持する、タンパク質加水分解、リン酸化、または他の翻訳後修飾によって、差示的に処理されているポリペプチドまたはその断片を説明するためにも使用することができる。本明細書における「変異体」の使用は、文脈によって矛盾しない限り、変異体の断片を包含することが意図される。

#### 【0106】

択一的にまたは追加的に、「変異体」は、その長さまたは配列における1つまたは複数の変更によってポリヌクレオチドまたはタンパク質から得られ、ポリヌクレオチドまたはタンパク質と比較してそれらとは異なる、ポリヌクレオチドまたはタンパク質として理解されるべきである。それらからタンパク質または核酸変異体を得られる、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、親ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとして知られる。用語「変異体」は、親分子の「断片」または「誘導體」を包含する。典型的には、「断片」は、親分子より長さまたはサイズが小さいが、その一方で、「誘導體」は、親分子と比較して、その配列において1つまたは複数の違いを示す。さらに、修飾された分子、例えば、これらに限定されるわけではないが、翻訳後修飾タンパク質（例えば、グリコシル化されたタンパク質、ピオチニル化されたタンパク質、ホスホリル化されたタンパク質、ユビキチン化されたタンパク質、パルミトイル化されたタンパク質、またはタンパク質分解的に切断されたタンパク質）およびメチル化DNAなどの修飾された核酸なども包含される。さらに、異なる分子の混合物、例えば、これらに限定されるわけではないが、RNA-DNAハイブリッドなど、も、用語「変異体」によって包含される。典型的には、変異体は、

好ましくは遺伝子工学的手段によって、人工的に構築されるが、その一方で、親ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、野生型のタンパク質またはポリヌクレオチドである。しかしながら、天然に存在する変異体も、本明細書において使用される用語「変異体」によって包含されると理解されるべきである。さらに、本開示において使用可能な変異体は、親分子のホモログ、オーソログ、またはパラログから、または変異体が親分子の少なくとも1つの生物活性を示す限り、すなわち、機能的に活性である限り、人工的に構築された変異体からも得られ得る。

【0107】

択一的にまたは追加的に、「変異体」は、本明細書に使用される場合、それらを得るための親ポリペプチドまたは親ポリヌクレオチドに対する、ある特定の程度の配列同一性によって特徴付けることができる。より正確には、本開示との関連におけるタンパク質変異体は、その親ポリペプチドに対して少なくとも80%の配列同一性を示す。本開示との関連におけるポリヌクレオチド変異体は、その親ポリヌクレオチドに対して少なくとも70%の配列同一性を示す。用語「少なくとも70%の配列同一性」は、ポリペプチドおよびポリヌクレオチド配列の比較に関して、本明細書全体を通して使用される。この表現は、好ましくは、それぞれの基準ポリペプチドまたはそれぞれの基準ポリヌクレオチドに対する、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%の配列同一性を意味する。

【0108】

ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の類似性、すなわち、配列同一性の割合は、配列アラインメントによって特定することができる。そのようなアラインメントは、いくつかの当技術分野において既知のアルゴリズム、好ましくは、KarlinおよびAltschulの数学的アルゴリズム (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 90: 5873-5877)、hmmalign (HMMERパッケージ、<http://hmmerr.wustl.edu/>)、または例えば、<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>または<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>または[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_clustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html)において利用可能なCLUSTALアルゴリズム (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) によって実施することができる。使用される好ましいパラメータは、<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>または<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>において設定されるようなデフォルトのパラメータである。配列同一性のグレード (配列マッチング) は、例えば、BLAST、BLAT、またはBlastZ (またはBlastX) を使用して算出され得る。同様のアルゴリズムが、Altschul et al (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410のBLASTNおよびBLASTPプログラムに組み込まれている。比較目的のためにギャップありアラインメント (gapped alignment) を得るために、ギャップBLASTが、Altschul et al (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載されるように、利用される。BLASTおよびギャップBLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトのパラメータが使用される。配列マッチング解析は、Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1:154-162) またはマルコフランダム場のような確立された相同性マッピング技術によって補われ得る。配列同一性の割合が、本出願において言及される場合、明記されない限り、これらの割合は、より長い配列の全長に関連して算出される。

【0109】

10

20

30

40

50

## トランススプライシング

多くの遺伝子治療技術が、特定の病理を扱うように考案されてきた。これら様々なアプローチは、ウイルスベクターを使用する遺伝子補充から、CRISPR/Cas9技術を使用するゲノム編集まで及ぶ。しかしながら、かなりの治療効果を達成するには、これらのアプローチは適用不可であったり有効でなかったりする場合がある。現在、治療的トランススプライシング事象を触媒するためのスプライソソームを開発することにより遺伝子発現レベルを変えることなくクリーンな転写物を作製するために突然変異型転写物を修復することによって、この問題に対処する努力が為されている（例えば、図7を参照されたい）。

### 【0110】

スプライシングは、大きなリボヌクレオタンパク質複合体であるスプライソソームによって触媒される、真核細胞の核において見出される反応である。スプライシングは、結果として、pre-mRNAにおけるイントロンの排除を生じる。反応は、同じRNA分子上に位置されたドナー部位、分岐点、およびアクセプター部位に關与するため、シススプライシングと見なされる。

### 【0111】

スプライソソームは、トランススプライシング事象も触媒することができる。シススプライシングとは異なり、トランススプライシングは、2つの異なるRNA分子の間において生じる。分子プロセスは、最後のmRNAが、最初のpre-mRNAの最初のエキソンおよび別のエキソンで構成され、結果としてキメラ分子を形成することを除いて、同じである。天然に存在するトランススプライシングの発見により、バイオエンジニアリング目的にとって有用であることが実証された。1999年、Puttarajuら（Nature Biotech., 17:246-52）は、細胞培養においてトランススプライシングを誘導することができる人工RNAによって媒介されるエキソン交換を使用して内因性mRNAの修復を誘導するようにトランススプライシングを転用する能力を実証した。その後の研究は、インビボ（in vivo）でのこれの使用の実現可能性を示し、それは、ヒトの気管支の異種移植モデルシステムでの突然変異体嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）の機能回復をもたらした。これは、遺伝子治療戦略としての、スプライソソーム媒介性RNAトランススプライシング、またはSMARTシステムの研究および使用につながった。この技術は、疾患と関連している様々なmRNA配列の修復を媒介するために使用されてきたが、SMART技術には欠点および制限が存在する。

### 【0112】

現在のSMART技術には、考慮に入れなければならないいくつかの重要な欠点が存在する。SMART技術の欠点の1つは、分子の特異性である。理論的に、ランダムmRNAによるオフターゲットトランススプライシングは、ナンセンス媒介崩壊またはノンストップ崩壊によって処理しなければならず、標的配列に対するpre-mRNAトランススプライシング分子の特異性を検証して非特異的事象を制限することが必須である。結合ドメイン配列の長さを最長で153までの塩基に増加させた場合、ヒトゲノム全体および正確に対応する配列を見出す可能性は劇的に減少し、効率は増加する。別の欠点は、システムの効率である。ある特定の疾患により、低レベルの突然変異タンパク質の発現さえ、病的な表現型につながるであろう。

### 【0113】

#### CRISPR/Cas

本開示は、ヌクレアーゼ不活性CRISPR/Casシステムと、核酸ガイドと、特異的RNA結合ドメインと、ストリンジентな条件下において特異的RNA結合ドメインにハイブリダイズするRNA配列を含む修復鋳型とを含む標的化トランススプライシングシステムを含む組成物および方法を含む。より広くにはCRISPRとして知られる、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（Clustered regularly interspaced short palindromic repeat）、およびCas（CRISPR関連）タンパク質として知られる酵素のファミリーは

10

20

30

40

50

、外来遺伝的要素、例えば、ある形態の後天的免疫を提供するプラスミドおよびファージ内に存在するものなど、に対する抵抗性を付与する原核細胞免疫システムである。近年、CRISPR/Casシステムは、基本的な分子生物学的研究、バイオテクノロジー産物の開発、および疾患の治療において使用されるツールとして開発された。これらのシステムは、標的化されたDNA切断を媒介するために広く採用されており、それらは、非相同末端結合(NHEJ)による標的化遺伝子の崩壊または鋳型依存性の相同組換え修復(HDR)による正確な遺伝子編集を駆動する。

#### 【0114】

ある特定の実施形態において、本明細書において説明されるCRISPR/Casシステムは、配列番号1、17、20、23、26、29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、71、74、77、80、83、86、または89のいずれか1つのポリヌクレオチド配列またはその変異体によってコードされるCas13酵素を含む。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、配列番号2、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、72、75、78、81、84、87、または90のいずれか1つのアミノ酸配列またはその変異体を含むCas13酵素を含む。Cas13酵素は、VI型CRISPR-Casシステムとして分類され、ならびに生化学的におよび細菌において観察されるプロトスペーサー隣接部位モチーフ(proto spacer flanking site motif)を伴う標的に対して優先的に正確なRNA切断を媒介する2つの高等真核生物および原核生物ヌクレオチド結合(HEPN)endoRNAseドメインを有する。3つのCas13タンパク質ファミリーが、これまでに識別されている。Cas13aは、C2c2として以前は知られており、核酸検出のためのツールとして適合させることができる。Cas13bは、RNA編集および核酸検出の両方のために使用されており、その直線状ドメインアーキテクチャーおよびCRISPR RNA(crRNA)構造においてVI型CRISPRエフェクターの中でも独特である。Cas13酵素は、本質的にプログラマブルであり、そのことは、それらをRNA結合および摂動用途のためのツールを開発するための魅力的な出発点にしている(Cox et al. (2017) Science. 358:1019-1027、なお、文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)。

#### 【0115】

用語「核酸結合タンパク質ドメイン」は、特定の核酸配列をターゲティングすることができるタンパク質のドメインを意味する。いくつかの実施形態において、核酸配列はDNAである。他の実施形態において、核酸配列はRNAである。いくつかの実施形態において、核酸結合タンパク質ドメインは、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位に特異的に結合する。核酸結合タンパク質ドメインのいくつかの例としては、これらに限定されるわけではないが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFNs)、およびPumbyモジュール(Adamala et al (2016) Proc Natl Acad Sci. 113(19):E2579-E2588、なお、文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)、またはヒト化CRISPR、例えば、CRISPR-Cas-Inspired RNA Targeting System(CIRTS)(Rauch et al (2019) Cell. 178(1):P122-134、なお、文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)、またはRNA認識モチーフ(Maris et al. (2005) The FEBS journal 272:2118-2131)が挙げられる。

#### 【0116】

本明細書において説明される、RNAターゲティングシステム、ベクターシステム、ベクターおよび組成物は、様々なRNAターゲティング用途、タンパク質などの遺伝子産物の合成の変更または修正、RNA切断、RNA編集、RNAスプライシング；標的RNAのトラフィック、標的RNAのトレーシング、標的RNAの単離、標的RNAのビジュアライゼーションなど、において使用され得る。

#### 【0117】

10

20

30

40

50

用語「スプライドナー」は、イントロンの5'末端を意味する。

【0118】

用語「スプライサクセプター」は、イントロンの3'末端を意味する。

【0119】

用語「修復鋳型」は、関心対象の核酸遺伝子座にスプライスされる所望の配列を含む核酸分子を意味する。いくつかの実施形態において、スプライスされる所望の配列は、エクソンである。いくつかの実施形態において、修復鋳型はさらに、1つまたは複数のイントロンを含む。

【0120】

ある特定の実施形態において、核酸ガイドは、RNAガイドである。ある特定の実施形態において、核酸ガイドは、DNAガイドである。いくつかの実施形態において、ガイド核酸、例えば、ガイドRNAまたはgRNAなどは、関心対象の標的プレmRNAを認識し、Casタンパク質をプレmRNAに向かわせる、特定の配列である。いくつかの実施形態において、ガイド核酸は、転写が生じるDNA遺伝子座を標的にする。概して、ガイド核酸は、2つの構成要素、すなわち、標的配列に対して相補的な17~20ヌクレオチド配列である、crisprRNA(crRNA)と、Casヌクレアーゼのための結合足場として機能するtracrRNAと、で構成される。より近年では、crRNAおよびtracrRNA構成要素は、単一のガイドRNA(sgRNA)を作り出すために、1つの分子に融合されている。ある特定の実施形態において、トランススプライシングシステムは、1つの核酸ガイドを含む。現在特徴付けられているCRISPR/Cas13システムの場合、crisprRNA(crRNA)は、スペーサーおよびダイレクトリピートで構成される。Cas13bの場合、スペーサーは、crRNAの5'であり、ダイレクトリピートは、crRNAの3'である。Cas13bの場合、crRNAおよびガイドRNAは、相互互換的に使用することができる。Cas13aおよびCas13dの場合、スペーサーは、crRNAの3'であり、ダイレクトリピートは、crRNAの5'である(Zhang F (2019). Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond. Quarterly Reviews of Biophysics 52, e6, 1-31. <https://doi.org/10.1017/S0033583519000052>、なお、文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)。ある特定の実施形態において、トランススプライシングシステムは、2つ以上の核酸ガイドを含む。ある特定の実施形態において、2つ以上の核酸ガイドは、1つのプロモーターに作動可能に連結されたアレイにあり、それは、Cas13によって切断および処理される。いくつかの実施形態において、アレイは、各スペーサーが異なる核酸を標的にする複数のスペーサーの間にダイレクトリピートを有する。ある特定の実施形態において、2つ以上の核酸ガイドが、別々のプロモーター、例えば、U6プロモーターなど、によって発現される。ある特定の実施形態において、ガイドRNAは、5'末端におけるダイレクトリピート(例えば、配列番号10、19、22、25、28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、73、76、79、82、85、88、および91)と、3'末端におけるスペーサーとを有する。他の実施形態において、ガイドRNAは、3'末端におけるダイレクトリピート(例えば、配列番号10、19、22、25、28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、73、76、79、82、85、88、および91)と、5'末端におけるスペーサーとを有する。他の実施形態において、スペーサーは、ダイレクトリピート(例えば、配列番号10、19、22、25、28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、73、76、79、82、85、88、および91)によって隣接される。ある特定の実施形態において、ダイレクトリピートは、配列番号10、19、22、25、28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64、67、73、76、79、82、85、88、または91のダイレクトリピート核酸配列に対して少なくとも70%(例えば、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、

10

20

30

40

50

84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%)の配列同一性を有する。ある特定の実施形態において、核酸ガイドは、複数の標的を認識する。ある特定の実施形態において、本開示は、配列番号11または12の核酸配列に対して少なくとも70%(例えば、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%)の配列同一性を有する核酸ガイド配列を提供する。

#### 【0121】

本発明は、標的RNA配列に結合する核酸を使用する。これは、核酸はタンパク質より作製するのがはるかに容易で安価であり、特異性は、相同性が求められるストレッチの長さに従って変えることができるため、有利である。例えば、複数のフィンガーの複雑な三次元位置決めを必要としない。用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、および「オリゴヌクレオチド」は、相互互換的に使用される。それらは、任意の長さのヌクレオチドの重合形態である、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのどちらか、またはそれらのアナログを意味する。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有し得、ならびに既知または未知の任意の機能を実行し得る。下記は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片のコード領域または非コード領域、連鎖解析から定義された遺伝子座、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、低分子干渉RNA(siRNA)、低分子ヘアピンRNA(shRNA)、マイクロ-RNA(miRNA)、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐鎖状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、単離された任意の配列のDNA、単離された任意の配列のRNA、核酸プローブ、およびプライマー。用語は、合成骨格を有する核酸様構造体も包含し、例えば、Eckstein, 1991; Baserga et al., 1992; Milligan, 1993; WO 97/03211; WO 96/39154; Mata, 1997; Strauss-Soukup, 1997; and Samstag, 1996を参照されたい。ポリヌクレオチドは、1つまたは複数の修飾されたヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログなど、を含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組立ての前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって割り込まれ得る。ポリヌクレオチドはさらに、例えば、ラベリング構成要素とのコンジュゲーションによって、重合後に修飾され得る。

#### 【0122】

ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムの特異的RNA結合ドメインは、Casタンパク質に融合したウイルスタンパク質を含む。用語「ウイルスタンパク質」は、スプライスアクセプター鑄型のヘアピンに結合するCasタンパク質に結合したウイルス起源のタンパク質を説明するために使用することができる。一本鎖RNAバクテリオファージのコートタンパク質は、ウイルスレプリカーゼの翻訳抑制因子である。それらは、レプリカーゼ開始コドンを取り囲むRNAヘアピンに特異的に結合することによってこれを達成する。いくつかの実施例は、RNAファージMS2、N、LQBeta、およびPP7(例えば、配列番号5~9)のコートタンパク質であろう。ある特定の実施形態において、特異的RNA結合ドメインは、配列番号6、7、8、または9のいずれか1つのアミノ酸配列またはその変異体を含む。用語「結合する(binding)」または同様のものは、ウイルスタンパク質が、生理的条件下において比較的安定である対応するヘアピンと複合体を形成することを意味する。ある特定の実施形態において、本開示は、配列番号13~16の核酸配列のいずれか1つに対して少なくとも70%(例えば、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%)の配列同一性を有するヘアピン配列を提供する。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 3 】

ある特定の実施形態において、ウイルスタンパク質は、CRISPR/Casシステムに共有結合している。ある特定の実施形態において、ウイルスタンパク質は、CRISPR/Casシステムに共有結合していない。ある特定の実施形態において、ウイルスタンパク質およびCRISPR/Casシステムは、融合タンパク質である。本明細書において使用される場合、用語「共有結合している」は、原子間での電子の共有を伴う化学結合を意味する。用語「融合タンパク質」は、元々は別々のタンパク質をコードする2つ以上の遺伝子の接合によって作製されたタンパク質を意味する。

## 【 0 1 2 4 】

いくつかの実施形態において、CRISPR/Casシステムの特異的RNA結合ドメインは、ウイルス起源ではないRNA結合タンパク質を含む。

10

## 【 0 1 2 5 】

ある特定の実施形態において、トランススプライシングシステムは、1つの修復鋳型を含む。ある特定の実施形態において、トランススプライシングシステムは、2つ以上の修復鋳型を含む。

## 【 0 1 2 6 】

ある特定の実施形態において、トランススプライシングシステムは、ヌクレアーゼ不活性CRISPR/Casシステムを含む核酸ガイド結合タンパク質ドメインを含む。ある特定の実施形態において、トランススプライシングシステムの発現および/または活性は、一過性である。「一過性発現」は、核酸が真核細胞に導入された後、一時の間、発現される遺伝子の一時的発現を意味する。いくつかの実施形態において、トランススプライシングシステムの一過性発現は、小分子によって制御され得る。本明細書において使用される場合、用語「小分子」は、非核酸/非アミノ酸分子を意味する。本明細書において使用される場合、用語「小分子結合ドメイン」は、所定の小分子に特異的に結合する分子、多くの場合はタンパク質、の一部分を意味する。これらは、tet-ONまたはtet-OFFシステムあるいは、合成転写因子またはプロテアーゼ阻害因子を使用した化学遺伝学的制御を含むことができる。例えば、dCas13-NLS-NS3-MS2は、活性なままであり、BILN-2061の存在下では切断されない(Tague et al, Nature Methods, Volume 15, pages 519-522 (2018)およびWagner et al. Nature Chemical Biology, Volume 14, pages 1043-1050 (2018)、なお、文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)。いくつかの実施形態において、トランススプライシングシステムの一過性発現は、デリバリー粒子の分解によって制御することができる。いくつかの実施形態において、トランススプライシングシステムの発現は、光活性化転写因子によって制御され得る(Konermann et al, Nature, Volume 500, pages 472-476 (22 August 2013)、なお、文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)。いくつかの実施形態において、トランススプライシングシステムの組立ては、小分子によって、例えば、化学的に誘導された二量体化、によって制御され得る。その例としては、FK1012によって組み立てられたdCas13-NLS-FKBPおよびFKBP-NLS-MS2; FK506によって組み立てられたdCas13-NLS-FKBPおよびCNA-NLS-MS2; およびラパミシンによって一時的に組み立てられ、FK506によって急速に分解される、dCas13-NLS-FRBおよびMS2-FKBP (Braun et al., Nature Communications, DOI: 10.1038/s41467-017-00644-y、なお、文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)が挙げられる。さらなる例としては、アブシシン酸によって組み立てられたdCas13-NLS-ABI1およびPYL1-MS2 (Gao et al, Nature Methods, DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4042>、なお、文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)が挙げられる。小分子およびそれらの化学的に誘導されたシステムの他の例は、Stantonら (Science, DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aao5902>、なお、文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)に含まれる。いくつかの実施形態において、トランススプライシングシステムの活

20

30

40

50

性は、システムを分解するために小分子を使用して制御することができる。いくつかの実施形態において、小分子結合ドメインは、自己切断ペプチドを介してCRISPRシステムに接合され得る。いくつかの実施形態において、自己切断ペプチドは、2A自己切断ペプチドである。いくつかの例としては、これらに限定されるわけではないが、T2A、P2A、E2A、およびF2A配列が挙げられる。

#### 【0127】

いくつかの実施形態において、トランススプライシングシステムの組立ては、SunTagによって媒介される (Tanenbaum et al, Cell, 2014, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>)。いくつかの実施形態において、トランススプライシングシステムの組立ては、例えば、SAMシステムなど、天然のまたは改変されたガイドRNA上のヘアピンによって媒介される (Konermann et al, Nature, 2015, DOI: [10.1038/nature14136](https://doi.org/10.1038/nature14136))。 10

#### 【0128】

いくつかの実施形態において、一過性発現は、Hewitt et al, Science Translational Medicine 30 Jan 2019: Vol. 11, Issue 477, eaat9143に示されるようなRNAとしてトランススプライシングシステムをデリバリーすることによって実施され、なお、文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。いくつかの実施形態において、トランススプライシングシステムの組立ては、光によって制御することができる。例えば、dCas13-NLS-CRY2およびCIB1NSL-MS2は、466nmの光によって組み立てられる (Konermann et al. (2013))。いくつかの実施形態 20  
において、一過性発現は、エピソームのウイルスまたは非統合型ウイルスによるトランススプライシングシステムをデリバリーすることによって実施される。これらのウイルスは、Ad5、AAV、HSV-1、またはパキウウイルスを含む。いくつかの実施形態において、トランススプライシングシステムの活性は、条件付き活性インテイン、例えば、4-ヒドロキシタモキシフェン(4-HT)または他の小分子の存在下においてタンパク質スプライシングを受けるインテインなど、によって媒介される。いくつかの実施形態において、トランススプライシングシステムの活性は、Davisら (Nature Chemical Biology, 2015, DOI: <https://doi.org/10.1038/nchembio.1793>)と同様に、4-HT媒介性タンパク質スプライシングが行われるまで、Cas13活性を破壊する位置において4-HT感応性インテインをCas13に含ませることによって、4-HTに 30  
よって制御される。

#### 【0129】

デリバリー

いくつかの実施形態において、真核細胞に導入される核酸は、プラスミドDNAまたはウイルスベクターである。

#### 【0130】

好ましくは、デリバリーは、ウイルスベクターであり得るベクターの形態、例えば、レンチウイルスまたはパキウウイルスまたはアデノウイルス/アデノ随伴ウイルスベクターなど、であるが、しかし、デリバリーの他の手段(例えば、酵母システム、微細小胞、ベクターを金ナノ粒子に取り付ける遺伝子銃/手段)も知られており、ならびに提供される。ウイルスベクターは、例えば、これらに限定されるわけではないが、ミオウイルス科、シフォピラーダ科、ポドウイルス科、コルチコウイルス科、リポスリクスウイルス科、ボックスウイルス科、イリドウイルス科、アデノウイルス科、ポリオーマウイルス科、パピローマウイルス科、ミミウイルス科、パンドラウイルス属、サルタープロウイルス属 (Salterprovirus)、イノウイルス科、ミクロウイルス科、パルボウイルス科、サーコウイルス科、ヘパドナウイルス科、カリモウイルス科、レトロウイルス科、シストウイルス科、レオウイルス科、ビルナウイルス科、トティウイルス科、パルティティウイルス科、フィロウイルス科、オルソミクソウイルス科、デルタウイルス属、レヴィウイルス科、ピコルナウイルス科、マルナウイルス科 (Marnaviridae)、セコウイルス科 (Secoviridae)、ポティウイルス科、カリシウイルス科、ヘペウ 40  
 50

イルス科、アストロウイルス科、ノダウイルス科、テトラウイルス科、ルテオウイルス科、トンプスウイルス科、コロナウイルス科、アルテリウイルス科、フラビウイルス科、トガウイルス科、ビルガウイルス科、プロモウイルス科、ティモウイルス科、アルファフレキシウイルス科、ソベモウイルス属、またはイダエオウイルス属を含む、ウイルスの様々な科/属から選択され得る。

#### 【0131】

ベクターは、ウイルスまたは酵母システムのみを意味するのではなく（例えば、関心対象の核酸が、プロモーターに作動可能に連結され得、ならびにその制御下にあり得る場合（発現に関して、例えば、処理されたRNAを最終的に提供するために））、宿主細胞への核酸のダイレクトデリバリーも意味し得る。本明細書の方法において、ベクターは、ウイルスベクターであり得、これは、AAVに有利であるが、例えば、レンチウイルスなど、本明細書において説明されるような他のウイルスベクターも、用いることができる。例えば、バキュロウイルスは、昆虫細胞における発現のために使用され得る。そしてこれらの昆虫細胞は、多量のさらなるベクター、例えば、本発明のデリバリーに適合されるAAVまたはレンチウイルスなど、の作製にとって有用であり得る。本CRISPR酵素をデリバリーする方法であって、細胞にCRISPR酵素をコードするmRNAを送達することを含む方法も想定される。ある特定の実施形態において、CRISPR酵素は、トランケートされており、および/または1000未満のアミノ酸または4000未満のアミノ酸で構成され、および/またはヌクレアーゼまたはニッカーゼであり、および/またはコドン最適化され、および/または1つまたは複数の突然変異を含み、および/またはキメラCRISPR酵素を含むこと、および/または本明細書に説明されるような他の選択肢、は理解されるであろう。

10

20

#### 【0132】

いくつかの実施形態において、CRISPR酵素をコードする核酸配列の発現は、プロモーターによって駆動され得る。いくつかの実施形態において、単一のプロモーターは、CRISPR酵素および1つまたは複数のガイド配列をコードする核酸配列の発現を駆動する。いくつかの実施形態において、CRISPR酵素およびガイド配列は、同じプロモーターに作動可能に連結され、ならびにそれから発現される。いくつかの実施形態において、CRISPR酵素およびガイド配列は、異なるプロモーターから発現される。例えば、プロモーターは、これらに限定されるわけではないが、UBCプロモーター、PGKプロモーター、EF1Aプロモーター、CMVプロモーター、EFSプロモーター、SV40プロモーター、およびTREプロモーターであり得る。プロモーターは、弱いまたは強いプロモーターであり得る。プロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターであり得る。いくつかの実施形態において、プロモーターは、AAV ITRでもあり得、ベクターにおいて空間を占め得る追加のプロモーター要素に対する必要性を排除するために有利であり得る。AAV ITRの使用によって解放された追加の空間は、追加の要素、例えば、ガイド配列など、の発現を駆動するために使用することができる。いくつかの実施形態において、プロモーターは、組織特異的プロモーターであり得る。

30

#### 【0133】

いくつかの実施形態において、CRISPR酵素をコードする酵素コード配列は、特定の細胞、例えば、真核細胞など、における発現に対してコドン最適化される。真核細胞は、特定の有機体、例えば、哺乳動物例えば、これらに限定されるわけではないが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、または非ヒト霊長類など、のものであるかそれらに由来するものであり得る。概して、コドン最適化は、天然アミノ酸配列を維持しつつ、天然配列の少なくとも1つのコドン（例えば、約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50のコドンまたはそれ以上のコドン）を、その宿主細胞の遺伝子においてより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンで置き換えることによって、関心対象の宿主細胞での増強された発現のために核酸配列を改変するプロセスである。様々な種が、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定のバイアスを示す。コドンバイアス（有機体間でのコドン利用における違い）は、多くの場合、メッセンジャーRNA（mRNA）の翻訳の効

40

50

率と相関し、そしてそれらは、特に、翻訳されるコドンの特性および特定のトランスファーRNA (tRNA) 分子の可用性に依存すると考えられる。細胞における選択されたtRNAの優位性は、概して、ペプチド合成において最も頻繁に使用されるコドンの反映である。したがって、遺伝子は、コドン最適化に基づいて所定の有機体における最適な遺伝子発現のために適合させることができる。コドン利用表は、例えば、「コドン利用データベース (Codon Usage Database)」において容易に利用可能であり、これらの表は、多くの方法において適合させることができる。Nakamura, Y., et al. "codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)を参照されたい。

特定の宿主細胞での発現のために特定の配列を最適化するコドンのためのコンピュータアルゴリズムも、利用可能であり、例えば、Gene Forge (Aptagen; Jacobus, Pa.)も利用可能である。いくつかの実施形態において、Casタンパク質をコードする配列における1つまたは複数のコドン(例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、またはそれ以上のコドン、あるいは全てのコドン)は、特定のアミノ酸のために最も頻繁に使用されるコドンに対応する。

10

#### 【0134】

いくつかの実施形態において、ベクターは、1つまたは複数の核局在化配列(NLS)、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のNLSなど、を含むCasタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、Casタンパク質は、アミノ末端またはその近傍における約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のNLS、カルボキシ末端またはその近傍における約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のNLS、またはこれらの組み合わせ(例えば、アミノ末端における1つまたは複数のNLSとカルボキシ末端における1つまたは複数のNLSと)を含む。2つ以上のNLSが存在する場合、単一のNLSが、2つ以上の複数のコピーに存在し得、および/または1つまたは複数の他のNLSとの組み合わせにおいて1つまたは複数のコピーに存在し得るように、それぞれのNLSは、他のものから独立して選択され得る。いくつかの実施形態において、NLSの最も近いアミノ酸が、NまたはC末端からポリペプチド鎖に沿って約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、またはそれ以上アミノ酸内に存する場合、NLSは、NまたはC末端近傍と見なされる。典型的には、NLSは、タンパク質表面上に露出した正に荷電されたリジンまたはアルギニンの1つまたは複数の短い配列からなるが、NLSの他のタイプも知られている。いくつかの実施形態において、NLSは、2つのドメインの間、例えば、Cas13タンパク質とウイルスタンパク質の間に存する。NLSは、離間されるかまたはグリシン-セリンリンカーによって隣接される2つの機能的ドメインの間にも存し得る。

20

30

#### 【0135】

概して、1つまたは複数のNLSは、真核細胞の核における検出可能な量でのCasタンパク質の蓄積を駆動するのに十分な強さを有する。概して、核局在化活性の強さは、Casタンパク質におけるNLSの数、使用された特定のNLS、またはそれら因子の組み合わせに由来し得る。核における蓄積の検出は、任意の好適な技術によって実施され得る。例えば、核の位置を検出する手段(例えば、DAPIなどの核に対して特異的な染料)と組み合わせ、細胞内の位置が可視化され得るように、検出可能なマーカーが、Casタンパク質に融合され得る。検出可能なマーカーの例としては、蛍光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質、またはGFP; RFP; CFP)、およびエピトープタグ(HAタグ、FLAGタグ、SNAPタグなど)が挙げられる。細胞核も、細胞から単離され得、その含有量は、タンパク質を検出するための任意の好適なプロセス、例えば、免疫組織化学、ウェスタンブロット、または酵素活性アッセイなど、によって分析され得る。核における蓄積も、例えば、CRISPR複合体に曝露されていないコントロール、または1つまたは複数のNLSを欠くCasタンパク質に曝露されたコントロールと比較した場合の、CRISPR複合体形成の効果に対するアッセイ(例えば、標的配列でのD

40

50

NA切断または突然変異に対するアッセイ、またはCRISPR複合体形成および/またはCRISPR複合体活性によって影響を受ける変更された遺伝子発現活性に対するアッセイ)、など、によって、間接的に特定され得る。

【0136】

概して、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズさせ、CRISPR複合体の配列特異的結合を標的配列に向かわせるために、標的ポリヌクレオチド配列に対して十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを使用して最適に位置合わせされた場合、約50%以上、60%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、97.5%以上、99%以上、またはそれ以上である。最適なアラインメントは、配列を整列させるための任意の好適なアルゴリズムの使用によって特定され得、その非限定的な例としては、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler Transformに基づくアルゴリズム(例えば、Burrows Wheeler Aligner)、ClustalW、ClustalX、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies)、ELAND(Illumina、サンディエゴ、カリフォルニア州)、SOAP(soap.genomics.org.cnにおいて利用可能)、およびMaq(maq.sourceforge.netにおいて利用可能)が挙げられる。いくつかの実施形態において、ガイド配列は、約5以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、21以上、22以上、23以上、24以上、25以上、26以上、27以上、28以上、29以上、30以上、35以上、40以上、45以上、50以上、75以上、またはそれ以上のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、ガイド配列は、約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12未満、またはそれ以下のヌクレオチドの長さである。CRISPR複合体の配列特異的結合を標的配列に向かわせるガイド配列の能力は、任意の好適なアッセイによって評価され得る。

【0137】

いくつかの態様において、本発明は、1つまたは複数のポリヌクレオチド、例えば、本明細書において説明される1つまたは複数のベクター、それらの1つまたは複数の転写物、および/またはそれらから転写された1つまたは複数のタンパク質など、を宿主細胞にデリバリーすることを含む方法を提供する。いくつかの態様において、本発明はさらに、そのような方法で作製された細胞、および、そのような細胞を含むかそのような細胞で構成された有機体(例えば、動物、植物、または菌類)を提供する。いくつかの実施形態において、ガイド配列と組み合わされた(ガイド配列と複合化されてもよい)Casタンパク質が、細胞にデリバリーされる。哺乳動物細胞または標的組織に核酸を導入するために、従来のウイルスベースおよび非ウイルスベースの遺伝子導入方法を使用することができる。そのような方法は、CRISPRシステムの構成要素をコードする核酸を培養中の細胞または宿主生物の細胞に投与するために使用することができる。非ウイルスベクターデリバリーシステムとしては、DNAプラスミド、RNA(例えば、本明細書において説明されるベクターの転写物)、裸の核酸、およびリポソームなどのデリバリー媒体と複合化された核酸が挙げられる。ウイルスベクターデリバリーシステムとしては、DNAおよびRNAウイルスが挙げられ、それらは、細胞へのデリバリーの後、エピソームゲノムまたは統合されたゲノムのどちらかを有する。遺伝子治療手順の概要については、Anderson, Science 256:808-8313 (1992); Navel and Feigner, TIBTECH 11:211-217 (1993); Mitani and Caskey, TIBTECH 11:162-166 (1993); Dillon, TIBTECH 11:167-175 (1993); Miller, Nature 357:455-460 (1992); Van Brunt, Biotechnology 6(10): 1149-1154 (1988); Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer and Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., in Current Topics in

Microbiology and Immunology, Doerfler and Bohm (eds) (1995);およびYu et al., Gene Therapy 1:13-26(1994)を参照されたい。

【0138】

本明細書において説明されるCRISPR/Casシステムは、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レンチウイルス、アデノウイルス、または他のウイルスベクタータイプ、あるいはそれらの組み合わせを使用してデリバリーすることができる。Casタンパク質および1つまたは複数のガイドRNAは、1つまたは複数のウイルスベクター内にパッケージすることができる。いくつかの実施形態において、標的化トランススプライシングシステムは、Levy et al. (Nature Biomedical Engineering, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0501-5>)と同様に、スプリットインテンシシステムとしてのAAVによってデリバリーされる。他の実施形態において、標的化トランススプライシングシステムは、Lai et al. (Nature Biotechnology, 2005, DOI: 10.1038/nbt1153)と同様に、トランススプライシングシステムとしてのAAVによってデリバリーされ得る。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、例えば、筋肉注射によって、関心対象の組織にデリバリーされるが、その一方で、他方において、ウイルスデリバリーは、静脈内、経皮、鼻腔内、経口、経粘膜、鞘内、脳内、または他のデリバリー方法によって行われる。そのようなデリバリーは、単回投与または複数回投与のどちらかによって為され得る。当業者は、本明細書においてデリバリーされる正確な投薬量は、様々な要因、例えば、選択されたベクター、標的細胞、有機体、または組織、治療される対象の全般的な状態、求められる形質転換/改変の程度、投与経路、投与様式、求められる形質転換/改変のタイプなど、に大いに依存して変わり得る。

10

20

【0139】

核酸のデリバリーのためのRNAまたはDNAウイルスベースのシステムの使用は、ウイルスに身体の特定の細胞をターゲティングさせ、ウイルスペイロードを核へと輸送させるために、高度に発達したプロセスを活用する。ウイルスベクターは、患者に直接投与することができ(インビボ)、またはそれらは、インビトロにおいて細胞を処理するために使用することができ、ならびに改変された細胞は、適宜、患者に投与してもよい(エクスピボ)。従来のウイルスベースのシステムは、遺伝子導入のために、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、および単純ヘルペスウイルスベクターを含むことができた。レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルス遺伝子導入法との、宿主ゲノムにおける統合は、可能であり、それは、多くの場合、結果として、挿入された導入遺伝子の長期の発現を生じる。さらに、高い形質導入効率、多くの異なる細胞タイプおよび標的組織において観察されている。Cas13およびガイドRNAのウイルス媒介性インビボデリバリーは、細胞内、とりわけ、分裂終了細胞および組織において、正確なmRNA摂動を達成するための迅速で強力な技術を提供する。

30

【0140】

ある特定の実施形態において、細胞へのトランススプライシングシステムのデリバリーは、ウイルス性である。ある特定の実施形態において、ウイルスは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、アネロウイルス、またはバキュロウイルスである。

40

【0141】

ある特定の実施形態において、細胞へのトランススプライシングシステムのデリバリーは、非ウイルス性である。ある特定の実施形態において、非ウイルス性デリバリーシステムは、カチオン脂質媒体、電気穿孔法、リン酸カルシウムトランスフェクション、機械的剪断力を使用した膜破壊によるトランスフェクション、機械的なトランスフェクション、およびナノ粒子デリバリーから選択される。

【0142】

好ましくは、ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルス、バキュロウイルス、またはアデノウイルス/アデノ随伴ウイルスベクターなど、であるが、デリバリーの他の手段も知られており(例えば、酵母システム、微小小胞、遺伝子銃/金ナノ粒子に

50

ベクターを取り付けることによる手段)、それも提供される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のウイルスベクターまたはプラスミドベクターが、リポソーム、ナノ粒子、エキソソーム、微小小胞、または遺伝子銃によってデリバリーされ得る。

【0143】

レンチウイルスは、有糸分裂細胞および分裂終了細胞の両方に感染してそれらの遺伝子を発現する能力を有する複雑なレトロウイルスである。最も一般的に知られているレンチウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)であり、それらは、広範囲の細胞タイプを標的にするために、他のウイルスのエンベロープ糖タンパク質を使用する。

【0144】

別の実施形態において、ウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)に基づく最小量の非霊長類レンチウイルスベクターも、とりわけ眼球遺伝子治療のために、想到される(例えば、Balagaan, J gene Med 2006: 8:275-285, Published online 21 November 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jgm.845を参照されたい)。別の実施形態において、加齢黄斑変性症のウェブ形態の治療のために網膜下注射によってデリバリーされる血管新生抑制タンパク質エンドスタチンおよびアンジオスタチンを発現するウマ伝染性貧血ウイルスベクターのレンチウイルス遺伝子治療ベクターであるRetinoStatも、想到され(例えば、Binley et al., HUMAN GENE THERAPY 23:980-991 (September 2012)を参照されたい)、本発明のCRISPR-Casシステムのために改変され得る。

【0145】

レンチウイルスベクターは、パーキンソン病の治療用として開示されており、例えば、US Patent Publication No. 20120295960 および US Patent Nos. 7,303,910 および 7,351,585 を参照されたい。レンチウイルスベクターは、脳へのデリバリー用にも開示されており、例えば、US Patent Publication Nos. US 20110293571、US 20040013648; US 20070025970、US 20090111106、および US Patent No. 7,259,015 を参照されたい。

【0146】

核酸の非ウイルス性デリバリーの方法としては、リポフェクション、ヌクレオフェクション(nucleofection)、マイクロインジェクション、バイオリスティクス、ピロゾーム、リポソーム、免疫リポソーム、多価イオンまたは脂質:核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ウイルス粒子、および薬剤によるDNAの取り込み強化が挙げられる。リポフェクションは、例えば、U.S. Pat. Nos. 5,049,386; 4,946,787; および 4,897,355 に記載されており; リポフェクション試薬は、市販されている(例えば、Transfectam(商標)およびLipofectin(商標))。ポリヌクレオチドの効率的なレセプター認識リポフェクションにとって好適なカチオン性および中性脂質としては、Feigner、WO 91/17424; WO 91/16024のものが挙げられる。デリバリーは、細胞に対して(例えば、インビトロまたはエキスピボ投与)、または標的組織に対して(例えば、インビボ投与)行うことができる。

【0147】

免疫脂質(immunolipid)複合体などの標的化リポソームを含む脂質:核酸複合体の調製は、当業者に周知である(例えば、Crystal, Science 270:404-410 (1995); Blaese et al, Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995); Behr et al, Bioconjugate Chem. 5:382-289 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995); Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); U.S. Pat. Nos. 4,186,183; 4,217,344; 4,235,871; 4,261,975; 4,485,054; 4,501,728; 4,774,085; 4,837,028; および 4,946,787 を参照されたい)。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 8 】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、本明細書において説明される1つまたは複数のベクターによって一過性においてまたは非一過性においてトランスフェクトされる。いくつかの実施形態において、細胞は、それが対象において天然に生じるように、トランスフェクトされる。いくつかの実施形態において、トランスフェクトされる細胞は、対象から採取される。いくつかの実施形態において、細胞は、細胞系など、対象から採取された細胞に由来する。細胞系は、当業者に既知の様々な供給源から利用可能である（例えば、the American Type Culture Collection (ATCC) (マナッサス、ヴァージニア)を参照されたい)。いくつかの実施形態において、本明細書において説明される1つまたは複数のベクターによってトランスフェクトされた細胞は、1つまたは複数のベクター由来の配列を含む新しい細胞系を確立するために使用される。いくつかの実施形態において、本明細書において説明されるCRISPRシステムの構成要素によって、一過性においてトランスフェクトされ（例えば、1つまたは複数のベクターの一過性トランスフェクション、またはRNAによるトランスフェクションによって）、ならびにCRISPR複合体の活性によって改変された細胞は、改変を含むが任意の他の外因性の配列を欠く細胞を含む、新しい細胞系を確立するために使用される。いくつかの実施形態において、本明細書において説明される1つまたは複数のベクターによって一過性においてまたは非一過性においてトランスフェクトされる細胞、またはそのような細胞に由来する細胞系は、1つまたは複数の試験化合物の評価において使用される。

10

20

## 【 0 1 4 9 】

いくつかの実施形態において、本明細書において説明される1つまたは複数のベクターは、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物を作製するために使用される。いくつかの実施形態において、トランスジェニック動物は、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、またはウサギなど、である。ある特定の実施形態において、有機体または対象は、植物である。ある特定の実施形態において、有機体または対象または植物は、藻類である。トランスジェニック植物またはトランスジェニック動物を作製する方法は、当技術分野において既知であり、概して、本明細書において説明されるような細胞トランスフェクションの方法によって開始される。

## 【 0 1 5 0 】

一態様において、本発明は、真核細胞における標的ポリヌクレオチドを改変する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、標的ポリヌクレオチドの切断を実施して、それにより標的ポリヌクレオチドを改変するために、CRISPR複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させることを含み、この場合、CRISPR複合体は、標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされたガイド配列と複合体化されたCRISPR酵素を含み、この場合、ガイド配列は、トレーサーメイト配列に接合され、それは、トレーサー配列にハイブリダイズする。

30

## 【 0 1 5 1 】

作物ゲノミクスにおける最近の進歩により、効率的で費用対効果の高いゲノム編集および遺伝子操作を実施するためにCRISPR/Casシステムを使用する能力は、生産の向上および強化された特質のためにそのようなゲノムを形質転換するための、単一および多重化された遺伝子操作の迅速な選択および比較を可能にするであろう。これに関して、米国特許および刊行物：U.S. Pat. No. 6,603,061 - Agrobacterium-Mediated Plant Transformation Method; U.S. Pat. No. 7,868,149 - Plant Genome Sequences and Uses ThereofおよびUS 2009/0100536 - Transgenic Plants with Enhanced Agronomic Traitsを参照されたく、なお、文献のそれぞれの全ての内容および開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本発明の実践において、Morell et al "Crop genomics: advances and application" Nat Rev Genet.

40

50

2011 Dec 29; 13(2):85-96の内容および開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入られる。

【0152】

本CRISPR/Casシステムの任意の構成要素は、RNAの形態においてデリバリーすることができる。Casおよび/またはウイルスタンパク質mRNAは、インビトロ転写を使用して作製することができる。例えば、Cas mRNAは、以下の要素：T7プロモーター-コザック配列(GCCACC)-Cas13-ベータグロビンからの3'UTR-ポリAテール(一連の120以上のアデニン)、を含むPCRカセットを使用して合成することができる。カセットは、T7ポリメラーゼによる転写のために使用することができる。ガイドRNAも、T7プロモーター-GG-ガイドRNA配列を含むカセットからのインビトロ転写を使用して転写することができる。

10

【0153】

本CRISPR/Casシステムの構成要素は、ナノ粒子または脂質エンベロープを使用して同時にデリバリーされ得る。例えば、Su X, Fricke J, Kavanaugh DG, Irvine DJ ("In vitro and in vivo mRNA delivery using lipid-enveloped pH-responsive polymer nanoparticles" *Mole Phar.* 2011 Jun 6; 8(3):774-87. doi: 10.1021/mp100390w. Epub 2011 Apr 1)には、リン酸脂質二分子膜によって覆われたポリ(p-アミノエステル)(PBAE)コアを有する生体分解性コアシェル構造化ナノ粒子について記載されている。これらは、インビトロmRNAデリバリーのために開発された。pH応答性PBAE構成要素は、エンドソーム崩壊を促進するように選択されたが、その一方で、脂質表面層は、ポリカチオンコアの毒性を最小化するように選択された。したがって、それらは、本発明のRNAのデリバリーにとって好ましい。

20

【0154】

一実施形態において、自己集合生体粘着性ポリマーをベースとするナノ粒子が想到され、それらは、ペプチドの経口デリバリー、ペプチドの静脈内デリバリー、およびペプチドの経鼻デリバリー、脳への全てに適用され得る。他の実施形態、例えば、疎水性薬物の経口吸収および眼球デリバリーなど、も想到される。分子エンベロープ技術は、保護され、ならびに疾患の部位にデリバリーされる、操作されたポリマーエンベロープを伴う(例えば、Mazza, M. et al. *ACS Nano*, 2013. 7(2):1016-1026; Siew, A., et al. *Mol Pharm*, 2012.9(1):14-28; Lalatsa, A., et al. *J Contr Rel*, 2012. 161(2): 523-36; Lalatsa, A., et al., *Mol Pharm*, 2012. 9(6): 1665-80; Lalatsa, A., et al. *Mol Phar*, 2012. 9(6):1764-74; Garrett, NX., et al. *J. Biophotonics*, 2012. 5(56):458-68; Garrett, NX., et al. *J Raman Spect*, 2012. 43(5): 681-688; Ahmad, S., et al. *J Royal Soc Interface* 2010. 7:S423-33; Uchegbu, I.F. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006. 3(5):629-40; Qu, X., et al. *Biomacromolecules*, 2006. 7(12):3452-9 and Uchegbu, I.F., et al. *Int J Pharm*, 2001. 224:185-199を参照されたい)。標的組織に応じて、単回投与または複数回投与による約5 mg / kgの用量が想到される。

30

【0155】

US Patent Application 20110293703は、ポリヌクレオチドの投与においても特に有用であり、本発明のCRISPR/Casシステムをデリバリーするために適用され得る、リポイド化合物に関する。一態様において、マイクロ粒子、ナノ粒子、リポソーム、またはミセルを形成するために、アミノアルコールリポイド化合物が、細胞または対象にデリバリーされる薬剤と組み合わせられる。粒子、リポソーム、またはミセルによってデリバリーされる薬剤は、気体、液体、または固体の形態であり得、ならびに薬剤は、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、または小分子であり得る。アミノアルコールリポイド化合物は、粒子を形成するために、他のアミノアルコールリポイド化合物、高分子(合成または天然)、界面活性物質、コレステロール、炭水化物、タンパク質、脂質などと組み合わせられ得る。これらの粒子は、次いで、適宜、医薬組成物を形成するために薬学的賦形剤と組み合わせてもよい。

40

50

## 【0156】

US Patent Application 20130302401は、コンビナトリアル重合を使用して調製されたポリ(アミノアルコール)(PBAA)のクラスに関する。本発明のPBAAは、コーティング剤(例えば、医療装置またはインプラントのためのフィルムまたは多層フィルムのコーティング剤)、添加剤、材料、賦形剤、生物付着防止剤、マイクロパターンニング剤、および細胞カプセル化剤として生物工学および生物医学用途において使用され得る。表面コーティング剤として使用される場合、これらのPBAAは、それらの化学構造に応じて、インビトロおよびインビボの両方において異なるレベルの炎症を誘発した。このクラスの材料の大きな化学的多様性は、インビトロにおいてマクロファージの活性化を阻害するポリマーコーティング剤を識別することを可能にした。その上、これらのコーティング剤は、カルボキシル化されたポリスチレンマイクロ粒子の皮下移植の後、炎症細胞の漸増を減少させ、ならびに線維症を減少させる。これらのポリマーは、細胞カプセル化のための高分子電解質複合体カプセルを形成するために使用され得る。本発明は、例えば、抗菌コーティング剤、DNAもしくはsiRNAデリバリー、および幹細胞組織工学などの多くの他の生物学的用途も有し得る。US Patent Application No. 20130302401の教示は、本発明のCRISPR/Casシステムに適用され得る。

10

## 【0157】

別の実施形態において、脂質ナノ粒子(LNP)が、想到される。特に、脂質ナノ粒子にカプセル封入された抗トランスサイレチン低分子干渉RNA(例えば、Coelho et al., N Engl J Med 2013; 369:819-29を参照されたい)は、本発明のCRISPR/Casシステムに適用され得る。

20

## 【0158】

LNPの電荷は考慮に入れなければならない。細胞内デリバリーを促進する非二分子層構造を誘導するために、カチオン性脂質が、負に帯電した脂質と組み合わせられるためである。帯電したLNPは、静脈内注射の後、循環器から急速に除去されるため、7未満のpKa値を有するイオン化可能なカチオン性脂質が開発された(例えば、Rosin et al, Molecular therapy, vol. 19, no. 12, pages 1286-2200, Dec. 2011を参照されたい)。siRNAオリゴヌクレオチドなどの負に帯電した高分子は、イオン化可能な脂質が正の電荷を示す低いpH値(例えば、pH4)においてLNPに負荷され得る。しかしながら、生理的pH値において、LNPは、より長い循環時間に適合する低い表面電荷を示す。イオン化可能なカチオン性脂質の4つの種、すなわち、1,2-ジリノレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DLiNDAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLiNDMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-ケト-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DLiNKDMA)、および1,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキソラン(DLiNKC2-DMA)、が注目されている。

30

## 【0159】

siRNAを伴う自己集合ナノ粒子は、例えば、インテグリンを発現する腫瘍血管新生を標的にする手段として、ポリエチレングリコール(PEG)の遠位末端に取り付けられたArg-Gly-Asp(RGD)ペプチドリガンドによってペグ化されたポリエチレンイミン(PEI)で構築され得、ならびに血管内皮成長因子受容体2(VEGFR2)の発現を阻害し、それにより腫瘍血管新生を阻害するsiRNAをデリバリーするために、使用され得る(例えば、Schiffelers et al., Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, No. 19を参照されたい)。ナノプレックスは、イオン化可能な窒素(ポリマー)の正味のモル過剰量を2から6の範囲においてホスフェート(核酸)に与えるように、カチオン性ポリマーおよび核酸の水溶液の等量を混合することによって、調製され得る。カチオン性ポリマーと核酸との間の静電相互作用は、結果として、約100nmの平均粒子サイズ分布でのポリプレックスの形成を生じ、したがって、それらはナノプレックスと呼ばれた。

40

50

## 【0160】

エキソソームは、RNAおよびタンパク質を輸送する内因性ナノ小胞であり、低分子干渉 ( si ) RNA をマウスの脳にデリバリーすることができる。免疫原性を減少させるために、Alvarez-Ervitiら ( 2011, Nat Biotechnol 29: 341 ) は、エキソソーム作製のために自己由来の樹状細胞を使用した。

## 【0161】

ある特定の実施形態において、本発明は、それを必要とする対象 ( 例えば、哺乳動物またはヒト ) または非ヒト対象 ( 例えば、哺乳動物 ) における、関心対象の mRNA の標的配列における欠陥によって引き起こされる状態を治療または阻害する方法であって、標的配列の操作によって対象または非ヒト対象を改変することを含む方法を提供し、この場合、状態は、その発現のために組成物を作動可能にコードする1つまたは複数のAAVまたはレンチウイルスベクターを含むAAVまたはレンチウイルスベクターシステムを含む天然に存在しないまたは操作された組成物をデリバリーすることを含む治療を提供することを含む、標的配列の操作による治療または阻害の影響を受けやすく、この場合、標的配列は、発現したときに組成物によって操作され、組成物は、( A ) 非天然核酸ガイド結合タンパク質ドメインと、核酸ガイドと、特異的RNA結合ドメインと、スプライスドナーおよび/またはスプライサクセプターおよびストリンジェントな条件下において特異的RNA結合ドメインにハイブリダイズするRNA配列を含む修復鋳型とを含む標的化トランススプライシングシステムを含む1つまたは複数のベクターを含むベクターシステムを含む天然に存在しないまたは操作された組成物を含む。

## 【0162】

細胞のターゲティング

本明細書は、プレmRNAに対するトランススプライシング事象を媒介するために、適切な位置 ( すなわち、関心対象の器官または組織内の細胞 ) へのCRISPR/Casシステムのデリバリーによって分裂終了細胞においてプレmRNAを標的にするためのCRISPR/Casシステムの使用を支援する。

## 【0163】

ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムはさらに、細胞を含む。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、RNAを標的にする。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、細胞のRNAと関連している。ある特定の実施形態において、RNAは、プレmRNAである。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、イントロン-エキソン接合部でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、エキソン-イントロン接合部でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、プレmRNAの3'末端でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。プレmRNAの3'末端をターゲティングする配列の例としては、これらに限定されるわけではないが、本明細書において開示されるように、配列番号70が挙げられ得る。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、3'非翻訳領域 ( UTR ) 内でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。3'UTR内でのトランススプライシングは、結果として得られたmRNAのより強力な翻訳を生じ得る。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、プレmRNA内の内部部位でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。プレmRNA内の内部部位をターゲティングする配列の例としては、これらに限定されるわけではないが、本明細書において開示されるように、配列番号92が挙げられ得る。様々な実施形態において、CRISPR/Casシステムは、5'非翻訳領域 ( UTR ) 内でのプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。mRNAの3'および5'UTRは、複数の調節因子を含むことが知られており、ならびにmRNAの安定化およびタンパク質へのmRNAの翻訳にとって重要である。Warrenら ( Cell Stem Cell, Volume 7, pages 618-630 ( 2010 ) 、なお、文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる ) は、誘導された多分化

10

20

30

40

50

能性幹細胞への線維芽細胞の再プログラミングの際のタンパク質産生を向上させるために、強力なコザック翻訳シグナルおよびアルファグロビン3'UTRを含む人工5'UTRを使用した。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、翻訳の強度を変更するために3'UTR配列を提供するようにトランススプライシングを媒介することができ、場合によって、それは、より強力な翻訳およびタンパク質産生の著しい増加につながり得る。例えば、これらに限定されるわけではないが、AGXT、ALB、APOA2、ASL、C3、CYP2E1、FBA、HPX、および/またはORMなどの遺伝子由来の3'UTRは、翻訳の強度を変更するために使用することができる。例えば、これらに限定されるわけではないが、AGXT、ALB、APOA2、ASL、C3、CYP2E1、FBA、HPX、および/またはORMなどの遺伝子由来の5'UTRも、翻訳の強度を変更するために使用することができる。

10

**【0164】**

ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、細胞のDNAと関連している。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、細胞のDNAと関連していない。

**【0165】**

ある特定の実施形態において、トランススプライシングシステムは、細胞内に導入される。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、細胞の核におけるプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、細胞の細胞質におけるプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。本発明の別の態様において、細胞におけるプレmRNAに対する標的化トランススプライシング事象を媒介する方法であって、標的化トランススプライシングCRISPR/Casシステムを細胞に導入することを含み、システムが、ヌクレアーゼ不活性核酸ターゲティングCRISPR/Casシステムと、関心対象の核酸遺伝子座に特異的にハイブリダイズする核酸ガイドと、特異的RNA結合ドメインと、ストリンジェントな条件下において特異的RNA結合ドメインにハイブリダイズするRNA配列を含む修復鋳型とを含む、方法が、本明細書において提供される。

20

**【0166】**

II型、より近年ではV型、のCRISPRシステムを使用する遺伝子編集は、2つの経路：非相同末端結合(NHEJ)または相同組換え修復(HDR)、のどちらかによって達成することができる。NHEJは、細胞が活発に分裂することを必要としないが、HDRは、分裂細胞においてのみ活性である。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、細胞の核におけるプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。ある特定の実施形態において、CRISPR/Casシステムは、細胞の細胞質におけるプレmRNAのトランススプライシングを媒介する。細胞は、分裂細胞または分裂終了細胞であり得る。ある特定の実施形態において、分裂終了細胞は、単に1つの分裂終了細胞または複数の分裂終了細胞、あるいは器官それ自体またはその内の組織であり得る。ある特定の実施形態において、分裂終了細胞は、ニューロン、筋細胞、および脂肪細胞からなる群から選択することができる。分裂終了細胞は、脊椎動物、患者(トランススプライシング媒介性治療を必要とする動物の意味において)またはモデル有機体のどちらかの内に含ませられ得るか、または細胞培養物、オルガノイド、または他のエキスピボ組織、例えば、肝細胞が播種され足場上において増殖されるような「チップ上の肝臓」、に存し得る。生物学に適用される三次元印刷技術の開発により、印刷された組織は、実現可能な範囲にあり、ならびにオルガノイドを作製するためにまたはチップ上に、この方法で印刷された肝臓の細胞または組織も標的にすることは、完全に実現可能である。非肝臓代替物も、特に他の分裂終了細胞/組織に対して想定される。

30

40

**【0167】**

したがって、本CRISPR-Casシステムがデリバリーされた分裂終了細胞、例えば、ニューロンまたは腎臓細胞など、を含むモデル有機体が提供される。そのようなコレクションは、分裂後器官、オルガノイド、または足場に生息する細胞(「チップ上の腎臓

50

」を含み得る。

【0168】

特に、そのような分裂終了細胞は、Cas酵素を発現することができるポリヌクレオチドを発現し得るかまたは含み得る。本明細書において説明されるように、このことは、プレmRNAの標的化トランスプライシングによって遺伝子産物の機能を調べるために準備のできたモデルを提供する利点を有する。これは、分裂終了細胞、例えば、腎臓または脳など、例えば、本明細書において列挙されるものなど、の状態、ならびに広範な状態、例えば、肥満など、の研究において特に有用である。

【0169】

1つまたは複数の分裂終了細胞において転写物摂動を誘導する方法であって、本発明によるCRISPR/Casシステムによって細胞の集団を形質導入し、それによって細胞の集団の転写物を変更することを含む方法も提供される。方法は、エクスピボまたはインピトロにおいてであり得、例えば、細胞培養あるいはエクスピボまたはインピトロモデル（例えば、オルガノイドなど）においてであり得る。あるいは、方法は、インピボにおいてであり得、その場合、方法は、対象から細胞の集団を単離すること、および細胞の集団を対象に移植する（戻す）ことも含み得る。転写物摂動は、1つまたは複数、または2つ以上、または3つ以上、または4つ以上の遺伝子に対してであり得る。しかしながら、細胞が既にCasを含む場合、タンパク質として発現されるかまたは既に細胞内に含まれるポリヌクレオチドによってコードされるかにかかわらず、CRISPRポリヌクレオチドのみがデリバリーされる必要がある。方法は、分裂終了細胞からの抽出、ならびに適宜、分裂終了細胞内への再挿入を含み得る。デリバリーすることは、細胞の核へのポリヌクレオチドの実際の物理的デリバリーだけでなくトランスフェクションも意味する。したがって、デリバリーは、特に明記されない限り、トランスフェクションも含むとして読まれるべきである。

【0170】

遺伝子治療

説明される本発明は、非分裂細胞でのトランスプライシングを媒介するために使用することができるため、ある特定の実施形態において、細胞は、疾患または障害を患う対象に存する。ある特定の実施形態において、疾患または障害は、神経変性の、神経学的な、または神経筋の疾患または障害である。ある特定の実施形態において、疾患または障害は、脊髄筋萎縮症、レット症候群、アンジェルマン症候群、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン舞蹈病、前頭側頭認知症、リソソーム蓄積症、多発性硬化症、および筋萎縮性側索硬化症（ALS）からなる群から選択される。

【0171】

本明細書において採用されるアプローチは、本発明が、遺伝子治療に適用できることを実証する。例えば、1つまたは複数の欠損性遺伝子型（例えば、単一の点突然変異）の修正は、本明細書において説明される分裂終了細胞での本CRISPR-Casシステムの使用によって達成可能である。分裂後に関連する一遺伝子性の状態は、特に好ましく、ならびに本明細書において例示される。

【0172】

1つのガイドを使用してもよいが、いわゆる、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上のガイドによる多重化は、複数の欠陥を有する遺伝子型（単一遺伝子における複数のエラーまたはいくつかの遺伝子にわたって広がる複数のエラー）が修正される遺伝子治療において特に有用である。

【0173】

したがって、ある特定の実施形態において、本発明は、関心対象のゲノム遺伝子座における標的配列の操作によって、有機体、例えば、ヒトなどの哺乳動物または非ヒト哺乳動物または有機体、の分裂終了細胞を改変する方法であって、その発現のための組成物を作動可能にコードする1つまたは複数のウイルスベクターまたはプラスミドベクターを含むウイルスベクターシステムまたはプラスミドベクターシステムを含む天然に存在しないま

10

20

30

40

50

たは操作された組成物をデリバリーすることを含み、組成物が、(A)非天然核酸ガイド結合タンパク質ドメインと、核酸ガイドと、特異的RNA結合ドメインと、スプライスドナーおよび/またはスプライサクセプターならびにストリンジェントな条件下において特異的RNA結合ドメインにハイブリダイズするRNA配列を含む修復鋳型とを含む標的化トランススプライシングシステムを含む1つまたは複数のベクターを含むベクターシステムを含む天然に存在しないまたは操作された組成物を含む、方法を提供する。

#### 【0174】

本明細書において説明されるトランススプライシングシステムは、分裂終了細胞における1つまたは複数の遺伝子の機能を調べるために使用することができる。これは、分裂終了細胞へのCRISPR/Casシステムのデリバリーおよび発現によって達成され得、この場合、CRISPR/Casシステムのガイドは、関心対象のプレmRNA標的にCRISPR/Casシステムを補充するように設計される。同様に、CRISPR/Casが、タンパク質(転写された)形態である既に分裂終了細胞内に含まれる場合、分裂終了細胞へのガイドのデリバリーは十分であろう。ここで、小分子によって誘導されたCRISPR/Casシステムを有することは、有利であり得る。CRISPR/Casが、ポリヌクレオチド(非転写)において、既に分裂終了細胞内に存する場合、分裂終了細胞へのガイドのデリバリーならびにCas9ポリヌクレオチドの転写の誘導は、必要であろう。ここで、CRISPR/Casシステムを誘導可能または抑制可能なプロモーター、例えば、tet(テトラサイクリン)オン-オフシステムなど、の制御下に置くことは、有利であり得る。

10

20

#### 【0175】

特に有望な一態様は、もしあれば、遺伝子摂動、とりわけノックダウン、の結果として生じる、表現型の変化を特定するための表現型アッセイとのCRISPR技術の統合である。CRISPR/Casシステムの使用は、標的にされたゲノム要素の機能を研究するために、生物化学的分析、配列決定分析、電気生理学的分析、および挙動分析と組み合わせることができる。

#### 【0176】

これは、一態様において、分裂終了細胞における1つまたは複数の遺伝子の機能を調べる方法であって、調整されたmRNAの発現を誘導すること、および状態において1つまたは複数の遺伝子に起因する表現型の変化を特定し、それにより、調整されたプレmRNAから翻訳された1つまたは複数のタンパク質の機能を調べることを含む方法が提供される。

30

#### 【0177】

以下は、本発明の適切な態様に広く適用される。細胞は、タンパク質の機能をインビボにおいて調べられるように、対象、例えば、ヒト、動物、またはモデル有機体など、に存し得るが、しかしながら、細胞が、エクスピボ、例えば、細胞培養物あるいはモデル器官またはオルガノイドに存し得ることも想定される。いくつかの実施形態において、方法は、対象由来の細胞の最初の集団の単離、適宜それらを培養すること、ならびにそれらを1つまたは複数のCRISPR/Casシステムによって形質導入すること、を含み得る。さらに、適宜培養することも後続し得る。次いで、対象に戻される形質導入された細胞の移植が行われ得る。

40

#### 【0178】

細胞は、本明細書において説明される任意の組織または有機体に由来し得る。脳は、好ましい例の1つであり、1つまたは複数の遺伝子産物、例えば、プレmRNAなど、の機能を調べる方法を提供し、この場合、分裂終了細胞は、脳細胞、例えば、ニューロン、である。特にインビボにおいて、これは、動物行動における突然変異したまたは改変されたタンパク質の機能の調査を可能にする。動物は、好ましくは哺乳動物、例えば、齧歯動物である。異種細胞タイプの複雑なネットワークからなる神経系の複雑さを考慮すると、インビボでニューロンのプレmRNAを効率的に編集できるようにすることは、天然環境に組み込まれた関連する細胞タイプにおける遺伝子機能の直接的検証を可能にする。

50

## 【0179】

## キット

本開示は、方法を実施するためのキットを提供する。一態様において、本発明は、上記の方法および組成物において開示される要素の任意の1つまたは複数を含むキットを提供する。いくつかの実施形態において、キットは、ベクターシステムおよびキットを使用するための取扱説明書を含む。いくつかの実施形態において、キットは、調節要素とCRISPR/Casトランススプライシングシステムをコードするポリヌクレオチドとを含むベクターシステムを含む。いくつかの実施形態において、キットは、CRISPR/Casトランススプライシングシステムのウイルスデリバリーシステムを含む。いくつかの実施形態において、キットは、CRISPR/Casトランススプライシングシステムの非ウイルスデリバリーシステムを含む。要素は、個別にまたは組み合わせて提供され得、ならびに任意の好適な容器、例えば、バイアル瓶、ボトル、または管など、において提供され得る。いくつかの実施形態において、キットは、1つまたは複数の言語、例えば、2つ以上の言語による取扱説明書を含む。

10

## 【0180】

いくつかの実施形態において、キットは、本明細書において説明される要素の1つまたは複数を用いるプロセスにおける使用のための1つまたは複数の試薬を含む。試薬は、任意の好適な容器において提供され得る。例えば、キットは、1つまたは複数の反応緩衝液または貯蔵緩衝液を提供し得る。試薬は、特定のアッセイにおいて使用可能な形態において、または使用前に1つまたは複数の他の構成要素の追加を必要とする形態において（例えば、濃縮形態または凍結乾燥形態）、提供され得る。緩衝液は、任意の緩衝液であり得、例えば、これらに限定されるわけではないが、炭酸ナトリウム緩衝液、重炭酸ナトリウム緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、MOPS緩衝液、HEPES緩衝液、およびそれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態において、緩衝液は、アルカリ性である。いくつかの実施形態において、緩衝液は、約7から約10のpHを有する。いくつかの実施形態において、キットは、ガイド配列と調節要素とを作用可能に連結するために、ベクター内への挿入のためのガイド配列に対応する1つまたは複数のオリゴヌクレオチドを含む。

20

## 【0181】

本発明は、以下の実験例を参照することによって詳細にさらに説明される。これらの実施例は、単に本発明のある特定の態様および実施形態を例示する目的において含まれ、本発明を限定することを意図するものではない。したがって、本発明は、以下の実施例に限定されると決して解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書において提供される教示の結果として明白となるあらゆる変形例を包含すると解釈されるべきである。

30

## 【実施例】

## 【0182】

## [実施例1]

## CRISPRベースのトランススプライシングシステムの操作

CRISPRベースのトランススプライシングシステムを、ガイドRNA、例えば、ガイドRNA (gRNA) など、ms2ヘアピンによって操作されたイントロンにコンジュゲートされた関心対象のエキソンまたはエキシソンの群、およびMS2結合タンパク質に連結された触媒的不活性なCas13b (dCas13) を含むように操作した (図1A)。トランススプライシングシステムのアセンブリーは、gRNA足場を認識するdCas13bおよび操作されたイントロンのms2ヘアピンを認識するMS2結合タンパク質を頼りにする (図1B)。シススプライシング反応 (図1C) を誘導する代わりに、CRISPR-dCas13bシステムは、図1Dに示された内因性スプライソソームベースの反応と同様に、トランススプライシング事象を誘導する。CRISPR/Casベースのシステムにおいて、トランススプライシング事象は、上記において説明したCRISPR-dCas13bアセンブリーがpre-mRNAに結合するとき、MS2結合タンパク質に連結されたdCas13bがpre-mRNAに結合するとき、シススプライシング

40

50

アクセプターはブロックされる。MS2結合タンパク質は、関心対象のトランススプライシングRNA分子をつなぎ留め、ならびに標的プレmRNAへのdCas13bの結合により、トランススプライシングRNAをプレmRNAに向かわせる。これは、非常に効率的なトランススプライシングを可能にする(図1E)。

#### 【0183】

実践するためにCRISPR媒介トランススプライシングを減じるために、いくつかのDNAコンストラクトを利用した。最初に、細胞においてgRNAの発現を駆動するために、プレボテラ属(*Prevotella* sp.) Cas13b (PspCas13b) RNA足場を伴うU6プロモーター駆動gRNAコンストラクトを使用した。dCas13bを、SV40核局在化シグナル(SV40NLS)およびグリシン-セリンリンカーによってMS2結合タンパク質に連結させた。コンストラクトの安定な発現を可能にするために、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル(bGHpA)を使用した。トランススプライシングのために測定することができるプレmRNAの発現を生じさせるために、スプライズドナーを使用した。スプライズドナーの発現を検証するために、マーカーとして青色蛍光タンパク質(BFP)を使用し、トランケートされたGFP(5' GFP)に対して自己切断p2Aリンカーを使用した。スプライズアクセプターが確実にトランススプライシングを受けるようにするために、安定な発現を確保するために、マトリックスメタロペプチダーゼ9(MMP9)イントロン1およびエキソン2を下流に位置し、その後bGHpAを位置した。トランススプライシングが完全なGFPを生じるように(それは、フローサイトメトリーによって観察することができる)、スプライズアクセプターを設計した。設計されたms2イントロンは、i)スプライズドナーレポーターにおけるMMP9イントロン1にハイブリダイズする結合ドメイン(BD)、ii)2つのms2ループ、iii)分岐点(BP)、およびiv)ポリピリミジン領域(PPT)、それに続くv)スプライズアクセプター配列からなる。トランケートされたGFPの第2の半分をms2イントロンの後ろに位置し、その後逆転写プライマー結合部位(RT)を位置し、これは、RNAseqによってトランススプライシングを検証するための次世代配列決定ライブラリー(NGS)の生成を可能にした。スプライズアクセプターレポーターの発現を確認するため、mCherryの翻訳を駆動するために内部リボソーム侵入部位(IRES)を使用し、これは結果として、トランススプライシングから独立してフローサイトメトリーによるmCherry測定を可能にした。最後に、CRISPR媒介トランススプライシングの効率に対するms2ループの効果を測定するために、ms2ヌル(2x ms2)スプライズアクセプターレポーターを使用した。

#### 【0184】

成功したトランススプライシングに関して、スプライズドナーおよびアクセプターレポーターによって導入されたトランケートされたGFPエキソン(5' GFP、3' GFP)と一緒にスプライズし、これは、機能性GFPタンパク質産物を作り出すことができる完全なGFPmRNA配列を含む転写物を生じた(図2B)。それぞれスプライズドナー(SD)およびスプライズアクセプター(SA)レポーターの両方の発現を検証するために、フローサイトメトリーを使用してBFP+およびmCherry+に対して細胞をゲーティングした。ゲーティングした二重陽性BFP+mCherry+集団から、GFP+である細胞のフラクションによって、トランススプライシング活性を測定した。

#### [実施例2]

#### 【0185】

CRISPR媒介トランススプライシングの測定

HEK293FT細胞を、12ウェルプレート形式において、1条件あたり合計で1250ngのDNAおよび4μLのリボフェクタミン2000によってトランスフェクトした。4未満の構成要素がデリバリーされる条件において非コードコントロールDNAとして使用したpUC19を除いて、各コンストラクトは総DNAトランスフェクションの1/4であった。合計で1250ngのDNAがデリバリーされた。トランスフェクションの6時間後に培地を変え、トランスフェクションの48時間後にフローサイトメトリーに

10

20

30

40

50

よって細胞を分析した。ネガティブコントロール（図3Aの1～5の列）は、GFPレポーターアッセイによるトランススプライシングの検出はなかったことを示した。トランススプライシングに対する現状技術水準を表す列6は、BFP+mCherry+細胞の0.69%±0.08%（平均±SD、n=4）においてトランススプライシングの検出につながった。CRISPR媒介トランススプライシング（列11）は、BFP+mCherry+細胞の19.58%±1.01%（平均±SD、n=4）でのトランススプライシングの検出につながり、これは、28.03±1.45倍の増加であった。予想されるように、CRISPR媒介トランススプライシングは、ms2ヌル（2xms2）SAレポーター（列12）を用いた場合、効率の著しい減少を有した。興味深いことに、dCas13b-MS2およびgRNAが2.45±0.45倍（p=0.00074）発現されない場合（列6）と比較して、トランススプライシングは著しく増加し、これは、SAへのdCas13bの結合が、シススプライシングを防ぎ、その結果、シススプライシングのためのさらなるエキソンが存在しない状況においてトランススプライシングが促進されることを示唆していた。

10

#### 【0186】

SAレポーター-mRNA上のRT部位に結合する逆転写プライマーを使用してSAレポーター上において逆転写を実施することによって、RNAseqライブラリーを作製した。RT部位は、最終ライブラリーのリード1がGFPの3'末端であるように、TruSeqアダプター配列も運ぶように設計した。リード2配列決定アダプターは、タグメンテーションによってランダムに挿入した。リード1をGFPの3'末端に一致させることによってリードをフィルターにかけた。次いで、SDおよびSAレポーターと連結された全トランスクリプトーム参照に対して、BWAを使用してリード2を整列させた。SDレポーターにマッピングするリードの数をトランスクリプトーム（SDレポーターを含む）に整列するがSAレポーターには整列しない全リードの数で割ることによって、オンターゲットフラクション（プロットした）を算出した（図3B）。

20

#### [実施例3]

#### 【0187】

オンターゲットトランススプライシングを測定するためのRNAseqライブラリーの作製

SAレポーターのRTによって作製したRNAseqライブラリーを、リード2のマッピング位置に対して解析した。予想されるように、リード2は、SDレポーターのエキソン領域への高いマッピングを示し、トランススプライシングを実証した。対照的に、1つのリードのみがMMP9イントロンおよびMMP9エキソン2にマッピングし、それらはおそらく、インデックスホッピングまたはキメラ事象に由来した（図4A）。

30

#### 【0188】

SDレポーターのシススプライシングを検証するために、ポリ(A)テールの逆転写によってRNAseqライブラリーを作製した。予想されるように、リードの数が、イントロン領域（MMPイントロン1）では低く、エキソン領域（BFP-2A-5'GFPおよびMMP9エキソン2）では高いときに、シススプライシングが観察された（図4B）。

40

#### 【0189】

CRISPR媒介トランススプライシングに対するgRNA設計制限をよく理解するために、SDレポーターにおける異なる領域を標的にするよういくつかのgRNAを設計した。gRNA1～4は、SA部位を標的にしたが、その一方で、gRNA5および6は、イントロンを標的にした。gRNA7および8は、MMP9エキソン2を標的にしたが、その一方で、gRNA9および10は、bGHPAを標的にした。gRNA11および12は、最初のエキソンのBFPを標的にした（図5）。

#### 【0190】

トランケートされたGFPトランススプライシングレポーターアッセイを使用して、標的化トランススプライシングを測定した。1条件あたり3つの生物学的反復において、ト

50

ランスフェクトされた細胞に対してフローサイトメトリーを実施した。スプライスアクセプター部位を標的にする gRNA を使用する場合、CRISPR 媒介トランススプライシングは、スプライスアクセプター部位を標的にするように設計された gRNA によってトランススプライシング効率を約 50 倍改善した。この場合、最も効果的な gRNA (gRNA 4) は、スプライスアクセプター部位への 3' ガイドマッピングを有する。予想されるように、SD レポーターの交互の領域に対して CRISPR システムをターゲティングすることにより、結果として、トランススプライシング効率においてわずかな利得を生じる (図 6 A)。

#### 【0191】

dCas13b - MS2 を除いて、トランケートされた GFP トランススプライシング レポーターアッセイによって測定した場合、標的化トランススプライシングにおける倍率増加はわずかである (図 6 B)。1 条件あたり 3 つの生物学的反復において、トランスフェクトされた細胞に対してフローサイトメトリーを実施した。

#### [実施例 4]

#### 【0192】

小分子によって誘導されたトランススプライシング

小分子によってトランススプライシングを誘導するようにトランススプライシング dCas13b 複合体を変更することができるか否かを調べるために、両方ともグリシン - セリンリンカーによって、dCas13b を ABI1 に融合させ、MS2 を PYL1 に融合させた (図 8)。このアーキテクチャーにより、機構が ABA の存在下において組み上がるため、アブジジン酸 (ABA) の導入によってトランススプライシングを一過性において誘導できると仮定した。単一の発現カセットによってデリバリーされるコンストラクトは、CMV - dPspCas13b ABI1 - 2A - PYL1 - MS2 であった。フローサイトメトリーによる GFP 測定によってトランススプライシング活性を測定するために、スプリット GFP レポーターを用いた。

#### 【0193】

上記において説明されるコンストラクトを使用して、1.5 mM の ABA の存在下においてスプリット GFP レポーターをトランススプライシングしたところ、結果として、細胞の > 40% が GFP+ となった (図 8 B)。製造元の取扱説明書により、HEK293FT 細胞をリポフェクタミン 2000 を使用してトランスフェクトし、トランスフェクションの 72 時間後にフローサイトメトリーを実施した。多重試料に対して ABA を滴定し、ABA 濃度あたり 3 つの生物学的反復をフローサイトメトリーによって測定した。ABA が誘導された標的化トランススプライシングを制御することができることを実証するために、ABA の存在下においてスプリット GFP レポーターをトランススプライシングし、GFP 翻訳における倍率変化を、ABA 濃度によってきっちりと制御した (図 8 C)。

#### [実施例 5]

#### 【0194】

スプライス接合部でのトランススプライシングの測定

エキソン接合を測定するために、dCas13b - MS2、gRNA、およびスプリット GFP レポーターシステム (SD レポーター、2x ms2 を伴う SA レポーター) を用いてトランスフェクトした 293FT 細胞において、全長 RNAseq を実施した。それぞれ、スプライスドナー (SD) およびスプライスアクセプター (SA) レポーターの両方の発現を検証するために、フローサイトメトリーによって、BFP+ および mCherry+ に対して細胞をゲートし、次いで、RNAseq ライブラリー構築の前に、細胞を溶解させるために TCL 緩衝液へとソートした。全ての可能な接合部にまたがる RNAseq リードを、正規表現を使用してフィルターにかけ、それに続いて、全ての可能な接合配列、すなわち、トランススプライシングされた接合部 (TS)、シススプライシングされた接合部 (CS)、およびスプライシングされない接合部 (NS)、の上にマッピングした。可能な接合部にまたがるリードを例示するために、マッピング位置をプロットした (図 9 A)。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 9 5 】

全ての可能な接合部にまたがる全長RNAseqリードを、正規表現を使用してフィルターにかけ、それに続いて、全ての可能な接合配列、すなわち、トランススプライシングされた接合部(TS)、シススプライシングされた接合部(CS)、およびスプライシングされない接合部(NS)、の上にマッピングした。トランススプライシングされた、スプライスされたリードのフラクションを算出し、全てのトランスフェクション条件に対してプロットした(図9B)。全ての可能な接合部にまたがる全長RNAseqリードを、正規表現を使用してフィルターにかけ、それに続いて、全ての可能な接合配列、すなわち、上記のようなTS、CS、およびNS、の上にマッピングした。シススプライシングされた、スプライスされたリードのフラクションを算出し、全てのトランスフェクション条件に対してプロットした(図9C)。結果は、レポーターが効率的なスプライシングを受けること、およびdCas13がターゲティングgRNAの存在下においてシススプライシングを阻害することを示している。

10

## [ 実施例 6 ]

## 【 0 1 9 6 】

標的化トランススプライシングのための戦略

図10Aは、トランススプライシングの5'ターゲティングのための戦略を示している。この戦略の場合、dCas13bMS2またはアナログは、同時にRNAの5'修正または改変のための5'修復鋳型を提供しつつ、スプライドナー(SD)を標的にすることができる。そのような戦略は、修正または改変が、mRNAの5'末端近傍の場合、有利であり得る。図10Bは、内部標的化トランススプライシング戦略を示している。dCas13b-MS2またはアナログは、同時にエキソンまたはエキソンの群を伴う修復鋳型を提供し、スプライスアクセプターおよびスプライドナーの両方を処理しつつ、スプライスアクセプターおよびスプライドナーの両方を標的にすることができる。図10Cは、トランススプライシングの3'ターゲティングのための戦略を示している。この戦略の場合、スプライスアクセプター(SA)をターゲティングする、dCas13b-MS2またはアナログと共に、RNAの3'修正または改変のために、3'修復鋳型が提供され得る。そのような戦略は、修正または改変が、mRNAの3'末端近傍の場合、有利であり得る。

20

## [ 実施例 7 ]

## 【 0 1 9 7 】

内部エキソン修復

図11Aは、内部エキソン修復に使用されるコンストラクトを示している。CRISPR媒介トランススプライシングによって内部エキソン修復が可能であるか否かを調べるために、CMV-dPspCas13b-MS2と共に標準的gRNAコンストラクトを使用した。GFPを3つのエキソンに分割し、標的RNA分子設計においてGFPエキソン1および3を利用した。病原性エキソンをシミュレートするために、MMP9エキソン2を、対応する隣接イントロン：MMP9イントロン1およびMMP9イントロン2と共に、標的分子上のGFPエキソン1および3の間に位置した。それぞれがms2ヘアピンを伴う2つの合成イントロンによって隣接されるGFPエキソン2を有するように、内部修復鋳型を設計した。

30

40

## 【 0 1 9 8 】

図11Bは、内部エキソン修復をモニターするためのアッセイを示している。標的転写物は、青色蛍光タンパク質(BFP)の発現によってモニターされる。GFPの中央エキソン(GFPエキソン2)が転写物から失われているため、標的転写物を発現する細胞は、GFPネガティブである。内部エキソン修復に関して、修復鋳型からのGFPエキソン2は、完全なGFPmRNAを作り出すためにトランススプライシングされ、BFP部分は、T2A自己切断ペプチドによって失われる。GFPmRNAの存在は、GFPタンパク質の翻訳および発現につながり、それらは、フローサイトメトリーによって測定することができる。

50

## 【 0 1 9 9 】

図 1 1 C は、内部エキソン修復の後の G F P 発現のリードアウトである。製造元の取扱説明書に従って、2 9 3 F T 細胞をリポフェクタミン 2 0 0 0 を使用してトランスフェクトし、各条件に対して 4 つの生物学的反復において、細胞を 9 6 ウェル形式においてトランスフェクトした ( 1 ウェルあたり 1 0 0 n g ) 。トランスフェクションの 4 8 時間後にフローサイトメトリーを実施した。スプライズドナー ( S D ) をターゲティングするいくつかの g R N A を設計し ( g R N A 1 ~ 5 をターゲティングする S D ) 、スプライズアクセプター ( S A ) ターゲティング g R N A と併せてデリバリーした。g R N A の不在下では、G F P + は検出されなかった。しかしながら、g R N A の導入に関して、G F P + 細胞は検出され、ならびに G F P + 細胞のフラクションは、スプライズドナーに対する g R N A の位置決めに応じて変わった。

10

## [ 実施例 8 ]

## 【 0 2 0 0 】

## C a s 1 3 オーソログの使用

C a s 1 3 d が C R I S P R 媒介トランススプライシングを生じ得るか否かを調べるために、d R f x C a s 1 3 d を d P s p C a s 1 3 b に対してベンチマークした。R f x C a s 1 3 d のために、4 つのガイドを設計し、それらは全て、標的レポーターにおけるスプライズアクセプター部位を標的にした。M S 2 を、2 つの異なる C a s 1 3 d アーキテクチャーの N 末端および C 末端に融合させた。製造元の取扱説明書に従って、2 9 3 F T 細胞をリポフェクタミン 2 0 0 0 を使用してトランスフェクトし、1 条件あたり 3 つの生物学的反復において、細胞を 9 6 ウェル形式においてトランスフェクトした ( 1 ウェルあたり 1 0 0 n g ) 。トランスフェクションの 4 8 時間後にフローサイトメトリーを実施し、標的および修復鋳型レポーターの両方を有する細胞のみを考慮するために、細胞を B F P および m C h e r r y に対してゲートした。トランススプライシング頻度を特定するために、B F P + m C h e r r y + 細胞を G F P に対してゲートした。穏やかなトランススプライシングが、R f x C a s 1 3 d システムにおいて観察され、それは、P s p C a s 1 3 b システムによって非常に優秀であった ( 図 1 2 ) 。

20

## [ 実施例 9 ]

## 【 0 2 0 1 】

## C R I S P R トランススプライシングシステムの A A V ベースのデリバリー

C R I S P R システムが、マルチベクター A A V ベースのアプローチによってデリバリーすることができるか否かを調べるために、A A V パッケージングを可能にするために、個々の構成要素を A A V 2 I T R によって構築へとクローンした。1 5 0 m m 皿あたり 3 0 μ g の D N A により、3 : 5 : 6 の比率において、R e p 2 / C a p 8 ( p A A V 2 / 8 ) および A A V ヘルパープラスミド ( p A d D e l t a F 6 ) を用いて各トランスファーベクターを P E I 共トランスフェクトすることによって、A A V 2 / 8 を 2 9 3 F T 細胞において産生させた。トランスフェクションの 2 4 時間後に培地を変えて、トランスフェクションの 7 2 時間後に上澄みを収穫した。次いで、上澄みを 0 . 4 5 μ m 酢酸セルロースフィルターによってろ過し、4 において 3 0 分間かけて、4 0 0 0 r c f において 1 0 0 k D a の M W C O アミコンフィルターを使用することによって A A V を濃縮した。次いで、1 条件あたり 4 つの生物学的反復において、9 6 ウェルプレートにおいてウェルあたり 3 μ L の A A V を使用して 2 9 3 F T 細胞を懸濁液において形質導入した。C R I S P R 媒介トランススプライシングを測定するために、A A V 形質導入の 7 2 時間後にフローサイトメトリーを実施した。標的および修復鋳型レポーターの両方を有する細胞のみを考慮するために、細胞を B F P および m C h e r r y に対してゲートした。トランススプライシング頻度を特定するために、B F P + m C h e r r y + 細胞を G F P に対してゲートした。マルチベクター A A V アプローチによる C R I S P R システムのデリバリーは、フローサイトメトリーにおいて G F P + 蛍光によって測定した場合の、トランススプライシングにおける著しい増加を示した ( 図 1 3 ) 。

30

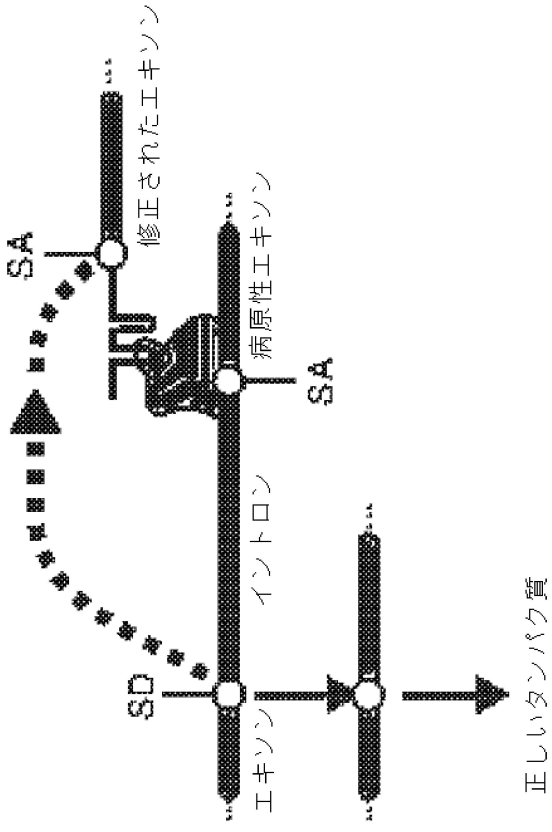
40

50





【 図 7 】



【 図 8 B 】

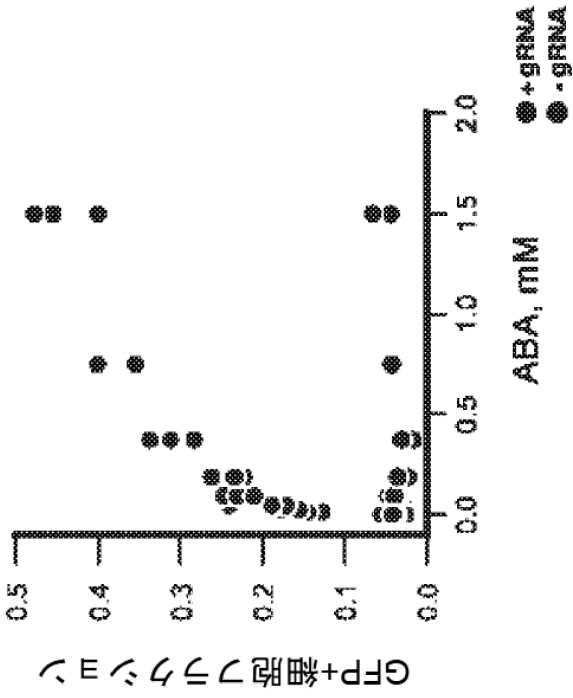


FIG. 7

【 図 8 A 】

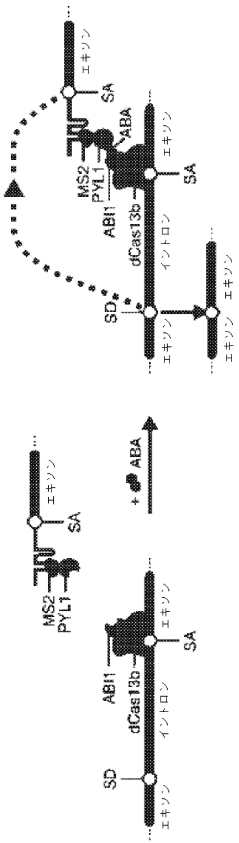


FIG. 7

FIG. 8A

【 図 8 C 】

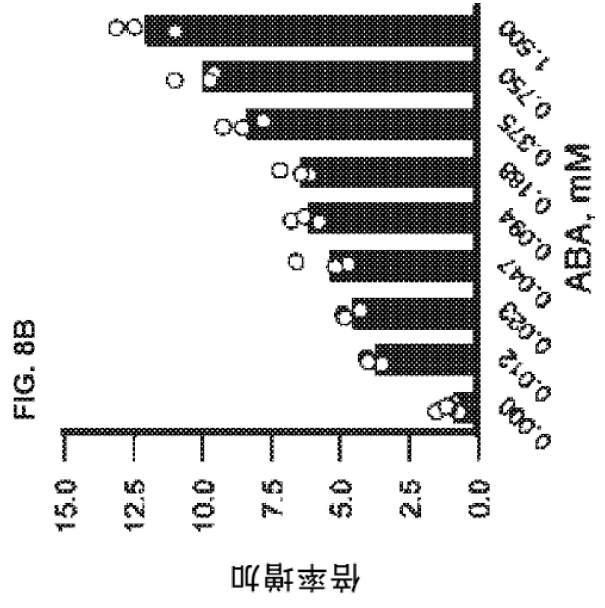


FIG. 8B

FIG. 8C

10

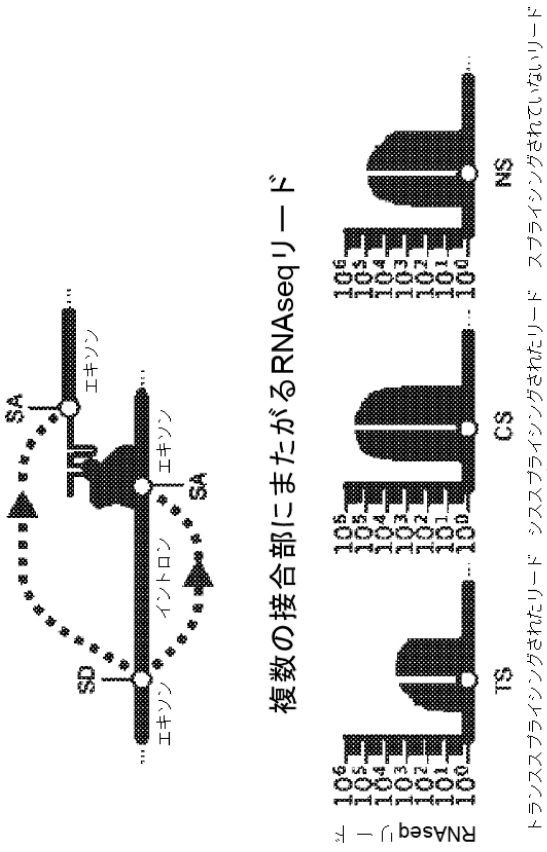
20

30

40

50

【 図 9 A 】



【 図 9 B 】

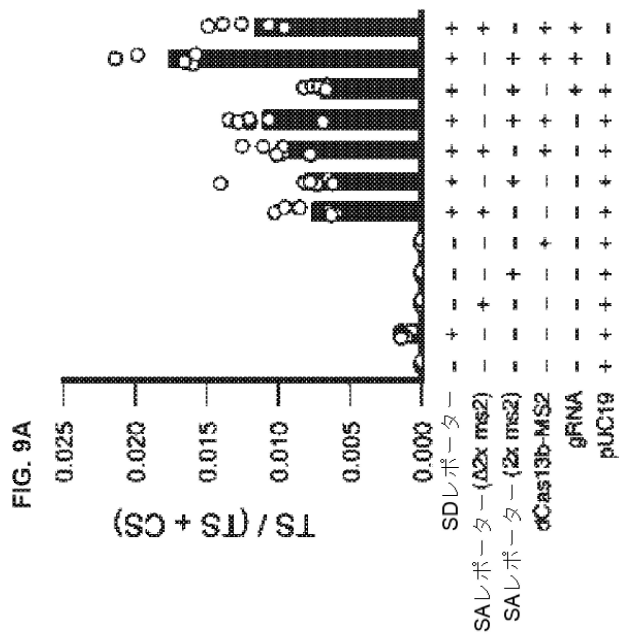
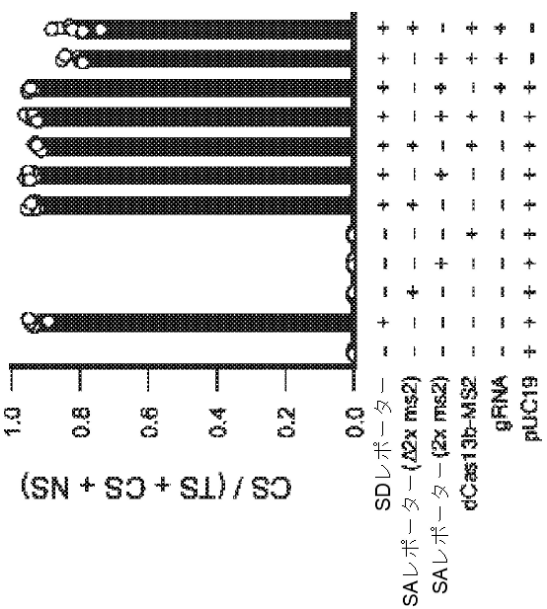


FIG. 9B

10

20

【 図 9 C 】



【 図 10 A 】

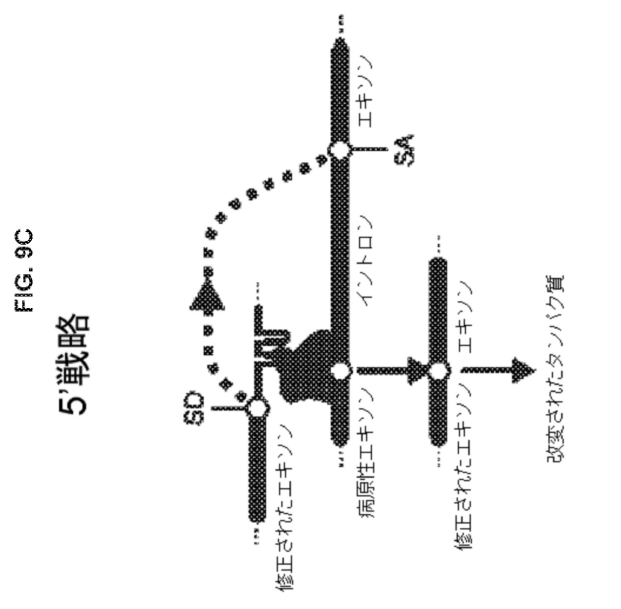


FIG. 10A

30

40

50





## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2020/046523

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N15/113 A61K48/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 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, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/09734 A2 (INTRONN HOLDINGS LLC [US]) 24 February 2000 (2000-02-24) the whole document	1-221
X	WO 2010/012472 A1 (BAUER JOHANN [AT]; MITCHELL LLOYD G [US]) 4 February 2010 (2010-02-04) the whole document	1-221
X	WO 2013/025461 A1 (VIRXSYS CORP [US]; MCGARRITY GERARD JOHN [US]) 21 February 2013 (2013-02-21) the whole document	1-221
	----- -/--	
<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		Date of mailing of the international search report
27 October 2020		04/11/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Spindler, Mark-Peter

2

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

page 1 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2020/046523

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAROON BUTT ET AL: "Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Using a Chimeric Single-Guide RNA Molecule", FRONTIERS IN PLANT SCIENCE, vol. 8, 24 August 2017 (2017-08-24), XP055456049, CH ISSN: 1664-462X, DOI: 10.3389/fpls.2017.01441 figures 1, 2 the whole document	1-221
A	----- WO 2018/071663 A1 (EMENDOBIO INC [US]) 19 April 2018 (2018-04-19) page 38; claim 25; figure 3C the whole document	1-221
A	----- WO 2019/040664 A1 (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI [US]) 28 February 2019 (2019-02-28) the whole document	1-221
A	----- SILVANA KONERMANN ET AL: "Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors", CELL, vol. 173, no. 3, 19 April 2018 (2018-04-19), pages 665-676, XP055529705, AMSTERDAM, NL ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.033 the whole document	1-221

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/046523

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0009734	A2	24-02-2000	AU 773186 B2	20-05-2004
			CA 2339300 A1	24-02-2000
			EP 1105513 A2	13-06-2001
			EP 1489185 A1	22-12-2004
			JP 4353390 B2	28-10-2009
			JP 2004504001 A	12-02-2004
			JP 2007312780 A	06-12-2007
			US 6280978 B1	28-08-2001
			WO 0009734 A2	24-02-2000
			WO 2010012472	A1
EP 2320952 A1	18-05-2011			
ES 2579477 T3	11-08-2016			
JP 5735912 B2	17-06-2015			
JP 2011529333 A	08-12-2011			
PL 2320952 T3	30-11-2016			
US 2013059901 A1	07-03-2013			
WO 2010012472 A1	04-02-2010			
WO 2013025461	A1	21-02-2013		
			CA 2844930 A1	21-02-2013
			EP 2742128 A1	18-06-2014
			HK 1199285 A1	26-06-2015
			JP 2014525754 A	02-10-2014
			SG 2014012207 A	29-05-2014
			US 2015025127 A1	22-01-2015
			WO 2013025461 A1	21-02-2013
			WO 2018071663	A1
US 2020123542 A1	23-04-2020			
WO 2018071663 A1	19-04-2018			
WO 2019040664	A1	28-02-2019	AU 2018320870 A1	27-02-2020
			CA 3072610 A1	28-02-2019
			CN 111328343 A	23-06-2020
			EP 3673055 A1	01-07-2020
			SG 11202001208X A	30-03-2020
			US 2019062724 A1	28-02-2019
			US 2019169595 A1	06-06-2019
			US 2019207890 A1	04-07-2019
			US 2020244609 A1	30-07-2020
			US 2020252359 A1	06-08-2020
			US 2020322297 A1	08-10-2020
			WO 2019040664 A1	28-02-2019

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 15/866(2006.01)  
 C 1 2 N 15/867(2006.01)  
 C 1 2 N 15/869(2006.01)  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
 A 6 1 K 31/711(2006.01)  
 A 6 1 K 31/7105(2006.01)  
 A 6 1 K 38/01 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 21/04 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/16 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/14 (2006.01)  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 21/02 (2006.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)  
 A 6 1 K 35/761(2015.01)  
 A 6 1 K 35/763(2015.01)  
 A 6 1 K 38/46 (2006.01)  
 A 6 1 K 9/51 (2006.01)  
 A 6 1 K 9/16 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/33 (2006.01)  
 C 0 7 K 14/005(2006.01)  
 C 1 2 N 5/0793(2010.01)  
 C 1 2 N 5/077(2010.01)

## F I

C 1 2 N 15/866 Z  
 C 1 2 N 15/867 Z  
 C 1 2 N 15/869 Z  
 C 1 2 N 5/10  
 A 6 1 K 31/711  
 A 6 1 K 31/7105  
 A 6 1 K 38/01  
 A 6 1 P 25/00  
 A 6 1 P 21/00  
 A 6 1 P 21/04  
 A 6 1 P 25/16  
 A 6 1 P 25/28  
 A 6 1 P 25/14  
 A 6 1 P 43/00 1 0 5  
 A 6 1 P 21/02  
 A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 K 35/76  
 A 6 1 K 35/761  
 A 6 1 K 35/763  
 A 6 1 K 38/46  
 A 6 1 K 9/51  
 A 6 1 K 9/16  
 C 1 2 N 15/33  
 C 0 7 K 14/005  
 C 1 2 N 5/0793  
 C 1 2 N 5/077

## テーマコード(参考)

4 H 0 4 5

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D  
 K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O  
 A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B  
 B,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,IT,JO,JP,KE,KG,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,NI,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,Z  
 W

弁理士 白江 雄介

## (72)発明者

ボラホ , ジェイコブ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 7 7  
 、マサチューセッツ・インスティテュート・オブ・テクノロジー内

## F ターム(参考)

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BA03 BA04 BA05 CA44  
 4C076 AA31 AA65 AA95 CC01 CC26  
 4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 BA01 BA44 CA01 DC22 MA02 MA38  
 MA41 NA05 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZA23 ZA94 ZB21  
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA03 MA05 MA38 MA41 NA05 NA14  
 ZA01 ZA02 ZA16 ZA23 ZA94 ZB21  
 4C087 AA01 AA02 BC83 MA02 MA38 MA41 NA05 NA14 ZA01 ZA02  
 ZA16 ZA23 ZA94 ZB21  
 4H045 AA10 AA30 BA09 CA01 CA40 EA20 FA74