(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7706888号
(P7706888)

(45)発行日　令和7年7月14日(2025.7.14)

(24)登録日　令和7年7月4日(2025.7.4)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/11 (2006.01)		C12N	15/11	Z ZNA
C12N 9/16 (2006.01)		C12N	9/16	Z
C12N 15/09 (2006.01)		C12N	15/09	１１０
A61K 38/46 (2006.01)		A61K	38/46	
A61P 7/06 (2006.01)		A61P	7/06	

請求項の数　11　（全184頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-548637(P2020-548637)
(86)(22)出願日　平成31年3月14日(2019.3.14)
(65)公表番号　特表2021-518102(P2021-518102A)
(43)公表日　令和3年8月2日(2021.8.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/022374
(87)国際公開番号　WO2019/178426
(87)国際公開日　令和1年9月19日(2019.9.19)
審査請求日　令和4年3月11日(2022.3.11)
(31)優先権主張番号　62/643,168
(32)優先日　平成30年3月14日(2018.3.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/767,488
(32)優先日　平成30年11月14日(2018.11.14)
最終頁に続く

(73)特許権者　517372508
エディタス・メディシン、インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州　０２１４１、ケンブリッジ、ハーレー・ストリート　１１
(74)代理人　110003708
弁理士法人鈴榮特許綜合事務所
(72)発明者　ゴリ、ジェニファー・レア
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州　０２１３０、ジャマイカ・プレイン、スパルディング・ストリート　２０、ユニット　１
(72)発明者　オウペピン・ド・ラモット－ドリュージー、エドゥアール
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　異常ヘモグロビン症の治療のためのシステム及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

５’末端及び３’末端、

前記５’末端におけるＤＮＡ延長であって、前記ＤＮＡ延長は、配列番号１２３６～１２５０からなる群から選択される配列を含むＤＮＡ延長、

ＨＢＧ遺伝子のプロモーターにおける標的部位に相補的な標的化ドメイン、並びに

Ｃｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はＣｐｆ１変異型に結合することができるＲＮＡセグメント

を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、

前記ｇＲＮＡが単分子である、ｇＲＮＡ。

【請求項２】

前記ｇＲＮＡは、前記３’末端における2'-O-メチル修飾及びホスホロチオエート修飾を含む、請求項１に記載のｇＲＮＡ。

【請求項３】

前記標的化ドメインは、配列番号１００２、１００４、１１３９、１１４１、１１４３、１１４５、１１４７、１１４９、１１５１、１１５３、１１５５、１１５７、１１５９、１１６１、１１６３、１１６５、１１６７、１１６９、１１７１、１１７３、１１７５、１１７７、１１７９、１１８１、１１８３、１１８５、１１８７、１１８９、１１９１、１１９３、１１９５、１１９７、１１９９、１２０１、１２０３、１２０５、１２０７、１２０９、１２１１、１２１３、１２１５、１２１７、１２１９、１２２１、１２２３

、１２２５、１２２７、１２２９、１２５４、１２５６、１２５８、１２６０、１２６２又は１２６４からなる群から選択される配列を含む、請求項１又は２に記載のｇＲＮＡ。
【請求項４】
前記標的部位は、Ｃｈｒ１１（NC_000011.10）５，２４９，９０４～５，２４９，９２７（表１７、領域６）；Ｃｈｒ１１（NC_000011.10）５，２５４，８７９～５，２５４，９０９（表１７、領域１６）；又はそれらの組合せに位置するヌクレオチドを含む、請求項１又は２に記載のｇＲＮＡ。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ、及び、
ＣｐｆＩ　ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はＣｐｆ１変異型
を含む核タンパク質（ＲＮＰ）複合体。
【請求項６】
細胞内のＨＢＧ遺伝子のプロモーターを改変する方法で使用する、ＲＮＰ複合体を含有する組成物であって、前記ＲＮＰ複合体は、
請求項１～４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ、及び、
ＣｐｆＩ　ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はＣｐｆ１変異型
を含み、前記方法は、前記細胞を前記ＲＮＰ複合体に接触させることを含む、
組成物。
【請求項７】
前記細胞は、ＣＤ３４＋細胞又は造血幹細胞である、請求項６に記載の組成物。
【請求項８】
前記ＲＮＰ複合体は、電気穿孔を使用して前記細胞に送達される、請求項６又は７に記載の組成物。
【請求項９】
それを必要とする対象において、鎌状赤血球症の１つ又は複数の症状の緩和に使用する、請求項６～８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
請求項１～４のいずれか一項に記載のｇＲＮＡ、
ＣｐｆＩ　ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はＣｐｆ１変異型、及び、
薬学的に許容可能な担体
を含むことによって特徴付けられたキット。
【請求項１１】
請求項５に記載のＲＮＰ複合体、及び、薬学的に許容可能な担体
を含むことによって特徴付けられた組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の参照
本出願は、その内容全体が参照により本明細書に援用される、2018年3月14日に出願された米国仮特許出願第62/643,168号明細書、2018年11月14日に出願された米国仮特許出願第62/767,488号明細書及び2018年11月29日に出願された米国仮特許出願第62/773,073号明細書の利益を主張する。
【０００２】
配列表
本出願は、EFS-Webを通じてASCII形式で提出された配列表を含み、その内容全体が参照により援用される。2019年3月14日に作成されたASCIIコピーは、2019-03-14_EM115PCT_Editas_8013WO02_Sequence_Listing.txtという名称であり、サイズが811KBである。
【０００３】
本開示は、標的核酸配列を改変するか又は標的核酸配列の発現を調節するためのゲノム

編集システム及び方法並びにヘモグロビンサブユニットをコード化する遺伝子の改変及び／又は異常ヘモグロビン症の治療に関連したそれらの用途に関する。

【背景技術】

【０００４】

ヘモグロビン（Ｈｂ）は、赤血球（ＲＢＣ）中の酸素を肺から組織に運ぶ。出生前の発達中から出生直後にかけて、ヘモグロビンは、２つのα-グロビン鎖と２つのγ-グロビン鎖とから構成される四量体タンパク質である胎児型ヘモグロビン（ＨｂＦ）の形態で存在する。グロビンスイッチングとして知られているプロセスを通じて、ＨｂＦは、ＨｂＦのγ-グロビン鎖がβ-グロビン鎖で置換されている四量体タンパク質である成人ヘモグロビン（ＨｂＡ）によって大部分が置換される。平均的な成人は、総ヘモグロビンから１％未満のＨｂＦを作る（Thein 2009）。α-ヘモグロビン遺伝子は、１６番染色体上に存在する一方、β-ヘモグロビン遺伝子（ＨＢＢ）、Ａγ-グロビン鎖（ＨＢＧ１、γグロビンＡとしても知られる）及びＧγ-グロビン鎖（ＨＢＧ２、γグロビンＧとしても知られる）は、グロビン遺伝子クラスター（グロビン遺伝子座とも称される）内の１１番染色体上に位置する。

【０００５】

ＨＢＢの変異は、鎌状赤血球症（ＳＣＤ）及びβ-サラセミア（β-Ｔｈａｌ）をはじめとするヘモグロビン障害（すなわち異常ヘモグロビン症）を引き起こし得る。米国内では、およそ９３，０００人が異常ヘモグロビン症と診断されている。世界的には、毎年３０万人の子供が異常ヘモグロビン症を有して産まれている（Angastiniotis 1998）。これらの病状は、ＨＢＢ変異と関連しているため、これらの症状は、典型的には、グロビンがＨｂＦからＨｂＡに切り替わるまで顕在化しない。

【０００６】

ＳＣＤは、米国で最も一般的な遺伝性血液疾患であり、約８万人が罹患している（Brousseau 2010）。ＳＣＤは、アフリカ系の祖先を有する人々で最も一般的であり、ＳＣＤの有病率は、５００人に１人である。アフリカでは、ＳＣＤの有病率は、１５００万人である（Aliyu 2008）。ＳＣＤは、インド系、サウジアラビア系、地中海系の人々でもより一般的である。ヒスパニック系米国人では、鎌状赤血球症の有病率は、１，０００人に１人である（Lewis 2014）。

【０００７】

ＳＣＤは、ＨＢＢ遺伝子のｃ．１７Ａ＞Ｔ（ＨｂＳ変異）の１つのホモ接合性変異によって引き起こされる。鎌状変異は、ＨＢＢ上の点変異（ＧＡＧ＞ＧＴＧ）であり、それは、エクソン１のアミノ酸６位におけるグルタミン酸のバリンによる置換をもたらす。β-ヘモグロビン鎖の６位のバリンは、疎水性であり、酸素結合していないとき、β-グロビンタンパク質の立体配座に変化をもたらす。この立体配座の変化は、酸素不在下でＨｂＳタンパク質の重合を引き起こし、ＲＢＣの変形（すなわち鎌状化）をもたらす。ＳＣＤは、常染色体劣性遺伝するため、２つのＨｂＳ対立遺伝子を有する患者のみがこの疾患を有する。ヘテロ接合対象は、鎌状赤血球形質を有しており、重度の脱水又は酸素欠乏状態に置かれると、貧血及び／又は痛みを伴う発症に苦しむこともある。

【０００８】

鎌状ＲＢＣは、貧血、鎌状赤血球の危機、血管閉塞の発症、再生不良性発症及び急性胸部症候群をはじめとする複数の症状を引き起こす。鎌状ＲＢＣは、野生型赤血球よりも弾性が低いため、毛細血管床を容易に通過できず、閉塞及び虚血（すなわち血管閉塞）を引き起こす。血管閉塞症は、鎌状赤血球が臓器の毛細血管床の血流を妨げると起こり、疼痛、虚血及び壊死をもたらす。これらのエピソードは、典型的には、５～７日間続く。脾臓は、機能不全ＲＢＣを除去する役割を果たし、したがって典型的には幼児期に拡大し、頻繁に血管閉塞の発症を被る。小児期の終わりまでに、ＳＣＤ患者の脾臓は、多くの場合に梗塞を起こし、脾粉砕につながる。溶血は、ＳＣＤの恒常的な特徴であり、貧血をもたらす。鎌状細胞は、循環中で１０～２０日間生存する一方、健常赤血球は、９０～１２０日間生存する。ＳＣＤ対象は、必要に応じて輸血され、適切なヘモグロビン濃度が維持され

る。頻繁な輸血は、対象をＨＩＶ、Ｂ型肝炎及びＣ型肝炎感染のリスクにさらす。対象は、急性胸部発作並びに四肢、末端臓器及び中枢神経系の梗塞の問題を抱えることもある。

【０００９】

ＳＣＤを有する対象は、平均寿命が低下する。ＳＣＤを有する患者の予後は、発症及び貧血の生涯にわたる慎重な管理によって着実に改善している。２００１年現在、鎌状赤血球症を有する対象の平均余命は、５０代半ば～後半である。現在のＳＣＤの治療法は、発症中の水分補給及び疼痛管理並びに必要に応じて貧血を矯正するための輸血を伴う。

【００１０】

サラセミア（例えば、β-Ｔｈａｌ、δ-Ｔｈａｌ及びβ／δ-Ｔｈａｌ）は、慢性貧血を引き起こす。β-Ｔｈａｌは、世界中でおよそ１０万人に１人が罹患すると推定される。その有病率は、欧州系をはじめとする特定の集団で高く、その有病率は、およそ１万人に１人である。β-Ｔｈａｌメジャーは、より重篤な病型であり、生涯にわたる輸血及びキレート療法で治療しない限り、生命を脅かす。米国では、β-Ｔｈａｌメジャーの対象者は、約３，０００人である。β-Ｔｈａｌ中間型は、輸血を必要としないが、それは、成長遅延及び著しい全身性異常を引き起こすことがあり、生涯にわたるキレート療法を必要とすることが多い。ＨｂＡは、成人ＲＢＣのヘモグロビンの大部分を占めているが、成人ヘモグロビンの約３％は、２つのγ-グロビン鎖が２つのδ（Δ）-グロビン鎖で置き換えられているＨｂＡ変異型であるＨｂＡ２の形態である。δ-Ｔｈａｌは、ＨＢＤ発現の喪失を引き起こすΔヘモグロビン遺伝子（ＨＢＤ）の変異に関連している。ＨＢＤ変異の共遺伝は、ＨｂＡ２のレベルを正常範囲に低下させることにより、β-Ｔｈａｌ（すなわちβ／δ-Ｔｈａｌ）の診断を遮蔽し得る（Bouva 2006）。β／δ-Ｔｈａｌは、通常、両方の対立遺伝子中のＨＢＢ及びＨＢＤ配列の欠失によって引き起こされる。ホモ接合型（δｏ／δｏ βｏ／βｏ）患者では、ＨＢＧが発現されて、ＨｂＦのみの産生がもたらされる。

【００１１】

ＳＣＤと同様に、β-Ｔｈａｌは、ＨＢＢ遺伝子の変異によって引き起こされる。β-Ｔｈａｌをもたらす最も一般的なＨＢＢ変異は、ｃ．－１３６Ｃ＞Ｇ、ｃ．９２＋１Ｇ＞Ａ、ｃ．９２＋６Ｔ＞Ｃ、ｃ．９３－２１Ｇ＞Ａ、ｃ．１１８Ｃ＞Ｔ、ｃ．３１６－１０６Ｃ＞Ｇ、ｃ．２５＿２６ｄｅｌＡＡ、ｃ．２７＿２８ｉｎｓＧ、ｃ．９２＋５Ｇ＞Ｃ、ｃ．１１８Ｃ＞Ｔ、ｃ．１３５ｄｅｌＣ、ｃ．３１５＋１Ｇ＞Ａ、ｃ．－７８Ａ＞Ｇ、ｃ．５２Ａ＞Ｔ、ｃ．５９Ａ＞Ｇ、ｃ．９２＋５Ｇ＞Ｃ、ｃ．１２４＿１２７ｄｅｌＴＴＣＴ、ｃ．３１６－１９７Ｃ＞Ｔ、ｃ．－７８Ａ＞Ｇ、ｃ．５２Ａ＞Ｔ、ｃ．１２４＿１２７ｄｅｌＴＴＣＴ、ｃ．３１６－１９７Ｃ＞Ｔ、ｃ．－１３８Ｃ＞Ｔ、ｃ．－７９Ａ＞Ｇ、ｃ．９２＋５Ｇ＞Ｃ、ｃ．７５Ｔ＞Ａ、ｃ．３１６－２Ａ＞Ｇ及びｃ．３１６－２Ａ＞Ｃである。これら及びβ-Ｔｈａｌに関連する他の変異は、β-グロビン鎖の変異又は欠失を引き起こし、これは、正常なＨｂα-ヘモグロビンとβ-ヘモグロビンとの比率に混乱を引き起こす。過剰なα-グロビン鎖は、骨髄の赤血球前駆体中で沈殿する。

【００１２】

β-Ｔｈａｌメジャーにおいて、ＨＢＢの両方の対立遺伝子は、β-グロビン産生の完全な欠如（β^{0}／β^{0}と表記される）をもたらすナンセンス、フレームシフト又はスプライシング変異を含む。β-Ｔｈａｌメジャーは、β-グロビン鎖の重篤な減少をもたらし、ＲＢＣのα-グロビン鎖の著しい沈殿及び高重症度貧血につながる。

【００１３】

β-Ｔｈａｌ中間型は、ＨＢＢの５’又は３’非翻訳領域の変異、ＨＢＢのプロモーター領域若しくはポリアデニル化シグナルの変異又はＨＢＢ遺伝子内のスプライシング変異から生じる。患者の遺伝子型は、βｏ／β＋又はβ＋／β＋と表記される。βｏは、β-グロビン鎖の発現の不在を表し；β＋は、機能不全であるが、存在するβ-グロビン鎖を表す。表現型発現は、患者間で変動する。β-Ｔｈａｌ中間型には、β-グロビンのいくらかの産生があるため、赤血球前駆体中のより少ないα-グロビン鎖沈殿及びβ-Ｔｈａｌメジャーよりも低重症度の貧血をもたらす。しかし、慢性貧血に続発する赤血球系統の増殖には、より重大な帰結がある。

【００１４】
β-Ｔｈａｌメジャーを有する対象は、６ヶ月齢～２歳で発症して、成長障害、発熱、肝脾腫及び下痢に苦しむ。適切な治療としては、定期的な輸血が挙げられる。β-Ｔｈａｌメジャーの治療としては、脾臓摘出及びヒドロキシ尿素による治療も挙げられる。患者が定期的に輸血を受けている場合、２０歳代の初めまで正常に発育する。その時点において、患者は、鉄の過負荷の合併症を予防するためのキレート療法を（継続的な輸血に加えて）必要とする。鉄の過負荷は、成長の遅延又は性成熟の遅延として顕在化し得る。成人期では、不十分なキレート療法は、心筋症、心不整脈、肝線維症及び／又は肝硬変、糖尿病、甲状腺及び副甲状腺の異常、血栓症及び骨粗鬆症をもたらすこともある。頻繁な輸血は、対象をＨＩＶ、Ｂ型肝炎及びＣ型肝炎感染のリスクにもさらす。
【００１５】
β-Ｔｈａｌ中間型の対象は、一般的に２歳～６歳に存在する。対象は、一般に、輸血を必要としない。しかし、慢性貧血を代償するための赤血球系統の慢性肥大化に起因する骨の異常が発生する。対象は、骨粗鬆症に起因する長骨の骨折を有することもある。髄外赤血球形成が一般的であり、脾臓、肝臓及びリンパ節の腫脹をもたらす。これは、脊髄圧迫及び神経学的問題を引き起こすこともある。対象は、下肢潰瘍に罹患して、脳卒中、肺塞栓症及び深部静脈血栓症をはじめとする血栓性事象のリスクも高くなる。β-Ｔｈａｌ中間型の治療法としては、脾臓摘出、葉酸補給、ヒドロキシ尿素治療、髄外腫瘤に対する放射線治療が挙げられる。キレート療法は、鉄の過負荷を発症した対象で使用される。
【００１６】
β-Ｔｈａｌ患者では、余命が低下することが多い。輸血療法を受けていないβ-Ｔｈａｌメジャーを有する対象は、一般に、２０歳代又は３０歳代に死亡する。定期的な輸血及び適切なキレート療法を受けているβ-Ｔｈａｌメジャーを有する対象は、５０歳代を超えて生存し得る。鉄毒性に続発する心不全は、β-Ｔｈａｌメジャー対象の鉄毒性に起因する主な死因である。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１７】
現在、ＳＣＤ及びβ-Ｔｈａｌに対する様々な新規治療法が開発されている。現在、遺伝子治療を介した抗鎌状化ＨＢＢ遺伝子の送達が臨床試験で調査されている。しかし、このアプローチの長期的な有効性及び安全性は、不明である。ＨＬＡ適合させた同種異系幹細胞ドナーからの造血幹細胞（ＨＳＣ）の移植は、ＳＣＤ及びβ-Ｔｈａｌを治癒させることが実証されているが、この処理は、対象を移植に備えるために必要であるアブレーション療法に関連するものをはじめとするリスクを伴い、生命を脅かす日和見感染症のリスク及び移植後の移植片対宿主病のリスクを増加させる。さらに、適合する同種異系ドナーが同定され得ないことが多い。したがって、これら及び他の異常ヘモグロビン症を管理するための改善された方法に対する必要性がある。
【課題を解決するための手段】
【００１８】
本明細書では、１つ又は複数のγ-グロビン遺伝子のプロモーター領域（例えば、ＨＢＧ１、ＨＢＧ２又はＨＢＧ１及びＨＢＧ２）を改変し、胎児型ヘモグロビン（ＨｂＦ）の発現を増加させるための、ゲノム編集システム、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体、ガイドＲＮＡ、修飾Ｃｐｆ１タンパク質（Ｃｐｆ１変異型）を含めたＣｐｆ１タンパク質及びＣＲＩＳＰＲ媒介方法が提供される。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、野生型Ｃｐｆ１又は修飾Ｃｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（修飾Ｃｐｆ１タンパク質）と複合体化したガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１３、表１８又は表１９に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡ標的化ドメインを含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ標的化ドメインは、配列番号１００２、１２５４、１２５８、１２６０、１２６２及び１２６４からなる群から選択される配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１９に記載されるｇＲＮＡ

配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、配列番号１０２２、１０２３、１０４１～１１０５からなる群から選択される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、表２１に記載されるＲＮＰ複合体を含み得る。例えば、ＲＮＰ複合体は、配列番号１０５１に記載される配列を含むｇＲＮＡと、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化される修飾Ｃｐｆ１タンパク質とを含み得る（表２１のＲＮＰ３２）。

【００１９】

本発明者らは、修飾Ｃｐｆ１タンパク質に複合体化したｇＲＮＡを含むＲＮＰ複合体の送達が標的核酸の編集の増加をもたらし得ることを本明細書において発見した。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、１つ又は複数の修飾を含有し得る。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾としては、限定することなく、野生型Ｃｐｆ１アミノ酸配列の１つ若しくは複数の変異、野生型Ｃｐｆ１核酸配列の１つ若しくは複数の変異、核局在化シグナル（ＮＬＳ）の１つ若しくは複数の変異、精製タグ（例えば、Ｈｉｓタグ）の１つ若しくは複数の変異又はそれらの組み合わせが挙げられ得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５～３９、１０９４～１０９７、１１０７～０９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１、１１１０～１７（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列によってコード化され得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、修飾されているか又は未修飾ｇＲＮＡであり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１３、表１８又は表１９に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、表２１に記載されるＲＮＰ複合体を含み得る。例えば、ＲＮＰ複合体は、配列番号１０５１に記載される配列を含むｇＲＮＡと、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化される修飾Ｃｐｆ１タンパク質とを含み得る（表２１のＲＮＰ３２）。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質を含むＲＮＰ複合体は、標的核酸の編集を増加させ得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質を含むＲＮＰ複合体は、編集を増加させて生産的インデルの増加をもたらし得る。様々な実施形態において、標的核酸の編集の増加は、標的核酸のＰＣＲ増幅と、引き続く配列解析（例えば、サンガー配列決定法、次世代配列決定法）などであるが、これらに限定されるものではない、当業者に知られている任意の手段とによって評価され得る。

【００２０】

本発明者らは、未修飾又は修飾Ｃｐｆ１タンパク質に複合体化した修飾ｇＲＮＡを含むＲＮＰ複合体の送達が標的核酸の編集の増加をもたらし得ることも本明細書において発見した。特定の実施形態では、修飾ｇＲＮＡは、ホスホロチオエート結合修飾、ホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、2'-O-メチル修飾をはじめとする１つ若しくは複数の修飾、１つ、若しくは複数、若しくは一続きのデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）塩基（本明細書では「ＤＮＡ延長」とも称される）、１つ、若しくは複数、若しくは一続きのリボ核酸（ＲＮＡ）塩基（本明細書では「ＲＮＡ延長」とも称される）又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。例えば、特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、配列番号１２３５～１２５０に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。例えば、特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、配列番号１２３１～１２３４、１２５１～１２５３に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１３、表１８又は表１９に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、表２１に記載されるＲＮＰ複合体を含み得る。例えば、ＲＮＰ複合体は、配列番号１０５１に記載される配列を含むｇＲＮＡと、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化される修飾Ｃｐｆ１タンパク質とを含み得る（表２１のＲＮＰ３２）。特定の実施形態では、修飾ｇＲＮＡを含むＲＮＰ複合体は、標的核酸の編集を増加させ得る。特定の実施形態では、修飾ｇＲＮＡを含むＲＮＰ複合体は、編集を増加させて生産的インデルの増加をもたらし得る。

【００２１】

特定の実施形態では、修飾ｇＲＮＡと修飾Ｃｐｆ１タンパク質とを含むＲＮＰ複合体は

、標的核酸の編集を増加させ得る。特定の実施形態では、修飾ｇＲＮＡと修飾Ｃｐｆ１タンパク質とを含むＲＮＰ複合体は、編集を増加させて生産的インデルの増加をもたらし得る。

【００２２】

本発明者らは、Ｃｐｆ１分子に複合体化したｇＲＮＡを含むＲＮＰ複合体（例えば、「ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰ」）と「ブースター要素」との同時送達が標的核酸の編集の増加をもたらし得ることも発見した。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、表２１に記載されるＲＮＰ複合体を含み得る。例えば、ＲＮＰ複合体は、配列番号１０５１に記載される配列を含むｇＲＮＡと、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化される修飾Ｃｐｆ１タンパク質とを含み得る（表２１のＲＮＰ３２）。本明細書の用法では、「ブースター要素」という用語は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼに複合体化したｇＲＮＡを含むＲＮＰ複合体（「ｇＲＮＡ－ヌクレアーゼ－ＲＮＰ」）と共に同時送達された場合、ブースター要素なしの標的核酸の編集と比較して標的核酸の編集を増加させる要素を指す。特定の実施形態では、１つ又は複数のブースター要素がｇＲＮＡ－ヌクレアーゼ－ＲＮＰ複合体と共に同時送達されて、標的核酸の編集を増加させ得る。特定の実施形態では、ブースター要素の同時送達は、編集を増加させて生産的インデルの増加をもたらし得る。様々な実施形態において、標的核酸の編集の増加は、標的核酸のＰＣＲ増幅と、引き続く配列解析（例えば、サンガー配列決定法、次世代配列決定法）などであるが、これらに限定されるものではない、当業者に知られている任意の手段とによって評価され得る。

【００２３】

特定の実施形態では、ｇＲＮＡ－ヌクレアーゼ－ＲＮＰは、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰを含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰ複合体のＣｐｆ１分子は、野生型Ｃｐｆ１又は修飾Ｃｐｆ１であり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰのＣｐｆ１分子は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５～３９、１０９４～１０９７、１１０７～０９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１、１１１０～１７（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列によってコード化され得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰ複合体は、表１３又は表１８に記載される標的化ドメインを含むｇＲＮＡを含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰ複合体は、表１９に記載される配列を含むｇＲＮＡを含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、修飾又は未修飾ｇＲＮＡであり得る。

【００２４】

特定の実施形態では、ブースター要素は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ分子に複合体化した死滅ｇＲＮＡ分子を含む死滅ＲＮＰ（「死滅ｇＲＮＡ－ヌクレアーゼ－ＲＮＰ」）を含み得る。特定の実施形態では、死滅ｇＲＮＡ－ヌクレアーゼ－ＲＮＰは、野生型（ＷＴ）Ｃａｓ９分子に複合体化した死滅ｇＲＮＡ（「死滅ｇＲＮＡ－Ｃａｓ９－ＲＮＰ」）、Ｃａｓ９ニッカーゼ分子に複合体化した死滅ｇＲＮＡ（「死滅ｇＲＮＡ－ニッカーゼ－ＲＮＰ」）又は酵素的に不活性な（ｅｉ）Ｃａｓ９分子に複合体化した死滅ｇＲＮＡ（「死滅ｇＲＮＡ－ｅｉＣａｓ９－ＲＮＰ」）を含み得る。特定の実施形態では、死滅ｇＲＮＡ－ヌクレアーゼ－ＲＮＰ複合体は、ヌクレアーゼ活性の減少又は活性の欠失を有し得る。特定の実施形態では、死滅ｇＲＮＡ－ヌクレアーゼ－ＲＮＰ複合体の死滅ｇＲＮＡは、本明細書に記載される死滅ｇＲＮＡのいずれかを含み得る。例えば、標的化ドメインを含み得る死滅ｇＲＮＡは、表１０又は表１５に記載される死滅ｇＲＮＡ標的化ドメインと同一であり得るか、又は３ヌクレオチド以下が異なり得る。特定の実施形態では、死滅ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡ標的化ドメインの切り詰めを含む標的化ドメインを含み得る。特定の実施形態では、切り詰められるｇＲＮＡ標的化ドメインは、表２、表１０又は表１５に記載されるｇＲＮＡ標的化ドメインであり得る。特定の実施形態では、死滅ｇＲＮＡは、修飾又は未修飾死滅ｇＲＮＡであり得る。本明細書で示されるように、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰと、死滅ｇＲＮＡ－Ｃａｓ９－ＲＮＰ（すなわちＷＴ Ｃａｓ９に複合体化した死滅ｇＲＮＡを含むＲＮＰ）との同時送達又はｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰと、死滅ｇＲＮＡ－ニッ

カーゼ－ＲＮＰ（すなわちＣａｓ９ニッカーゼ（すなわちＣａｓ９ Ｄ１０Ａニッカーゼ）に複合体化した死滅ｇＲＮＡを含むＲＮＰ）との同時送達は、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰのみの送達に続いて観察されたレベルを超える全編集の増加をもたらした（例えば、実施例１５、１７、１８を参照されたい）。死滅ｇＲＮＡ分子は、標的核酸中の標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）の近位又はそれ中の領域に相補的な標的化ドメインを含み得る。特定の実施形態では、「近位」は、標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）の１０、２５、５０、１００又は２００ヌクレオチド以内の領域を示し得る。特定の実施形態では、１つ又は複数のブースター要素は、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰと共に同時送達される、例えば死滅ｇＲＮＡ－Ｃａｓ９－ＲＮＰ、死滅ｇＲＮＡ－ニッカーゼ－ＲＮＰ、死滅ｇＲＮＡ－ｅｉＣａｓ９－ＲＮＰなどの１つ又は複数の死滅ｇＲＮＡ－ヌクレアーゼ－ＲＮＰ含み得る。特定の実施形態では、死滅ｇＲＮＡ－ヌクレアーゼ－ＲＮＰの同時送達は、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰのインデルプロファイルを改変しない。

【００２５】

特定の実施形態では、ブースター要素は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼニッカーゼ分子に複合体化したｇＲＮＡ分子を含むＲＮＰ複合体（「ｇＲＮＡ－ニッカーゼ－ＲＮＰ」）を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼニッカーゼ分子は、例えば、Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａニッカーゼなどの Ｃａｓ９ニッカーゼ分子であり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ－ニッカーゼ－ＲＮＰのｇＲＮＡは、本明細書に記載されるｇＲＮＡのいずれかを含み得る。例えば、ｇＲＮＡは、表２、表１０又は表１５に記載されるｇＲＮＡ標的化ドメインを含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、修飾又は未修飾ｇＲＮＡであり得る。本明細書で示されるように、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰとｇＲＮＡ－ニッカーゼ－ＲＮＰ複合体（Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａニッカーゼ分子に複合体化したガイドＲＮＡを含むＲＮＰ）との同時送達は、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰのみの送達に続いて観察されたレベルを超える全編集の増加をもたらした（例えば、実施例１５、１６を参照されたい）。さらに、ｇＲＮＡ－ニッカーゼ－ＲＮＰ複合体とｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰ複合体との同時送達は、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰのインデルプロファイルの方向性、長さ及び／又は位置を改変した。特定の実施形態では、ブースターエンハンサーを使用して、例えば生産的インデルの比率の増加などの所望の編集結果が提供され得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ－ニッカーゼ－ＲＮＰ複合体とｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰ複合体との同時送達は、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰのインデルプロファイルを改変し得る。

【００２６】

特定の実施形態では、ブースター要素は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）又は二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｄｓＯＤＮ）を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、本明細書で開示される任意のｓｓＯＤＮであり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、表１１に記載される配列を含み得る。例えば、特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号１０４０に記載される配列を含み得る。

【００２７】

一態様では、本開示は、プレボテラ属（Prevotella）及びフランシセラ属（Francisella）１（Ｃｐｆ１）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はその変異型からのＣＲＩＳＰＲと、細胞内のＨＢＧ遺伝子のプロモーターにおける標的部位に結合することができるｇＲＮＡとを含むＲＮＰ複合体に関する。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、修飾されているか又は未修飾であり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、ホスホロチオエート結合修飾、ホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、2'-O-メチル修飾、ＤＮＡ延長、ＲＮＡ延長又はそれらの組み合わせをはじめとする１つ又は複数の修飾を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１３、表１８又は表１９に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、表２１

に記載されるＲＮＰ複合体を含み得る。例えば、ＲＮＰ複合体は、配列番号１０５１に記載される配列を含むｇＲＮＡと、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化されるＣｐｆ１変異型タンパク質とを含み得る（表２１のＲＮＰ３２）。特定の実施形態では、Ｃｐｆ１変異型タンパク質は、１つ又は複数の修飾を含有し得る。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾としては、限定することなく、野生型Ｃｐｆ１アミノ酸配列の１つ若しくは複数の変異、野生型Ｃｐｆ１核酸配列の１つ若しくは複数、核局在化シグナル（ＮＬＳ）の１つ若しくは複数、精製タグ（例えば、Ｈｉｓタグ）の１つ若しくは複数の変異又はそれらの組み合わせが挙げられ得る。特定の実施形態では、Ｃｐｆ１変異型タンパク質は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５～３９、１０９４～１０９７、１１０７～０９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１、１１１０～１７（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列によってコード化され得る。

【００２８】

一態様では、本開示は、細胞のＨＢＧ遺伝子のプロモーターを改変する方法であって、細胞を、本明細書で開示されるＲＮＰ複合体に接触させるステップを含む方法に関する。特定の実施形態では、改変は、表１７に記載される１つ又は複数の領域内のインデルを含み得る。特定の実施形態では、改変は、ＨＢＧ遺伝子のプロモーターのＣＣＡＡＴボックス標的領域内のインデルを含み得る。例えば、特定の実施形態では、改変は、Ｃｈｒ１１（NC_000011.10）：５，２４９，９５５～５，２４９，９８７（表１７、領域６）、Ｃｈｒ１１（NC_000011.10）：５，２５４，８７９～５，２５４，９０９（表１７、領域１６）内のインデル又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、ｇＲＮＡ及びＣｐｆ１タンパク質を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１９に記載されるＲＮＡ標的化ドメインを含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ標的化ドメインは、配列番号１００２、１２５４、１２５８、１２６０、１２６２及び１２６４からなる群から選択される配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１９に記載されるｇＲＮＡ配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、配列番号１０２２、１０２３、１０４１～１１０５からなる群から選択される配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、Ｃｈｒ１１：５２４９９７３、Ｃｈｒ１１：５２４９９７７（ＨＢＧ１）；Ｃｈｒ１１：５２５００４２、Ｃｈｒ１１：５２５００４６（ＨＢＧ１）；Ｃｈｒ１１：５２５００５５、Ｃｈｒ１１：５２５００５９（ＨＢＧ１）；Ｃｈｒ１１：５２５０１７９、Ｃｈｒ１１：５２５０１８３（ＨＢＧ１）；Ｃｈｒ１１：５２５４８９７、Ｃｈｒ１１：５２５４９０１（ＨＢＧ２）；Ｃｈｒ１１：５２５４８９７、Ｃｈｒ１１：５２５４９０１（ＨＢＧ２）；Ｃｈｒ１１：５２５４９６６、５２５４９７０（ＨＢＧ２）；Ｃｈｒ１１：５２５４９７９、５２５４９８３（ＨＢＧ２）（表２２、表２３）における編集事象を提供するように構成され得る。特定の実施形態では、細胞は、ブースター要素とさらに接触され得る。特定の実施形態では、ブースター要素は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）又は二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｄｓＯＤＮ）を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、本明細書で開示される任意のｓｓＯＤＮであり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、表１１に記載される配列を含み得る。例えば、特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号１０４０に記載される配列を含み得る。

【００２９】

一態様では、本開示は、単離細胞であって、ＲＮＰ複合体の細胞への送達によって生成されたＨＢＧ遺伝子のプロモーターにおける改変を含む単離細胞に関する。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、ｇＲＮＡ及びＣｐｆ１タンパク質を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、修飾されているか又は未修飾であり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、ホスホロチオエート結合修飾、ホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、2'-O-メチル修飾、ＤＮＡ延長、ＲＮＡ延長又はそれらの組み合わせをはじめとする１つ又は複数の修飾を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。特定

の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１３、表１８又は表１９に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、表２１に記載されるＲＮＰ複合体を含み得る。例えば、ＲＮＰ複合体は、配列番号１０５１に記載される配列を含むｇＲＮＡと、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化されるＣｐｆ１変異型タンパク質とを含み得る（表２１のＲＮＰ３２）。特定の実施形態では、Ｃｐｆ１変異型タンパク質は、１つ又は複数の修飾を含有し得る。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾としては、限定することなく、野生型Ｃｐｆ１アミノ酸配列の１つ若しくは複数の変異、野生型Ｃｐｆ１核酸配列の１つ若しくは複数の変異、核局在化シグナル（ＮＬＳ）の１つ若しくは複数、精製タグ（例えば、Ｈｉｓタグ）の１つ若しくは複数の変異又はそれらの組み合わせが挙げられ得る。特定の実施形態では、Ｃｐｆ１変異型タンパク質は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５～３９、１０９４～１０９７、１１０７～０９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１、１１１０～１７（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列によってコード化され得る。特定の実施形態では、ブースター要素は、ＲＮＰ複合体と共に同時送達され得る。特定の実施形態では、ブースター要素は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）又は二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｄｓＯＤＮ）を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、本明細書で開示される任意のｓｓＯＤＮであり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、表１１に記載される配列を含み得る。例えば、特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号１０４０に記載される配列を含み得る。

【００３０】

一態様では、本開示は、ｇＲＮＡ及びＣｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はその変異型を含むＲＮＰ複合体を使用するゲノム編集により、ヒト細胞内の胎児型ヘモグロビン（ＨｂＦ）のレベルを増加させて、ＨＢＧ遺伝子のプロモーターにおける改変に影響を及ぼして、それによりＨｂＦの発現を増加させる生体外方法に関する。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、修飾されているか又は未修飾であり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、ホスホロチオエート結合修飾、ホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、2'-O-メチル修飾、ＤＮＡ延長、ＲＮＡ延長又はそれらの組み合わせをはじめとする１つ又は複数の修飾を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１３、表１８又は表１９に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、表２１に記載されるＲＮＰ複合体を含み得る。例えば、ＲＮＰ複合体は、配列番号１０５１に記載される配列を含むｇＲＮＡと、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化されるＣｐｆ１変異型タンパク質とを含み得る（表２１のＲＮＰ３２）。特定の実施形態では、Ｃｐｆ１変異型タンパク質は、１つ又は複数の修飾を含有し得る。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾としては、限定することなく、野生型Ｃｐｆ１アミノ酸配列の１つ若しくは複数の変異、野生型Ｃｐｆ１核酸配列の１つ若しくは複数の変異、核局在化シグナル（ＮＬＳ）の１つ若しくは複数、精製タグ（例えば、Ｈｉｓタグ）の１つ若しくは複数の変異又はそれらの組み合わせが挙げられ得る。特定の実施形態では、Ｃｐｆ１変異型タンパク質は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５～３９、１０９４～１０９７、１１０７～０９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１、１１１０～１７（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列によってコード化され得る。特定の実施形態では、ブースター要素は、ＲＮＰ複合体と共に同時送達され得る。特定の実施形態では、ブースター要素は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）又は二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｄｓＯＤＮ）を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、本明細書で開示される任意のｓｓＯＤＮであり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、表１１に記載される配列を含み得る。例えば、特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号１０４０に記載される配列を含み得る。

【００３１】

一態様では、本開示は、ＣＤ３４＋又は造血幹細胞の集団であって、集団の１つ又は複

数の細胞は、ＨＢＧ遺伝子のプロモーターにおける改変を含み、その改変は、ｇＲＮＡ及びＣｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はその変異型を含むＲＮＰ複合体をＣＤ３４＋又は造血性幹細胞の集団に送達することによって生成される、ＣＤ３４＋又は造血幹細胞の集団に関する。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、修飾されているか又は未修飾であり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、ホスホロチオエート結合修飾、ホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、2'-O-メチル修飾、ＤＮＡ延長、ＲＮＡ延長又はそれらの組み合わせをはじめとする１つ又は複数の修飾を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１３、表１８又は表１９に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、表２１に記載されるＲＮＰ複合体を含み得る。例えば、ＲＮＰ複合体は、配列番号１０５１に記載される配列を含むｇＲＮＡと、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化されるＣｐｆ１変異型タンパク質とを含み得る（表２１のＲＮＰ３２）。特定の実施形態では、Ｃｐｆ１変異型タンパク質は、１つ又は複数の修飾を含有し得る。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾としては、限定することなく、野生型Ｃｐｆ１アミノ酸配列の１つ若しくは複数の変異、野生型Ｃｐｆ１核酸配列の１つ若しくは複数の変異、核局在化シグナル（ＮＬＳ）の１つ若しくは複数、精製タグ（例えば、Ｈｉｓタグ）の１つ若しくは複数の変異又はそれらの組み合わせが挙げられ得る。特定の実施形態では、Ｃｐｆ１変異型タンパク質は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５～３９、１０９４～１０９７、１１０７～０９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１、１１１０～１７（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列によってコード化され得る。特定の実施形態では、ブースター要素は、ＲＮＰ複合体と共に同時送達され得る。特定の実施形態では、ブースター要素は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）又は二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｄｓＯＤＮ）を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、本明細書で開示される任意のｓｓＯＤＮであり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、表１１に記載される配列を含み得る。例えば、特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号１０４０に記載される配列を含み得る。

【００３２】

一態様では、本開示は、鎌状赤血球症の１つ又は複数の症状の緩和を、それを必要とする対象において行う方法であって、ａ）ＣＤ３４＋又は造血幹細胞の集団を対象から単離するステップと；ｂ）ｇＲＮＡ及びＣｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はその変異型を含むＲＮＰ複合体を単離細胞の集団に送達することにより、生体外で単離細胞の集団を修飾して、それにより集団の１つ又は複数の細胞におけるＨＢＧ遺伝子のプロモーターの改変に影響を及ぼすステップと；ｃ）修飾された細胞の集団を対象に投与して、それにより対象における鎌状赤血球症の１つ又は複数の症状を緩和させるステップとを含む方法に関する。特定の実施形態では、改変は、ＨＢＧ遺伝子のプロモーターのＣＣＡＡＴボックス標的領域内のインデルを含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、電気穿孔を使用して送達され得る。特定の実施形態では、細胞の集団における細胞の少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％又は少なくとも約９０％は、生産的インデルを含む。

【００３３】

一態様では、本開示は、５’末端及び３’末端を含み、且つ５’末端におけるＤＮＡ延長と、３’末端における2'-O-メチル－３’－ホスホロチオエート修飾とを含むｇＲＮＡであって、標的部位とハイブリダイズすることができるＲＮＡセグメントと、Ｃｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼに結合することができるＲＮＡセグメントとを含むｇＲＮＡに関する。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、配列番号１２３５～１２５０に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、修飾されているか又は未修飾であり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、ホスホロチオエート結合修飾、ホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、2'-O-メチル修飾、ＤＮＡ延長、ＲＮＡ延長又はそれらの組み合わせをはじ

めとする１つ又は複数の修飾を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１３、表１８又は表１９に記載される配列を含み得る。

【００３４】

一態様では、本開示は、本明細書で開示されるようなＣｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び本明細書で開示されるようなｇＲＮＡを含むＲＮＰ複合体に関する。

【００３５】

本明細書では、１つ又は複数のγ-グロビン遺伝子（例えば、ＨＢＧ１、ＨＢＧ２又はＨＢＧ１及びＨＢＧ２）、ＢＣＬ１１Ａ遺伝子の赤血球特異的エンハンサー（ＢＣＬ１１Ａｅ）又はそれらの組み合わせを改変し、且つ胎児型ヘモグロビン（ＨｂＦ）の発現を増加させるためのゲノム編集システム、ガイドＲＮＡ及びＣＲＩＳＰＲ媒介方法も提供される。特定の実施形態では、表１８又は表１９に記載される配列を含む１つ又は複数のｇＲＮＡが使用され、ＨＢＧ遺伝子のプロモーター領域に改変が導入され得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システム、ガイドＲＮＡ及びＣＲＩＳＰＲ媒介方法は、ＨＢＧ１、ＨＢＧ２又はＨＢＧ１及びＨＢＧ２遺伝子の転写部位の５’側である１３ヌクレオチド（ｎｔ）標的領域（「１３ｎｔ標的領域」）を改変し得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システム、ガイドＲＮＡ及びＣＲＩＳＰＲ媒介方法は、ＨＢＧ１、ＨＢＧ２又はＨＢＧ１及びＨＢＧ２遺伝子の転写部位の５’側であるＣＣＡＡＴボックス標的領域（「ＣＣＡＡＴボックス標的領域」）を改変し得る。特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域は、遠位ＣＣＡＡＴボックスの領域又はその近傍の領域であり得、遠位ＣＣＡＡＴボックスのヌクレオチドと、遠位ＣＣＡＡＴボックス上流（５’）の２５ヌクレオチド及び下流（３’）の２５ヌクレオチドとを含む（すなわちＨＢＧ１／２ ｃ．－８６～－１４０）。特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域は、遠位ＣＣＡＡＴボックスの領域又はその近傍の領域であり得、遠位ＣＣＡＡＴボックスのヌクレオチドと、遠位ＣＣＡＡＴボックス上流（５’）の５ヌクレオチド及び下流（３’）の５ヌクレオチドとを含む（すなわちＨＢＧ１／２ ｃ．－１０６～－１２０）。特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域は、本明細書で開示されるような１８ｎｔ標的領域、１３ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域、１ｎｔ標的領域、－１１７Ｇ＞Ａ標的領域又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、改変は、１８ｎｔ欠失、１３ｎｔ欠失、１１ｎｔ欠失、４ｎｔ欠失、１ｎｔ欠失、ＨＢＧ１、ＨＢＧ２若しくはＨＢＧ１及びＨＢＧ２遺伝子のｃ．－１１７におけるＧからＡへの置換又はそれらの組み合わせであり得る。特定の実施形態では、改変は、非自然発生の改変又は自然発生の改変であり得る。特定の実施形態では、配列番号２５１～９０１又は９４０～９４２に記載される標的化ドメインを含む１つ又は複数のｇＲＮＡを使用して１３ｎｔ標的領域に改変が導入され得る。特定の実施形態では、配列番号２５１～９０１、９４０～９４２、９９６、９９７、９７０、９７１、１００２又は１００３に記載される配列を含む１つ又は複数のｇＲＮＡを使用して、ＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変が導入され得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システム、ガイドＲＮＡ及びＣＲＩＳＰＲ媒介方法は、ＢＣＬ１１Ａ遺伝子のイントロン２の＋５８ ＤＮａｓｅＩ高感受性部位（ＤＨＳ）領域にあるＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ（「ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ」）を改変し得る。特定の実施形態では、配列番号９５２～９５５に記載される標的化ドメインを含む１つ又は複数のｇＲＮＡを使用して、ＢＣＬ１１ＡｅのＧＡＴＡ１結合モチーフに改変が導入され得る。特定の実施形態では、１つ又は複数のｇＲＮＡを使用して、ＢＣＬ１１ＡｅにＧＡＴＡ１結合モチーフ改変が導入され得、１つ又は複数のｇＲＮＡを使用して、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２の１３ｎｔ標的領域に改変が導入され得る。

【００３６】

本明細書の特定の実施形態では、鋳型核酸（オリゴヌクレオチドドナー鋳型）などの任意選択的なゲノム編集システム構成成分の使用も提供される。特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴ標的領域標的化で使用するための鋳型核酸としては、限定することなく、ＣＣＡＡ

Ｔボックス標的領域の改変をコード化する鋳型核酸が挙げられ得る。特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域は、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域、１ｎｔ標的領域又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、鋳型核酸は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）又は二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｄｓＯＤＮ）であり得る。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アーム並びにＣＣＡＡＴボックス標的領域における改変をコード化する例示的な全長ドナー鋳型も以下に提示される（例えば、配列番号９０４～９０９、９７４～９９５）。特定の実施形態では、鋳型核酸は、プラス鎖又はマイナス鎖であり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、５’相同性アーム、置換配列及び３’相同性アームを含み得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチド以上であり得；置換配列は、０ヌクレオチドの長さを含み得；３’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチド以上であり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、１つ又は複数のホスホロチオエートを含み得る。

【００３７】

特定の実施形態では、１つ又は複数のγ-グロビン遺伝子（例えば、ＨＢＧ１、ＨＢＧ２又はＨＢＧ１及びＨＢＧ２）を改変するためのゲノム編集システム、ガイドＲＮＡ及びＣＲＩＳＰＲ媒介方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９又は修飾Ｃａｓ９であり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、本明細書で開示されるようなＣｐｆ１又は修飾Ｃｐｆ１であり得る。

【００３８】

一態様では、本開示は、上記に開示された方法によって生成された複数の細胞を含む組成物に関し、ここで、細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％は、ヒトＨＢＧ１若しくはＨＢＧ２遺伝子又は上記に開示された方法によって生成された複数の細胞の１３ｎｔ標的領域の配列に改変を含み、細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％は、ヒトＨＢＧ１又はＨＢＧ２遺伝子の１３ｎｔ標的領域の配列に改変を含み、細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％は、ＢＣＬ１１ＡｅのＧＡＴＡ１結合モチーフ配列に改変を含む。特定の実施形態では、複数の細胞の少なくとも一部は、赤血球系統内であり得る。特定の実施形態では、複数の細胞は、未修飾の複数の細胞と比較して胎児型ヘモグロビン発現のレベルが増加していることを特徴とし得る。特定の実施形態では、胎児型ヘモグロビンのレベルは、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％増加し得る。特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含み得る。

【００３９】

一態様では、本開示は、細胞を改変する方法であって、細胞内の核酸の標的領域内又はその近位のクロマチンセグメントを巻き戻すステップと、核酸の標的領域内に二本鎖切断（ＤＳＢ）を発生させて、それにより標的領域を改変するステップとを含む方法に関する。特定の実施形態では、クロマチンセグメントを巻き戻すステップは、クロマチンセグメントをＲＮＡ誘導ヘリカーゼに接触させるステップを含み得る。特定の実施形態では、クロマチンを巻き戻すステップは、外因的トランス作用因子をクロマチンセグメントに動員するステップを含まない。ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、長さが１５ヌクレオチド以下の第１の標的化ドメイン配列を含む死滅ガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）に複合体化し得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、ＲＮＡの５’末端のアンチリバースキャップ類似体（ＡＲＣＡ）、ＲＮＡ末端の３’のポリＡ尾部又は両方をはじめとするが、これらに限定されるものではない５’又は３’末端の修飾を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、酵素的に活性なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得るか、又はヌクレアーゼ活性を欠くように構成され得る。

特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡの標的化ドメイン配列は、標的領域の近位の配列に相補的であり得る。本明細書のいくつかの実施形態では、「近位」は、標的領域の１０、２５、５０、１００又は２００ヌクレオチド以内を意味し得る。特定の実施形態では、クロマチンセグメントを巻き戻すステップは、クロマチンセグメント内の核酸に一本鎖又は二本鎖切断を形成するステップを含まなくてもよい。特定の実施形態では、標的領域内でＤＳＢを生成するステップは、クロマチンセグメントを、ヌクレアーゼ活性を有するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼに接触させるステップを含み得る。特定の実施形態では、ヌクレアーゼ活性を有するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的領域と重なるように構成された標的化ドメインを含むｇＲＮＡに複合体化し得る。特定の実施形態では、ヌクレアーゼ活性を有するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１分子であり得る。

【００４０】

本開示の別の態様は、細胞内における編集のための核酸の標的領域へのアクセス性を誘導する方法であって、細胞をＲＮＡ誘導ヘリカーゼ及びｄｇＲＮＡに接触させるステップと、標的領域内又は近位のＤＮＡをＲＮＡ誘導ヘリカーゼで巻き戻して、それにより編集のための標的領域へのアクセス性を誘導するステップとを含む方法を含む。様々な場合において、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼ及びｄｇＲＮＡは、標的領域内又は近位に結合するように構成され得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ切断事象を提供しないように構成され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼ及びｄｇＲＮＡが複合体化し、切断活性を欠く死滅リボ核タンパク質（ＲＮＰ）を形成し得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、長さが１５ヌクレオチド以下の標的化ドメイン配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｄｇＲＮＡは、外因的トランス作用因子を標的領域に動員するように構成されていない。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９又はＣａｓ９融合タンパク質であり得る。特定の実施形態では、Ｃａｓ９は、酵素的に活性なＣａｓ９又は酵素的に死滅したＣａｓ９であり得る。特定の実施形態では、Ｃａｓ９は、例えば、Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａなどのニッカーゼであり得る。特定の実施形態では、ＤＮＡを巻き戻すステップは、ＤＮＡに一本鎖又は二本鎖切断を形成するステップを含まない。特定の実施形態では、ヌクレアーゼ活性を有するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的領域と重なるように構成された標的化ドメインを含むｇＲＮＡに複合体化し得る。特定の実施形態では、ヌクレアーゼ活性を有するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１分子であり得る。

【００４１】

別の態様では、本開示は、核酸中のインデル形成の率を増加させる方法であって、核酸の標的領域内又はその近位に結合するように構成されたＲＮＡ誘導ヘリカーゼを使用して、核酸の標的領域内又はその近位の二本鎖ＤＮＡを巻き戻すステップと、標的領域内でＤＳＢを生成するステップとを含む方法に関する。特定の実施形態では、標的領域内にＤＳＢを生成するステップは、標的領域にインデルの形成をもたらす。特定の実施形態では、ＤＳＢは、標的領域にインデルを形成する様式で修復され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼを使用して達成される遺伝子におけるインデル形成の率は、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼを使用せずに達成される遺伝子におけるインデル形成の率と比較して増加する。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、標的領域内又はその近位に結合するように構成されたｄｇＲＮＡとＲＮＰ複合体を形成し得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、長さが１５ヌクレオチド以下の標的化ドメイン配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９又はＣａｓ９融合タンパク質であり得る。特定の実施形態では、Ｃａｓ９は、酵素的に活性なＣａｓ９又は酵素的に死滅したＣａｓ９であり得る。特定の実施形態では、Ｃａｓ９は、例えば、Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａなどのニッカーゼであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｄｇＲＮＡは、外因的トランス作用因子を標的領域に動員するように構成されていない。特定の実施形態では、二本鎖ＤＮＡを巻き戻すステップは、ＤＮＡに一本鎖又は二本鎖切断を形成するステップ

を含まない。
【００４２】
なおも別の態様では、本開示は、細胞内の標的核酸のセグメントを欠失させる方法であって、細胞をＲＮＡ誘導ヘリカーゼに接触させるステップと、標的領域内にＤＳＢを生成させるステップとを含み、それにより、標的核酸のセグメントは、欠失される、方法に関する。特定の実施形態では、ＤＳＢは、標的核酸のセグメントを欠失させる方法で修復され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、標的核酸の標的領域内又はその近位に結合し、標的領域内又はその近位の二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を巻き戻すように構成され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、標的領域内又はその近位に結合するように構成されたｄｇＲＮＡとリボ核タンパク質複合体を形成し得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、長さが１５ヌクレオチド以下の標的化ドメイン配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９又はＣａｓ９融合タンパク質であり得る。特定の実施形態では、Ｃａｓ９は、酵素的に活性なＣａｓ９又は酵素的に死滅したＣａｓ９であり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｄｇＲＮＡは、外因的トランス作用因子を標的領域に動員するように構成されていない。特定の実施形態では、標的核酸は、遺伝子のプロモーター領域、遺伝子のコード領域、遺伝子の非コード領域、遺伝子のイントロン又は遺伝子のエクソンであり得る。特定の実施形態では、標的核酸のセグメントは、長さが少なくとも約１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５又は１００塩基対であり得る。
【００４３】
本開示は、ｇＲＮＡ標的化ドメインの切り詰めを含む標的化ドメインを含む死滅ｇＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）分子にも関する。特定の実施形態では、切り詰められるｇＲＮＡ標的化ドメインは、表２、表１０又は表１５に記載されるｇＲＮＡ標的化ドメインであり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ標的化ドメインは、ｇＲＮＡ標的化ドメインの５’末端から切り詰められ得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、長さが１５ヌクレオチド以下の標的化ドメイン配列を含み得る。特定の実施形態では、第１の標的化ドメインは、表１０又は表１５に記載されるｄｇＲＮＡ標的化ドメインと同一であるか、又は３ヌクレオチド以下が異なり得る。
【００４４】
本開示の別の態様は、複数のｇＲＮＡをコード化する少なくとも１つのポリヌクレオチドと、１つのＲＮＡ誘導ヘリカーゼとを含む組成物に関し、少なくとも１つのｇＲＮＡは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ切断事象を提供しないように構成されたｄｇＲＮＡであり得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、長さが１５ヌクレオチド以下の標的化ドメイン配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９又はＣａｓ９融合タンパク質であり得る。特定の実施形態では、Ｃａｓ９は、酵素的に活性なＣａｓ９又は酵素的に死滅したＣａｓ９であり得る。特定の実施形態では、Ｃａｓ９は、例えば、Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａなどのニッカーゼであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｄｇＲＮＡは、外因的トランス作用因子を標的領域に動員するように構成されていない。特定の実施形態では、組成物は、切断事象を提供するように構成された第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをさらに含む。特定の実施形態では、組成物は、切断事象を提供するように構成された第２のｇＲＮＡをさらに含む。
【００４５】
別の態様では、本開示は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、標的核酸の標的領域近位の標的核酸に結合して標的領域の立体配座変化を誘導するように構成されたＲＮＡ誘導ヘリカーゼとを含むゲノム編集システムであって、それにより、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの標的領域へのアクセス性が促進され、標的領域に切れ目が形成される、ゲノム編集システムに関する。本開示は、長さが１５ヌクレオチド以下の標的化ドメイン配列を含むｄｇＲＮＡと、第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼとを含むゲノム編集システム

にも関する。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、ｇＲＮＡをさらに含む。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ及び第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的核酸中の標的領域に結合し得る。特定の実施形態では、第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１分子であり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ及び第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的核酸中の第１のＰＡＭ配列に結合し得、ここで、第１のＰＡＭ配列は、外向きである。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｄｇＲＮＡは、外因的トランス作用因子を標的領域に動員するように構成されていない。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡ及び第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的核酸中の標的領域内又はその近位に結合する。特定の実施形態では、第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、それぞれｇＲＮＡ及びｄｇＲＮＡに複合体化して、第１及び第２のリボ核タンパク質複合体を形成し得る。

【００４６】

別の態様では、本開示は、長さが１５ヌクレオチド以下の標的化ドメイン配列を含むｄｇＲＮＡと、第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼとを含むゲノム編集システムに関する。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ及び第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的核酸中の標的領域に結合し得る。特定の実施形態では、第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１分子であり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ及び第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的核酸中の第１のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列に結合し得る。特定の実施形態では、第１のＰＡＭ配列は、外向きであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｄｇＲＮＡは、外因的トランス作用因子を標的領域に動員するように構成されていない。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡ及び第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的核酸中の標的領域内又はその近位に結合し得る。特定の実施形態では、第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、それぞれｇＲＮＡ及びｄｇＲＮＡに複合体化して、第１及び第２のリボ核タンパク質複合体を形成し得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡ及び第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的核酸中の第２のＰＡＭ配列に結合し得、ここで、第２のＰＡＭ配列は、外向きであり得る。

【００４７】

別の態様では、本開示は、ｄｇＲＮＡと、長さが１７ヌクレオチドを超える第２の標的化ドメイン配列を含む第１のｇＲＮＡと、第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとを含むゲノム編集システムに関する。特定の実施形態では、第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｄｇＲＮＡは、標的核酸中の第１の標的領域内に結合するように構成され得る。特定の実施形態では、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び第１のｇＲＮＡは、第２の標的領域に結合するように構成されて、標的核酸中に二本鎖切断（ＤＳＢ）を生じ得、それによって第１の標的領域と第２の標的領域との間にインデルが生成する。特定の実施形態では、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１分子であり得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、長さが１５ヌクレオチド以下の第１の標的化ドメイン配列を含み得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ切断活性が低下しているか又は皆無である。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ切断事象を提供しないように構成され得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡ及び第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的核酸中の第１のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列に結合し得る。特定の実施形態では、第１のＰＡＭ配列は、外向きであり得る。特定の実施形態では、第１のｇＲＮＡ及び第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的核酸中の第２のＰＡＭ配列に結合し得る。特定の実施形態では、第２のＰＡＭ配列は、外向きであり得る。

【００４８】

別の態様では、本開示は、細胞を改変する方法であって、細胞を、ｄｇＲＮＡと、長さが１７ヌクレオチドを超える第２の標的化ドメイン配列を含む第１のｇＲＮＡと、第１の

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとに接触させるステップを含む方法に関する。特定の実施形態では、第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｄｇＲＮＡは、標的核酸中の第１の標的領域内に結合するように構成され得る。特定の実施形態では、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び第１のｇＲＮＡは、第２の標的領域に結合して、標的核酸中に二本鎖切断（ＤＳＢ）を生じ得、それによって第１の標的領域と第２の標的領域との間にインデルが生成する。特定の実施形態では、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１分子であり得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、長さが１５ヌクレオチド以下の第１の標的化ドメイン配列を含み得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ切断活性が低下しているか又は皆無である。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ切断事象を提供するように構成され得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡ及び第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的核酸中の第１のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列に結合し得る。特定の実施形態では、第１のＰＡＭ配列は、外向きであり得る。特定の実施形態では、第１のｇＲＮＡ及び第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的核酸中の第２のＰＡＭ配列に結合し得る。特定の実施形態では、第２のＰＡＭ配列は、外向きであり得る。

【００４９】

本開示は、細胞を改変する方法であって、細胞を、本明細書で開示されるゲノム編集システムのいずれかに接触させるステップを含む方法にも関する。特定の実施形態では、細胞を接触させるステップは、細胞を、第１及び第２のリボ核タンパク質複合体を含む溶液に接触させるステップを含み得る。特定の実施形態では、細胞を溶液に接触させるステップは、細胞を電気穿孔するステップをさらに含み、それによって第１及び第２のリボ核タンパク質複合体が細胞内に導入される。

【００５０】

別の態様では、本開示は、本明細書で開示された方法を用いて改変された細胞に関する。ＨｂＦ発現をもたらす生産的インデルを含む細胞も本明細書で開示される。特定の実施形態では、インデルは、細胞を、ｄｇＲＮＡと、長さが１７ヌクレオチドを超える第２の標的化ドメイン配列を含む第１のｇＲＮＡと、第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとに接触させることによって生成され得る。特定の実施形態では、第１のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｄｇＲＮＡは、標的核酸中の第１の標的領域内に結合するように構成され得る。特定の実施形態では、第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び第１のｇＲＮＡは、第２の標的領域に結合して、標的核酸中に二本鎖切断（ＤＳＢ）を生じ得、それによって第１の標的領域と第２の標的領域との間にインデルが生成する。特定の実施形態では、本明細書で開示される細胞は、赤芽球、赤血球又は赤血球若しくは赤芽球の前駆体に分化することができ得る。特定の実施形態では、細胞は、ＣＤ３４＋細胞であり得る。

【００５１】

上記の全ての特徴のいずれかを含むゲノム編集システム又は方法は、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせを含む標的核酸を含み得る。特定の実施形態では、標的領域は、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域であり得る。特定の実施形態では、第１の標的化ドメイン配列は、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域の側の第１の配列に相補的であり得、ここで、第１の配列は、任意選択的に、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域と重なる。特定の実施形態では、第２の標的化ドメイン配列は、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域の側の第２の配列に相補的であり得、ここで、第２の配列は、任意選択的に、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域と重なる。特定の実施形態では、第１の標的化ドメインは、ｇＲＮＡ標的化ドメインの切り詰めを含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ標的化ドメインは、表２、表１０又は表１５に記載されるｇＲＮＡを含み得、ｇＲＮＡ標的化ドメインは、ｇＲＮＡ標的化ドメインの５’末端から切り詰められている。特定の実施形態では、第１

の標的化ドメインは、表１０又は表１５に記載されるｄｇＲＮＡ標的化ドメインと同一であるか、又は３ヌクレオチド以下が異なる。特定の実施形態では、第２の標的化ドメインは、表２、表１０又は表１５に記載されるｇＲＮＡ標的化ドメインと３ヌクレオチド以下が異なる。特定の実施形態では、インデルは、ＣＣＡＡＴボックス標的領域インデルを改変し得る。特定の実施形態では、インデルは、胎児型ヘモグロビン発現のレベルの増加をもたらす生産的インデルであり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ、ｄｇＲＮＡ又はその両方は、生体外合成されるか又は化学的に合成され得る。

【００５２】

特定の実施形態では、細胞は、本明細書で開示される細胞を改変するための方法のいずれかによって生成されたＨＢＧ遺伝子座の少なくとも１つの修飾対立遺伝子を含み得、ここで、ＨＢＧ遺伝子座の修飾対立遺伝子は、ヒトＨＢＧ１遺伝子、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせの改変を含む。

【００５３】

特定の実施形態では、単離された細胞の集団は、本明細書で開示される細胞を改変するための方法のいずれかによって修飾され得、ここで、細胞の集団は、方法によって修飾されていない、単離された細胞の集団又は同一細胞型のそれらの子孫と異なり得るインデルの分布を含み得る。

【００５４】

特定の実施形態では、複数の細胞は、本明細書で開示される細胞を改変するための方法のいずれかによって生成され得、ここで、細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％は、ヒトＨＢＧ１遺伝子、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域内における配列の改変を含み得る。

【００５５】

特定の実施形態では、本明細書で開示される細胞は、薬剤のために使用され得る。特定の実施形態では、細胞は、β-異常ヘモグロビン症の治療で使用され得る。特定の実施形態では、β-異常ヘモグロビン症は、鎌状赤血球症及びβ-サラセミアからなる群から選択され得る。

【００５６】

一態様では、本開示は、細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％がヒトＨＢＧ１又はＨＢＧ２遺伝子のＣＣＡＡＴボックス標的領域の配列の改変を含み、上記に開示されたｄｇＲＮＡを含む方法によって生成された複数の細胞又は細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％がヒトＨＢＧ１又はＨＢＧ２のＣＣＡＡＴボックス標的領域の配列に改変を含む、上記に開示された方法によって生成された複数の細胞を含む組成物に関する。特定の実施形態では、複数の細胞の少なくとも一部は、赤血球系統内であり得る。特定の実施形態では、複数の細胞は、未修飾の複数の細胞と比較して胎児型ヘモグロビン発現のレベルが増加していることを特徴とし得る。特定の実施形態では、胎児型ヘモグロビンのレベルは、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％増加し得る。特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含み得る。

【００５７】

一態様では、本開示は、上記のｄｇＲＮＡを含むゲノム編集システムによって修飾された細胞の集団に関し、ここで、細胞の集団は、ゲノム編集システムによって修飾されていない細胞の集団と比較してより高い百分率の生産的インデルを含む。本開示は、ゲノム編集システムによって修飾されていない細胞の集団と比較してより高い百分率の細胞の集団が、ＨｂＦを発現する赤血球系統の細胞の集団に分化することができる、上記のｄｇＲＮＡを含むゲノム編集システムによって修飾された細胞の集団にも関する。特定の実施形態では、より高い百分率は、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％又は少なくとも約４０％高いことができる。特定の実施形態では、細胞は、造血幹細胞であり得る。特定の実施形態では、細胞は、赤芽球、赤血球又は赤血球若しくは赤芽球の前駆体に分化することができ得る。特定の実施形態では、インデル

は、マイクロホモロジー媒介末端結合（ＭＭＥＪ）修復以外の修復機序によって生成され得る。

【００５８】

本開示は、対象におけるβ-異常ヘモグロビン症を治療するための薬剤の製造における、本明細書で開示される細胞のいずれかの使用にも関する。

【００５９】

一態様では、本開示は、β-異常ヘモグロビン症の治療を、それを必要とする対象において行う方法であって、本明細書で開示される細胞を対象に投与するステップを含む方法に関する。特定の実施形態では、β-異常ヘモグロビン症の治療を、それを必要とする対象において行う方法は、修飾された造血細胞の集団を対象に投与するステップを含み得、ここで、１つ又は複数の細胞は、本明細書で開示される細胞を改変する方法に従って改変される。

【００６０】

一態様では、本開示は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、第１のガイドＲＮＡとを含むゲノム編集システムに関し、ここで、第１のガイドＲＮＡは、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域の側の第１の配列に相補的な第１の標的化ドメインを含み得、第１の配列は、任意選択的に、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域と重なる。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域の改変をコード化する鋳型核酸をさらに含み得る。特定の実施形態では、鋳型核酸は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）又は二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｄｓＯＤＮ）であり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、５’相同性アーム、置換配列及び３’相同性アームを含み得る。特定の実施形態では、相同性アームは、長さが対称的であり得る。特定の実施形態では、相同性アームは、長さが非対称的であり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、１つ又は複数のホスホロチオエート修飾を含み得る。特定の実施形態では、１つ又は複数のホスホロチオエート修飾は、５’末端、３’末端又はそれらの組み合わせであり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、プラス鎖又はマイナス鎖であり得る。特定の実施形態では、改変は、非自然発生の改変であり得る。特定の実施形態では、改変は、ＣＣＡＡＴボックス標的領域の欠失を含み得る。特定の実施形態では、欠失は、１８ｎｔ欠失、１１ｎｔ欠失、４ｎｔ欠失、１ｎｔ欠失又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域は、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域、１ｎｔ標的領域又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなど、長さが約２５～約２００以上のヌクレオチドであり得；置換配列は、０ヌクレオチドの長さを含み得；３’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチド以上であり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１８ｎｔ標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得、３’相同性アームは、１８ｎｔ標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９７４又は配列番号９７５を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１１ｎｔ標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得、３’相同性アームは、１１ｎｔ標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９７６又は配列番号９７８を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る特定の実施形態では、５’相同性アームは、４ｎｔ標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００

ｂｐの相同性を含み得、３’相同性アームは、４ｎｔ標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９８４、配列番号９８５、配列番号９８６、配列番号９８７、配列番号９８８、配列番号９８９、配列番号９９０、配列番号９９１、配列番号９９２、配列番号９９３、配列番号９９４及び配列番号９９５からなる群から選択される配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１ｎｔ標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得、３’相同性アームは、１ｎｔ標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得る。特定の実施形態では、相同性アームは、長さが対称的であり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９８２又は配列番号９８３を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。特定の実施形態では、改変は、自然発生の改変であり得る。特定の実施形態では、改変は、ＣＣＡＡＴボックス標的領域の欠失又は変異を含み得る。特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域は、１３ｎｔ標的領域、－１１７Ｇ＞Ａ標的領域又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、改変は、１３ｎｔ標的領域における１３ｎｔ欠失若しくは－１１７Ｇ＞Ａ標的領域におけるＧからＡへの置換又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１３ｎｔ標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得、３’相同性アームは、１３ｎｔ標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９７７又は配列番号９７９を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１３ｎｔ標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得、３’相同性アームは、１３ｎｔ標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９８０又は配列番号９８１を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９であり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、本明細書で開示されるようなＣｐｆ１変異型であり得る。特定の実施形態では、第１の標的化ドメインは、表７、表１８、表１９に列挙される標的化ドメイン又は表１２、表１９のｇＲＮＡと３ヌクレオチド以下が異なり得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、第２のガイドＲＮＡをさらに含み得、ここで、第２のガイドＲＮＡは、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域の側の第２の配列に相補的であり得る、第２の標的化ドメインを含み得、第２の配列は、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域と任意選択的に重なる。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ニッカーゼであり得、任意選択的にＲｕｖＣ活性を欠く。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、第１及び第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含み得る。特定の実施形態では、第１及び第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、それぞれ第１及び第２のガイドＲＮＡに複合体化して、第１及び第２のリボ核タンパク質複合体を形成し得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、第３のガイドＲＮＡと、任意選択的に第４のガイドＲＮＡとをさらに含み得、ここで、第３及び第４のガイドＲＮＡは、ヒトＢＣＬ１１Ａ遺伝子のＢＣＬ１１Ａ赤血球エンハンサー（ＢＣＬ１１Ａｅ）中のＧＡＴＡ１結合モチーフの位置の反対側にある、第３及び第４の配列と相補的な第３及び第４の標的化ドメインを含み得、第３及び第４の配列の一方又は両方は、任意選択的に、ヒトＢＣＬ１１Ａ遺伝子のＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフと重なる。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフの欠失をコード化する核酸鋳型をさらに含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９であ

り得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ニッカーゼであり得、任意選択的にＲｕｖＣ活性を欠く。特定の実施形態では、第３の標的化ドメインは、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ上流の１０００ヌクレオチド以内の配列と相補的であり得る。特定の実施形態では、第３の標的化ドメインは、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ上流の１００ヌクレオチド以内の配列と相補的であり得る。特定の実施形態では、第３及び第４の標的化ドメインの１つは、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ下流の１００ヌクレオチド以内の配列と相補的であり得る。特定の実施形態では、第４の標的化ドメインは、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ下流の５０ヌクレオチド以内の配列と相補的であり得る。特定の実施形態では、第３及び第４の標的化ドメインの少なくとも１つは、表９に列挙される標的化ドメインと３ヌクレオチド以下が異なり得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、第１及び第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含み得る。特定の実施形態では、第１及び第２のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、それぞれ第３及び第４のガイドＲＮＡに複合体化して、第３及び第４のリボ核タンパク質複合体を形成し得る。

【００６１】

一態様では、本開示は、細胞を改変する方法であって、細胞をゲノム編集システムに接触させるステップを含む方法に関する。特定の実施形態では、細胞をゲノム編集システムに接触させるステップは、細胞を、第１及び第２のリボ核タンパク質複合体を含む溶液に接触させるステップを含み得る。特定の実施形態では、細胞を溶液に接触させるステップは、細胞を電気穿孔するステップをさらに含み得、それによって第１及び第２のリボ核タンパク質複合体が細胞内に導入される。特定の実施形態では、細胞を改変する方法は、細胞をゲノム編集システムに接触させるステップをさらに含み得、細胞をゲノム編集システムに接触させるステップは、細胞を、第１、第２、第３及び任意選択的に第４のリボ核タンパク質複合体を含む溶液に接触させるステップを含み得る。特定の実施形態では、細胞を溶液に接触させるステップは、細胞を電気穿孔するステップをさらに含み得、それによって第１、第２、第３及び任意選択的に第４のリボ核タンパク質複合体が細胞内に導入される。特定の実施形態では、細胞は、赤芽球、赤血球又は赤血球若しくは赤芽球の前駆体に分化することができ得る。特定の実施形態では、細胞は、ＣＤ３４$^{+}$細胞であり得る。

【００６２】

一態様では、本開示は、細胞を改変するＣＲＩＳＰＲ媒介方法であって、ヒトＨＢＧ１又はＨＢＧ２遺伝子の位置ｃ．－１０６～－１２０の細胞のゲノム内に第１のＤＮＡ一本鎖切断（ＳＳＢ）又は二本鎖切断（ＤＳＢ）を導入するステップと；任意選択的に、ヒトＨＢＧ１又はＨＢＧ２遺伝子の位置ｃ．－１０６～－１２０の細胞のゲノム内に第２のＳＳＢ又はＤＳＢを導入するステップとを含むＣＲＩＳＰＲ媒介方法に関し、ここで、第１及び第２のＳＳＢ又はＤＳＢは、ヒトＨＢＧ１又はＨＢＧ２遺伝子のＣＣＡＡＴボックス標的領域を改変する様式で細胞によって修復され得る。特定の実施形態では、第１及び第２のＳＳＢ又はＤＳＢは、ヒトＨＢＧ１又はＨＢＧ２遺伝子のＣＣＡＡＴボックス標的領域の改変をもたらす様式で細胞によって修復され得る。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ媒介方法は、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域の改変をコード化する鋳型核酸をさらに含み得る。特定の実施形態では、鋳型核酸は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）であり得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、５’相同性アーム、置換配列及び３’相同性アームを含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、プラス鎖又はマイナス鎖であり得る。特定の実施形態では、改変は、非自然発生の改変であり得る。特定の実施形態では、第１及び第２のＳＳＢ又はＤＳＢは、ヒトＨＢＧ１又はＨＢＧ２遺伝子のＣＣＡＡＴボックス標的領域にインデル、欠失又は挿入の少なくとも１つの形成をもたらす様式で細胞によって修復され得る。特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域は、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域、１ｎｔ標的領域又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチド

以上であり得；置換配列は、０ヌクレオチドの長さを含み得；３’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチド以上であり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域又は１ｎｔ標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得、３’相同性アームは、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域又は１ｎｔ標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９７４、配列番号９７５、配列番号９７６、配列番号９７８、配列番号９８４、配列番号９８５、配列番号９８６、配列番号９８７、配列番号９８８、配列番号９８９、配列番号９９０、配列番号９９１、配列番号９９２、配列番号９９３、配列番号９９４、配列番号９９５、配列番号９８２及び配列番号９８３からなる群から選択される配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。特定の実施形態では、改変は、非自然発生の改変であり得る。特定の実施形態では、第１及び第２のＳＳＢ又はＤＳＢは、ヒトＨＢＧ１又はＨＢＧ２遺伝子のＣＣＡＡＴボックス標的領域にインデル、欠失又は挿入の少なくとも１つの形成をもたらす様式で細胞によって修復され得る。特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域は、１３ｎｔ標的領域、－１１７Ｇ＞Ａ標的領域又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、改変は、１３ｎｔ標的領域における１３ｎｔ欠失若しくは－１１７Ｇ＞Ａ標的領域におけるＧからＡへの置換又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１３ｎｔ標的領域又は－１１７Ｇ＞Ａ標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得、３’相同性アームは、１３ｎｔ標的領域又は－１１７Ｇ＞Ａ標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９７７又は配列番号９７９、配列番号９８０又は配列番号９８１からなる群から選択される配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【００６３】

一態様では、本開示は、本明細書で開示される細胞を改変する方法によって生成された複数の細胞を含み得る組成物に関し、ここで、細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％は、ヒトＨＢＧ１遺伝子、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域の配列の改変を含み得る。特定の実施形態では、改変は、ヒトＨＢＧ１遺伝子、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせの１８ｎｔ欠失、１１ｎｔ欠失、４ｎｔ欠失、１ｎｔ欠失、１３ｎｔ欠失、－１１７におけるＧからＡへの置換を含み得る。特定の実施形態では、複数の細胞の少なくとも一部は、赤血球系統内であり得る。特定の実施形態では、複数の細胞は、未修飾の複数の細胞と比較して胎児型ヘモグロビン発現のレベルが増加していることを特徴とし得る。特定の実施形態では、胎児型ヘモグロビンのレベルは、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％増加し得る。特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含み得る。

【００６４】

一態様では、本開示は、本明細書で開示される細胞を改変する方法によって生成された合成遺伝子型を含む細胞に関し、ここで、細胞は、ヒトＨＢＧ１遺伝子、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせの１８ｎｔ欠失、１１ｎｔ欠失、４ｎｔ欠失、１ｎｔ欠失、１３ｎｔ欠失、－１１７におけるＧからＡへの置換を含み得る。

【００６５】

一態様では、本開示は、本明細書で開示される細胞を改変する方法によって生成されたＨＢＧ遺伝子座の少なくとも１つの対立遺伝子を含む細胞に関し、ここで、細胞は、ヒトＨＢＧ１遺伝子、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせの１８ｎｔ欠失、１１ｎｔ欠失、４ｎｔ欠失、１ｎｔ欠失、１３ｎｔ欠失、－１１７におけるＧからＡへの置換をコード

化し得る。

【００６６】

一態様では、本開示は、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域の非自然発生の改変をコード化する鋳型核酸を含み得るＡＡＶベクターに関する。特定の実施形態では、鋳型核酸は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）であり得る。特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域は、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域、１ｎｔ標的領域又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、５’相同性アーム、置換配列及び３’相同性アームを含み得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなど、長さが約２５～約２００以上のヌクレオチドであり得；置換配列は、０ヌクレオチドの長さを含み得；３’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチド以上であり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域又は１ｎｔ標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得、３’相同性アームは、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域又は１ｎｔ標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９７４～９７６、配列番号９７８、配列番号９８２～９９５からなる群から選択される配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【００６７】

一態様では、本開示は、ヒトＨＢＧ１、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域の非自然発生の改変をコード化する鋳型核酸を含むヌクレオチド配列に関する。特定の実施形態では、鋳型核酸は、改変を含む一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）又は二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｄｓＯＤＮ）であり得る。特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域は、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域、１ｎｔ標的領域又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、５’相同性アーム、置換配列及び３’相同性アームを含み得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなど、長さが約２５～約２００以上のヌクレオチドであり得；置換配列は、０ヌクレオチドの長さを含み得；３’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチド以上であり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域又は１ｎｔ標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得、３’相同性アームは、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域又は１ｎｔ標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含み得る。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９７４～９７６、配列番号９７８、配列番号９８２～９９５からなる群から選択される配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。

【００６８】

一態様では、本開示は、合成遺伝子型を含む細胞に関し、ここで、細胞は、ヒトＨＢＧ１遺伝子、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせの１８ｎｔ欠失、１１ｎｔ欠失、４ｎｔ欠失、１ｎｔ欠失、１３ｎｔ欠失、－１１７におけるＧからＡへの置換を含み得る。

【００６９】

一態様では、本開示は、本明細書で開示される細胞を改変する方法によって生成された細胞の集団を含む組成物に関し、細胞は、未修飾の細胞の集団と比較してヒトＨＢＧ１遺伝子、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせのＣＣＡＡＴボックス標的領域の配列のよ

り高い頻度の改変を含む。特定の実施形態では、より高い頻度は、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％又は９０％高い。特定の実施形態では、改変は、ヒトＨＢＧ１遺伝子、ＨＢＧ２遺伝子又はそれらの組み合わせの１８ｎｔ欠失、１１ｎｔ欠失、４ｎｔ欠失、１ｎｔ欠失、１３ｎｔ欠失、－１１７におけるＧからＡへの置換を含む。特定の実施形態では、細胞の集団の少なくとも一部は、赤血球系統内にある。

【００７０】

この一覧は、包括的及び限定的なものではなく、例示的及び説明的なものであることが意図される。追加的な態様及び実施形態は、本開示の残りの部分及び特許請求の範囲に記載されるか又はそれらから明らかにされ得る。

【００７１】

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

【図面の簡単な説明】

【００７２】

【図１】ヒト染色体１１上のβ-グロビン遺伝子クラスターに関連してＨＢＧ１及びＨＢＧ２遺伝子を概略的に示す。図１．β-グロビン遺伝子クラスター内の各遺伝子は、近位プロモーターによって転写調節される。いかなる特定の理論による拘束も望まないが、一般に、Ａγ及び／又はＧγ発現は、近位のプロモーターと、遠位の強赤血球特異的エンハンサーである遺伝子座制御領域（ＬＣＲ）との間の係合によって活性化されると考えられる。ＬＣＲによる長距離トランス活性化は、クロマチン配置／立体配座の改変によって媒介されると考えられている。ＬＣＲは、４つの赤血球特異的ＤｎａｓｅＩ高感受性部位（ＨＳ１～４）及び２つの遠位エンハンサー要素（５’ＨＳ及び３’ＨＳ１）でマークされる。□様遺伝子グロビン遺伝子発現は、発達段階特異的に調節され、グロビン遺伝子変化の発現は、血液産生の主要部位の変化と一致する。

【図２Ａ】ＨＢＧ１及びＨＢＧ２遺伝子、コード化配列（ＣＤＳ）及び患者において同定され、胎児型ヘモグロビン（ＨｂＦ）の上昇と関連付けられているＨＢＧ１及びＨＢＧ２近位プロモーター内及びその上流における小規模な欠失及び点変異を示す。胎児型ヘモグロビン（ＨＰＦＨ）の遺伝性持続性を有する一部の患者において欠失している、近位プロモーター（ＣＡＡＴボックス、１３ｎｔ配列）内のコア要素。ｇＲＮＡ結合標的部位についてスクリーニングされた各遺伝子座の「標的配列」領域も同定されている。

【図２Ｂ】ＨＢＧ１及びＨＢＧ２遺伝子、コード化配列（ＣＤＳ）及び患者において同定され、胎児型ヘモグロビン（ＨｂＦ）の上昇と関連付けられているＨＢＧ１及びＨＢＧ２近位プロモーター内及びその上流における小規模な欠失及び点変異を示す。胎児型ヘモグロビン（ＨＰＦＨ）の遺伝性持続性を有する一部の患者において欠失している、近位プロモーター（ＣＡＡＴボックス、１３ｎｔ配列）内のコア要素。ｇＲＮＡ結合標的部位についてスクリーニングされた各遺伝子座の「標的配列」領域も同定されている。

【図３Ａ】図３は、ヒトＫ５６２赤白血病細胞内の１３ｎｔ欠失組み込みについてのｇＲＮＡスクリーニングからのデータを示す。図３Ａは、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）特異的ｇＲＮＡをコード化するＤＮＡ及びＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９をコード化するプラスミドＤＮＡによる電気穿孔後における、Ｋ５６２細胞から抽出されたゲノムＤＮＡから増幅されたＨＢＧ１及びＨＢＧ２遺伝子座特異的ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１エンドヌクレアーゼアッセイ解析（以下では「Ｔ７Ｅ１解析」と同義的に言及される）によって判定された遺伝子編集である。

【図３Ｂ】図３は、ヒトＫ５６２赤白血病細胞内の１３ｎｔ欠失組み込みについてのｇＲ

ＮＡスクリーニングからのデータを示す。図３Ｂは、示されたｇＲＮＡ及びＣａｓ９プラスミドをコード化するＤＮＡによる電気穿孔後における、Ｋ５６２細胞から抽出されたゲノムＤＮＡ中のＨＢＧ１遺伝子座から増幅されたＰＣＲ産物のＤＮＡ配列解析によって判定された遺伝子編集である。図３Ｂでは、編集事象のタイプ（挿入、欠失）及び欠失サブタイプ（１３ｎｔ標的の部分的欠失［１２ｎｔ　ＨＰＦＨ］又は完全欠失［１３－２６ｎｔ　ＨＰＦＨ］、他の配列の欠失［他の欠失］）は、異なる網掛け／模様のバーで示される。

【図３Ｃ】図３は、ヒトＫ５６２赤白血病細胞内の１３ｎｔ欠失組み込みについてのｇＲＮＡスクリーニングからのデータを示す。図３Ｃは、示されたｇＲＮＡ及びＣａｓ９プラスミドをコード化するＤＮＡによる電気穿孔後における、Ｋ５６２細胞から抽出されたゲノムＤＮＡ中のＨＢＧ２遺伝子座から増幅されたＰＣＲ産物のＤＮＡ配列解析によって判定された遺伝子編集である。図３Ｃでは、編集事象のタイプ（挿入、欠失）及び欠失サブタイプ（１３ｎｔ標的の部分的欠失［１２ｎｔ　ＨＰＦＨ］又は完全欠失［１３－２６ｎｔ　ＨＰＦＨ］、他の配列の欠失［他の欠失］）は、異なる網掛け／模様のバーで示される。

【図４Ａ】図４は、特定の１３ｎｔ配列（ＨＢＧ　ｓｇＲＮＡ　Ｓｐ３５及びＳｐ３７）を欠失の標的とする、生体外転写Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）ｇＲＮＡに複合体化したＲＮＰによる電気穿孔後における、ヒト臍帯血（ＣＢ）及びヒト成人ＣＤ３４$^{+}$細胞における遺伝子編集の結果を示す。図４Ａは、示されたＲＮＰで処理されたＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞又はドナー適合未処理対照細胞から抽出されたｇＤＮＡから増幅された、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２特異的ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１分析によって検出されたインデルの百分率を示す（ｎ＝３種のＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞、３回の別々の実験）。示されるデータは、別々の３人のドナー／３回の実験における平均値を表し、誤差棒は、標準偏差に相当する。

【図４Ｂ】図４は、特定の１３ｎｔ配列（ＨＢＧ　ｓｇＲＮＡ　Ｓｐ３５及びＳｐ３７）を欠失の標的とする、生体外転写Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）ｇＲＮＡに複合体化したＲＮＰによる電気穿孔後における、ヒト臍帯血（ＣＢ）及びヒト成人ＣＤ３４$^{+}$細胞における遺伝子編集の結果を示す。図４Ｂは、示されたＲＮＰで処理されたＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞、又は成人ＣＤ３４$^{+}$細胞、又はドナー適合未処理対照細胞から抽出されたｇＤＮＡから増幅された、ＨＢＧ２特異的ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１分析によって検出されたインデルの百分率を示す（ｎ＝３　ＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞、ｎ＝３種の動員末梢血（ｍＰＢ）ＣＤ３４$^{+}$細胞、３回の別々の実験）。示されるデータは、別々の３人のドナー／３回の実験における平均値を表し、誤差棒は、標準偏差を表す。

【図４Ｃ】図４は、特定の１３ｎｔ配列（ＨＢＧ　ｓｇＲＮＡ　Ｓｐ３５及びＳｐ３７）を欠失の標的とする、生体外転写Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）ｇＲＮＡに複合体化したＲＮＰによる電気穿孔後における、ヒト臍帯血（ＣＢ）及びヒト成人ＣＤ３４$^{+}$細胞における遺伝子編集の結果を示す。図４Ｃ（上側パネル）は、ＨＢＧ　Ｓｐ３５ＲＮＰ又はＨＢＧ　Ｓｐ３７ＲＮＰ＋／－ｓｓＯＤＮ（未修飾又はＰｈＴｘ修飾５’及び３’末端あり）で電気穿孔された、ヒトＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞から抽出されたｇＤＮＡから増幅された、ＨＢＧ２　ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１分析によって検出されたインデルを示す。左下のパネルは、ＨＢＧ　Ｓｐ３７ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮで編集された細胞からのｇＤＮＡのサンガーＤＮＡ配列解析によって判定された遺伝子編集のレベルを示す。右下のパネルは、全欠失内で検出された特定タイプの欠失を示す。

【図５Ａ】図５は、１３ｎｔ欠失をコード化するＨＢＧ　Ｓｐ３７ＲＮＰ＋／－ｓｓＯＤＮによるｍＰＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞の電気穿孔後における、成人ヒト動員末梢血（ｍＰＢ）ＣＤ３４$^{+}$細胞内のＨＢＧの遺伝子編集と、ＲＮＰ処理細胞の赤血球子孫における胎児型ヘモグロビンの誘導とを示す。図５Ａは、ＲＮＰ処理ｍＰＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞又はドナー適合未処理対照細胞から抽出されたｇＤＮＡから増幅された、ＨＢＧ２　ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１分析によって検出されたインデルの百分率を示す。

【図５Ｂ】図５は、１３ｎｔ欠失をコード化するＨＢＧ　Ｓｐ３７ＲＮＰ＋／－ｓｓＯＤＮによるｍＰＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞の電気穿孔後における、成人ヒト動員末梢血（ｍＰＢ）ＣＤ３４$^{+}$細胞内のＨＢＧの遺伝子編集と、ＲＮＰ処理細胞の赤血球子孫における胎児型ヘモグロビンの誘導とを示す。図５Ｂは、ＲＮＰ処理及び未処理のドナー適合対照ｍＰＢ　ＣＤ

３４$^{+}$細胞から分化した７日目の赤芽球におけるＨＢＧ ｍＲＮＡ発現の変化倍率を示す。ｍＲＮＡレベルは、ＧＡＰＤＨに対して正規化され、対応する分化日数の未処理対照で検出されたレベルに較正される。

【図６Ａ】図６は、同一ドナーからのＲＮＰ処理及び未処理のｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の生体外分化能を示す。図６Ａは、造血骨髄球／赤血球コロニー形成細胞（ＣＦＣ）の可能性を示し、コロニーの数及びサブタイプが示される（ＧＥＭＭ：顆粒球－赤血球－単球－マクロファージコロニー、Ｅ：赤血球コロニー、ＧＭ：顆粒球マクロファージコロニー、Ｍ：マクロファージコロニー、Ｇ：顆粒球コロニー）。

【図６Ｂ】図６は、同一ドナーからのＲＮＰ処理及び未処理のｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の生体外分化能を示す。図６Ｂは、示された時点及び示されたサンプルについてフローサイトメトリー分析によって判定された、赤血球分化の時間経過にわたって発現されたグリコフォリンＡの百分率を示す。

【図７Ａ】図７Ａは、ＨＢＧ ＲＮＰ（Ｄ１０Ａ対合ニッカーゼ）処理ヒトｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞から抽出されたｇＤＮＡから増幅された、ＨＢＧ ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１分析によって検出されたインデルを示す。サンプルのサブセットでは、１３ｎｔ欠失に加えてサイレントＳＮＰをコード化するｓｓＯＤＮも細胞に投与され、ＨＤＲ（ｓｓＯＤＮ）がモニターされた。

【図７Ｂ】図７Ｂは、図７Ａに示されたサンプルの選択されたサブセットに対するＤＮＡ配列決定解析を示す。インデルは、インデルのタイプ（挿入、１３ｎｔ欠失又は他の欠失）に従って細分化された。

【図８Ａ】図８Ａは、Ｄ１０Ａニッカーゼ及びＷＴ ＲＮＰ対中に複合体化した示されたｇＲＮＡ対によるｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の電気穿孔後における、ＨＢＧ標的部位におけるインデルを示す。

【図８Ｂ】図８Ｂは、Ｄ１０Ａニッカーゼ及びＷＴ ＲＮＰ対中に複合体化した示されたｇＲＮＡ対によるｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の電気穿孔後における大型欠失事象（例えば、ＨＢＧ２の欠失）を示す。

【図８Ｃ】図８Ｃは、対合Ｄ１０Ａニッカーゼ対で処理されたｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞からのｇＤＮＡ中で検出されたＤＮＡ配列決定解析及び事象のサブタイプ（挿入、欠失）を示す。

【図８Ｄ】図８Ｄは、対合ＷＴ ＲＮＰ対で処理されたｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞からのｇＤＮＡ中で検出されたＤＮＡ配列決定解析及び事象のサブタイプ（挿入、欠失）を示す。

【図９】図７及び８で示された実験のために、ＨＢＧを標的化する対合ＲＮＰで処理されたｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の子孫におけるＨｂＦタンパク質及びｍＲＮＡ発現の概要を示す。ＨｂＦタンパク質（ＨＰＬＣ分析による）及びＨｂＦ ｍＲＮＡ発現（ｄｄＰＣＲ分析）は、ＲＮＰ処理ヒトｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の赤血球子孫において評価された（ＲＮＰ処理ＣＤ３４$^{+}$細胞の子孫で検出されたレベルから、ドナー適合未処理対照で検出されたＨｂＦのバックグラウンドレベルが差し引かれた）。

【図１０Ａ】図１０は、異なる濃度（０、２．５、３．７μＭ）の対合Ｄ１０Ａニッカーゼ ＲＮＰ（ＳｐＡ＋Ｓｐ８５）による処理後におけるＣＤ３４$^{+}$細胞のインデル頻度及び生体外及び生体内短期造血能力を示す。インデルは、Ｔ７Ｅ１分析（図１０Ａ）及びIllumina配列解析（挿入及び欠失、図１０Ｂ）によって評価された。

【図１０Ｂ】図１０は、異なる濃度（０、２．５、３．７μＭ）の対合Ｄ１０Ａニッカーゼ ＲＮＰ（ＳｐＡ＋Ｓｐ８５）による処理後におけるＣＤ３４$^{+}$細胞のインデル頻度及び生体外及び生体内短期造血能力を示す。インデルは、Ｔ７Ｅ１分析（図１０Ａ）及びIllumina配列解析（挿入及び欠失、図１０Ｂ）によって評価された。

【図１０Ｃ】図１０は、異なる濃度（０、２．５、３．７μＭ）の対合Ｄ１０Ａニッカーゼ ＲＮＰ（ＳｐＡ＋Ｓｐ８５）による処理後におけるＣＤ３４$^{+}$細胞のインデル頻度及び生体外及び生体内短期造血能力を示す。図１０Ｃは、ＨＰＬＣ分析によって検出されたＨｂＦタンパク質の％を示す（％ＨｂＦ＝１００％×ＨｂＦ／（ＨｂＦ＋ＨｂＡ）。

【図１０Ｄ】図１０は、異なる濃度（０、２．５、３．７μＭ）の対合Ｄ１０Ａニッカー

ゼＲＮＰ（ＳｐＡ＋Ｓｐ８５）による処理後におけるＣＤ３４$^{+}$細胞のインデル頻度及び生体外及び生体内短期造血能力を示す。図１０Ｄは、コロニー形成細胞（ＣＦＣ）アッセイにおけるＲＮＰ処理及びドナー適合未処理対照ＣＤ３４$^{+}$細胞の造血活性を示す。ＣＦＣは、播種された１０００個のＣＤ３４$^{+}$細胞当たりの数値を示す。

【図１０Ｅ】図１０は、異なる濃度（０、２．５、３．７μＭ）の対合Ｄ１０Ａニッカーゼ ＲＮＰ（ＳｐＡ＋Ｓｐ８５）による処理後におけるＣＤ３４$^{+}$細胞のインデル頻度及び生体外及び生体内短期造血能力を示す。図１０Ｅは、未処理（０μＭ）又は２つの用量（２．５及び３．７５μＭ）の１つのＤ１０Ａ ＲＮＰと対合ｇＲＮＡとで処理された、ドナー適合ヒトｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$の移植１ヶ月後における免疫不全マウス（ＮＳＧ）の末梢血ヒト血液のＣＤ４５$^{+}$細胞再構成を示す。

【図１０Ｆ】図１０は、異なる濃度（０、２．５、３．７μＭ）の対合Ｄ１０Ａニッカーゼ ＲＮＰ（ＳｐＡ＋Ｓｐ８５）による処理後におけるＣＤ３４$^{+}$細胞のインデル頻度及び生体外及び生体内短期造血能力を示す。図１０Ｆは、移植２ヶ月後における免疫不全マウス（ＮＳＧ）の末梢血のヒト血液ＣＤ４５$^{+}$細胞再構成を示す。

【図１０Ｇ】図１０は、異なる濃度（０、２．５、３．７μＭ）の対合Ｄ１０Ａニッカーゼ ＲＮＰ（ＳｐＡ＋Ｓｐ８５）による処理後におけるＣＤ３４$^{+}$細胞のインデル頻度及び生体外及び生体内短期造血能力を示す。図１０Ｇは、１ヶ月目におけるＮＳＧマウスのヒトＣＤ４５$^{+}$血液細胞再構成に続く系統分布を示す。

【図１０Ｈ】図１０は、異なる濃度（０、２．５、３．７μＭ）の対合Ｄ１０Ａニッカーゼ ＲＮＰ（ＳｐＡ＋Ｓｐ８５）による処理後におけるＣＤ３４$^{+}$細胞のインデル頻度及び生体外及び生体内短期造血能力を示す。図１０Ｈは、２ヶ月目におけるＮＳＧマウスのヒトＣＤ４５$^{+}$血液細胞再構成に続く系統分布を示す。

【図１１Ａ】図１１Ａは、示された濃度でｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞に送達された２つのＤ１０Ａニッカーゼ ＲＮＰ対（ＳＰ３７＋ＳＰＢ及びＳＰ３７＋ＳＰＡ）について、ＨＰＬＣによってアッセイされたＨｂＦレベルと、Ｔ７Ｅ１解析によって評価されたインデル頻度とを相関させる。ＨｂＦレベルは、編集ＣＤ３４$^{+}$細胞の赤血球子孫（１８日目）において解析された。ドナー適合未処理対照で検出されたＨｂＦタンパク質が、編集されたサンプルから差し引かれた。

【図１１Ｂ】図１１Ｂは、示されたＤ１０Ａニッカーゼ対で処理されたＣＤ３４$^{+}$細胞又は未処理対照と関連付けられた造血コロニー形成細胞（ＣＦＣ）活性に重ね合わされたインデル率を示す。

【図１１Ｃ】図１１Ｃは、所与の濃度の示されたＤ１０ ＲＮＰニッカーゼ対で処理された又はドナー適合未処理対照で処理された、ｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の移植１ヶ月後における免疫不全ＮＳＧマウスのヒトＣＤ４５$^{+}$血液細胞再構成を示す。

【図１１Ｄ】図１１Ｄは、移植の１ヶ月後における、マウス末梢血のヒトＣＤ４５$^{+}$画分で検出されたヒト血液系統分布を示す。

【図１２】ＢＣＬ１１Ａ（ＢＣＬ１１Ａｅ）の＋５８ ＤＮａｓｅＩ高感受性部位（ＤＨＳ）赤血球特異的エンハンサーのＧＡＴＡ１モチーフであるＨｂＦの抑制解除の標的部位を示す（ゲノム座標：ｃｈｒ２：６０，４９５，２６５～６０，４９５，２７０）。

【図１３Ａ】図１３Ａは、示されたＲＮＰ＋／－ｓｓＯＤＮで処理されたＣＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞又はドナー適合未処理対照細胞から抽出されたｇＤＮＡから増幅された、ＢＣＬ１１Ａ ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１エンドヌクレアーゼ解析によって検出されたインデルの百分率を示す。示されるデータは、別々の３人のドナー／３回の実験の平均値を表す。

【図１３Ｂ】図１３Ｂは、示されたＷＴ ＲＮＰ（ＲｕｖＣ及びＨＮＨの両方の活性を有するＷＴ Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９に複合体化した、ＢＣＬ１１Ａ赤血球エンハンサーを標的化する単一のｇＲＮＡ）で処理された又は対合ニッカーゼＲＮＰ（同じＨＮＨ一本鎖切断活性を共有するＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９ニッカーゼに複合体化した、ＢＣＬ１１Ａ赤血球エンハンサーを標的化する対合ｇＲＮＡ（例えば、Ｄ１０Ａ）で処理された、ＣＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞から抽出されたｇＤＮＡから増幅された、ＢＣＬ１１Ａ ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１エンドヌクレアーゼ解析によって検出されたインデル及

び各条件における細胞の造血活性を示す。
【図１４Ａ】図１４Ａは、成人ＢＭ ＣＤ３４$^{+}$細胞におけるＢＣＬ１１Ａｅの編集頻度（ＧＡＴＡ１モチーフを標的化する単一ｇＲＮＡアプローチを用いた）を示す。
【図１４Ｂ】図１４Ｂは、ＤＮＡ配列決定解析による判定で造血コロニー（ＧＥＭＭ、ＢＣＬ１１Ａｅ ＲＮＰ処理ＣＤ３４$^{+}$細胞のクローン性子孫）において検出された単一対立遺伝子及び二対立遺伝子の編集を示す。
【図１４Ｃ】図１４Ｃは、赤芽球の成熟の動態を示す（フローサイトメトリー分析によって検出されたＤＲＡＱ５$^{-}$細胞によって判定された、核除去）。
【図１４Ｄ】図１４Ｄは、分化した対照細胞及びＲＮＰ処理ＢＭ ＣＤ３４$^{+}$細胞における赤血球表現型（グリコフォリンＡ$^{+}$細胞）の取得を示す。
【図１４Ｅ】図１４Ｅは、未処理のドナー適合対照サンプル中のＨｂＦ＋細胞と比較した、フローサイトメトリー分析によって判定されたＨｂＦ$^{+}$細胞の増加倍数を示す。
【図１５Ａ】図１５は、成人ｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞におけるＢＣＬ１１Ａｅの遺伝子編集；及びＢＣＬ１１Ａｅ ＲＮＰ＋非特異的ｓｓＯＤＮによるｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の電気穿孔後におけるＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ処理細胞の赤血球子孫における胎児型ヘモグロビンの誘導を示す。図１５Ａは、ＢＣＬ１１Ａｅ ＲＮＰと非特異的ｓｓＯＤＮとで処理されたｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞又はドナー適合未処理対照細胞から抽出されたｇＤＮＡから増幅された、ＨＢＧ２ ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１分析によって検出されたインデルの百分率を示す。
【図１５Ｂ】図１５は、成人ｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞におけるＢＣＬ１１Ａｅの遺伝子編集；及びＢＣＬ１１Ａｅ ＲＮＰ＋非特異的ｓｓＯＤＮによるｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の電気穿孔後におけるＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ処理細胞の赤血球子孫における胎児型ヘモグロビンの誘導を示す。図１５Ｂは、ＢＣＬ１１Ａｅ ＲＮＰ処理及び未処理のドナー適合対照ｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞から分化した、１０日目の赤芽球におけるＨＢＧ ｍＲＮＡ発現の変化倍率を示す（ｍＲＮＡレベルは、ＧＡＰＤＨに対して正規化され、対応する分化日数の未処理対照で検出されたレベルに較正される）。
【図１５Ｃ】図１５は、成人ｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞におけるＢＣＬ１１Ａｅの遺伝子編集；及びＢＣＬ１１Ａｅ ＲＮＰ＋非特異的ｓｓＯＤＮによるｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の電気穿孔後におけるＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ処理細胞の赤血球子孫における胎児型ヘモグロビンの誘導を示す。図１５Ｃは、示された時点及び示されたサンプルについてフローサイトメトリー分析によって判定された、ＢＣＬ１１Ａｅ ＲＮＰ及び非特異的ｓｓＯＤＮによる処理ありのｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の赤血球分化の時間経過にわたって発現されたグリコフォリンＡの百分率を示す。
【図１６】１６μＭの濃度において、化学的に合成されたガイドＲＮＡ ＯＬＩ７０６６（表１０配の列番号９７０）に複合体化したＣａｓ９（「ＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ」）で処理された造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）から抽出されたｇＤＮＡから増幅された、ＨＢＧ ＰＣＲ産物の次世代配列決定法（ＮＧＳ）によって検出されたインデルの百分率を示す。ＨＢＧΔ－１０２：－１２１、ＨＢＧΔ－１１４：－１２４、ＨＢＧΔ－１１６、ＨＢＧ－１１４＋Ｔ、ＨＢＧ－１１６＋Ｇ、ＨＢＧΔ－１１２：－１１５、ＨＢＧΔ－１１３：－１１５、ＨＢＧΔ－１１４：－１１５、ＨＢＧΔ－１１５、ＨＢＧΔ－１０２：－１１４（自然発生の１３ｎｔ欠失）をはじめとする様々なインデルが同定された。
【図１７Ａ】図１７は、ｇＲＮＡ ＯＬＩ７０６６（配列番号９７０）（表１０）に複合体化したＣａｓ９（「ＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ」）で電気穿孔された、単一ＨＳＰＣの赤血球子孫におけるＵＰＬＣ解析によって測定された、ＨＢＧ１又はＨＢＧ２で保有される相対インデルと比較した、［γ鎖］／［全γ鎖＋β鎖］によって判定されるＧγ-グロビン、Ａγ-グロビン鎖（又は４．９ｋｂの欠失から得られたＡＧγ-グロビン）の発現レベルを示す。図１７Ａは、対応するＨＢＧ１対立遺伝子（ＨＢＧ１Δ－１１５、ＨＢＧ１Δ－１１４：－１１５、ＨＢＧ１Δ－１１３：－１１５、ＨＢＧ１Δ－１１２：－１１５、ＨＢＧ１Δ－１０２：－１１４、ＨＢＧ１Δ－１０４：－１２１、ＨＢＧ１Δ－１１６）上に示されたインデルを担持するクローンについて、［Ａγ Ｔ-グロビン鎖］／［全γ鎖＋β鎖］によって判定されたＡγＴ-グロビン鎖の発現を示す。

【図１７Ｂ】図１７は、ｇＲＮＡ　ＯＬＩ７０６６（配列番号９７０）（表１０）に複合体化したＣａｓ９（「ＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ」）で電気穿孔された、単一ＨＳＰＣの赤血球子孫におけるＵＰＬＣ解析によって測定された、ＨＢＧ１又はＨＢＧ２で保有される相対インデルと比較した、［γ鎖］／［全γ鎖＋β鎖］によって判定されるＧγ-グロビン、Ａγ-グロビン鎖（又は４．９ｋｂの欠失から得られたＡＧγ-グロビン）の発現レベルを示す。図１７Ｂは、ＨＢＧ２対立遺伝子（ＨＢＧ２Δ－１１５、ＨＢＧ２Δ－１１４：－１１５、ＨＢＧ２Δ－１１３：－１１５、ＨＢＧ２Δ－１１２：－１１５、ＨＢＧ２Δ－１０２：－１１４、ＨＢＧ２Δ－１０４：－１２１、ＨＢＧ２Δ－１１６）上に示されたインデルを担持するクローンについて、［Ｇγ－γ鎖］／［全γ鎖＋β鎖］によって判定されたＧγ-グロビン鎖発現を示す。Ｇγ-グロビン誘導の分析が単一編集対立遺伝子の結果であることを確実にするために、ＨＢＧ２の単一対立遺伝子編集を有するクローン又はＨＢＧ２対立遺伝子の１つを欠失したクローン（４．９ｋｂの欠失から得られた）のみが分析された。

【図１７Ｃ】図１７は、ｇＲＮＡ　ＯＬＩ７０６６（配列番号９７０）（表１０）に複合体化したＣａｓ９（「ＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ」）で電気穿孔された、単一ＨＳＰＣの赤血球子孫におけるＵＰＬＣ解析によって測定された、ＨＢＧ１又はＨＢＧ２で保有される相対インデルと比較した、［γ鎖］／［全γ鎖＋β鎖］によって判定されるＧγ-グロビン、Ａγ-グロビン鎖（又は４．９ｋｂの欠失から得られたＡＧγ-グロビン）の発現レベルを示す。図１７Ｃは、対応するＨＢＧ１／２対立遺伝子（ＨＢＧ１／２Δ－１１５、ＨＢＧ１／２Δ－１１４：－１１５、ＨＢＧ１／２Δ－１１３：－１１５、ＨＢＧ１／２Δ－１１２：－１１５、ＨＢＧ１／２Δ－１０２：－１１４、ＨＢＧ１／２Δ－１０４：－１２１、ＨＢＧ１／２Δ－１１６）上に示されたインデルを担持するクローンについて、［ＡＧγＴ－γ鎖］／［全γ鎖＋β鎖］によって判定されたＡＧγＴ-グロビン鎖発現を示す。

【図１７Ｄ】図１７は、ｇＲＮＡ　ＯＬＩ７０６６（配列番号９７０）（表１０）に複合体化したＣａｓ９（「ＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ」）で電気穿孔された、単一ＨＳＰＣの赤血球子孫におけるＵＰＬＣ解析によって測定された、ＨＢＧ１又はＨＢＧ２で保有される相対インデルと比較した、［γ鎖］／［全γ鎖＋β鎖］によって判定されるＧγ-グロビン、Ａγ-グロビン鎖（又は４．９ｋｂの欠失から得られたＡＧγ-グロビン）の発現レベルを示す。図１７Ｄは、対応するＨＢＧ１／２対立遺伝子（ＨＢＧ１／２Δ－１１５、ＨＢＧ１／２Δ－１１４：－１１５、ＨＢＧ１／２Δ－１１３：－１１５、ＨＢＧ１／２Δ－１１２：－１１５、ＨＢＧ１／２Δ－１０２：－１１４、ＨＢＧ１／２Δ－１０４：－１２１、ＨＢＧ１／２Δ－１１６）上に示されたインデルを担持するクローンについて、［ＡＧγＩ－γ鎖］／［全γ鎖＋β鎖］によって判定されたＡＧγＩ-グロビン鎖発現を示す。

【図１８】ヒト染色体１１上のβ-グロビン遺伝子クラスターに関連してＨＢＧ１及びＨＢＧ２遺伝子を概略的に示す。概略図は、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２のＣＣＡＡＴボックス標的部位を示す。この領域内の相同性のため、ＲＮＡヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）に複合体化したＯＬＩ８３９４（配列番号９７１）などの単一ガイドＲＮＡは、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２の両方で切断される。ＯＬＩ８３９４に複合体化したＣａｓ９（「ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ」）の送達に続く編集結果は、様々であり、異なる大きさの欠失又は挿入をもたらす。一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）は、ＣＣＡＡＴボックスで所望のインデルシグネチャをコピーする鋳型を提供するように設計される（表１１）。ｓｓＯＤＮは、存在しない配列に隣接する配列相同性アームでそれぞれの欠失を「コード化し」、完全欠失を生成する。

【図１９Ａ】図１９は、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ及び２．５μＭの様々なｓｓＯＤＮ（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ（「ｍＰＢ　ＣＤ３４＋細胞」）からの、成人ＣＤ３４＋細胞のＨＢＧのＣＣＡＡＴボックス標的領域の遺伝子編集からの結果を示す。図１９Ａは、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４１３（「－１１ｎｔ＋鎖」）又はｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４１１（「－１１ｎｔ－鎖」）

による電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物の配列決定によって検出されたインデルの百分率を示す。
【図１９Ｂ】図１９は、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ及び２．５μＭの様々なｓｓＯＤＮ（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ（「ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞」）からの、成人ＣＤ３４＋細胞のＨＢＧのＣＣＡＡＴボックス標的領域の遺伝子編集からの結果を示す。図１９Ｂは、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１３（「－１１ｎｔ＋鎖」）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１１（「－１１ｎｔ－鎖」）による電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物を配列決定することによって検出された、全インデルに対する正確な「－１１ｎｔ欠失」の百分率を示す。
【図１９Ｃ】図１９は、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ及び２．５μＭの様々なｓｓＯＤＮ（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ（「ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞」）からの、成人ＣＤ３４＋細胞のＨＢＧのＣＣＡＡＴボックス標的領域の遺伝子編集からの結果を示す。図１９Ｃは、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３０（「－４ｎｔ＋鎖」）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）による電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物の配列決定によって検出されたインデルの百分率を示す。正確な－４ｎｔ欠失（すなわちΔ－１１２：－１１５）の百分率は、他のインデルと区別される。
【図１９Ｄ】図１９は、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ及び２．５μＭの様々なｓｓＯＤＮ（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ（「ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞」）からの、成人ＣＤ３４＋細胞のＨＢＧのＣＣＡＡＴボックス標的領域の遺伝子編集からの結果を示す。図１９Ｄは、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１８（「－１ｎｔ＋鎖」）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１７（「－１ｎｔ－鎖」）による電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物の配列決定によって検出されたインデルの百分率を示す。正確な－１ｎｔ欠失（すなわちΔ－１１６）の百分率は、他のインデルと区別される。
【図１９Ｅ】図１９は、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ及び２．５μＭの様々なｓｓＯＤＮ（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ（「ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞」）からの、成人ＣＤ３４＋細胞のＨＢＧのＣＣＡＡＴボックス標的領域の遺伝子編集からの結果を示す。図１９Ｅは、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４０９（「－１８ｎｔ＋鎖」）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１０（「－１８ｎｔ－鎖」）による電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物の配列決定によって検出されたインデルの百分率を示す。正確な－１８ｎｔ欠失（すなわちΔ－１０４：－１２１）の百分率は、他のインデルと区別される。
【図１９Ｆ】図１９は、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ及び２．５μＭの様々なｓｓＯＤＮ（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ（「ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞」）からの、成人ＣＤ３４＋細胞のＨＢＧのＣＣＡＡＴボックス標的領域の遺伝子編集からの結果を示す。図１９Ｆは、ＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１４（「－１３ｎｔ＋鎖」）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１２（「－１３ｎｔ－鎖」）による電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物の配列決定によって検出されたインデルの百分率を示す。正確な－１３ｎｔ欠失（すなわちΔ－１０２：－１１４）の百分率は、他のインデルと区別される。
【図１９Ｇ】図１９は、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ及び２．５μＭの様々なｓｓＯＤＮ（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ（「ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞」）からの、成人ＣＤ３４＋細胞のＨＢＧのＣＣＡＡＴボックス標的領域の遺伝子編集からの結果を示す。図１９Ｇは、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１６（「－１１７Ｇ＞Ａ＋鎖」）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１５（「－１１７Ｇ＞Ａ－鎖」）による電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物の配列決定によって検出されたインデルの百分率を示す。インデルの有無にかかわらず、－１１７Ｇ＞Ａ置換を有する読み取りの百分率は、他の読み取りと区別される。
【図２０Ａ】図２０は、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ及び様々な

ｓｓＯＤＮ（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の赤血球子孫上のＵＰＬＣ解析によって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖の発現レベルを示す。図２０Ａは、（ｉ）ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ単独、（ｉｉ）ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３０（「－４ｎｔ＋鎖」）、ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）、ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１３（「－１１ｎｔ＋鎖」）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１１（「－１１ｎｔ－鎖」）、及び（ｉｉｉ）ＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１４（「－１３ｎｔ＋鎖」）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１２（「－１３ｎｔ－鎖」）による電気穿孔後にＵＰＬＣによって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖の百分率を示す。

【図２０Ｂ】図２０は、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ及び様々なｓｓＯＤＮ（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の赤血球子孫上のＵＰＬＣ解析によって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖の発現レベルを示す。図２０Ｂは、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１８（「－１ｎｔ＋鎖」）、ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１７（「－１ｎｔ－鎖」）、ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１６（「－１１７Ｇ＞Ａ＋鎖」）、ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１５（「－１１７Ｇ＞Ａ－鎖」）、ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４０９（「－１８ｎｔ＋鎖」）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４１０（「－１８ｎｔ－鎖」）による電気穿孔後にＵＰＬＣによって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖の百分率を示す。

【図２１Ａ】図２１は、０．６２５μＭ～１０μＭの範囲の用量において、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞からの遺伝子編集からの結果を示す。図２１Ａは、電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物を配列決定することで検出されたインデルの百分率を示す。

【図２１Ｂ】図２１は、０．６２５μＭ～１０μＭの範囲の用量において、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞からの遺伝子編集からの結果を示す。図２１Ｂは、電気穿孔後にＨＢＧ１とＨＢＧ２との間のｄｄＰＣＲによって検出された４．９ｋｂ欠失の頻度を示す。

【図２１Ｃ】図２１は、０．６２５μＭ～１０μＭの範囲の用量において、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞からの遺伝子編集からの結果を示す。図２１Ｃは、電気穿孔の４８時間後における、ｍＰＢからの成人ＣＤ３４＋細胞の生存百分率を示す。

【図２１Ｄ】図２１は、０．６２５μＭ～１０μＭの範囲の用量において、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞からの遺伝子編集からの結果を示す。図２１Ｄは、電気穿孔された細胞の赤血球子孫の細胞溶解産物のＵＰＬＣ解析によって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖の百分率を示す。

【図２２Ａ】図２２は、示された用量のＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及び示された用量のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞遺伝子編集からの結果を示す。図２２Ａは、示された用量（２、４又は８μＭ）のＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及び示された用量（０、１．２５、２．５又は５μＭ）のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）による電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物を配列決定することで検出されたインデルの百分率を示す。

【図２２Ｂ】図２２は、示された用量のＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及び示された用量のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞遺伝子編集からの結果を示す。図２２Ｂは、示された用量（２、４又は８μＭ）のＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及び示された用量（０、１．２５、２．５又は５μＭ）のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）による電気穿孔後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物

の次世代配列決定法（ＮＧＳ）によって検出された－４ｎｔ欠失（「－１１２：－１１５欠失」）の百分率を示す。
【図２２Ｃ】図２２は、示された用量のＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及び示された用量のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞遺伝子編集からの結果を示す。図２２Ｃは、示された用量（２、４又は８μＭ）のＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及び示された用量（０、１．２５、２．５又は５μＭ）のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）による電気穿孔後におけるＨＢＧ１とＨＢＧ２との間の４．９ｋｂ欠失の頻度を示す。欠失は、ｄｄＰＣＲを介して測定された。
【図２２Ｄ】図２２は、示された用量のＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及び示された用量のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）（表１１）で電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞遺伝子編集からの結果を示す。図２２Ｄは、示された用量（２、４又は８μＭ）のＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及び示された用量（０、１．２５、２．５又は５μＭ）のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）による電気穿孔後、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の赤血球子孫からの細胞溶解産物のＵＰＬＣ解析によって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖の百分率を示す。
【図２３Ａ】図２３は、対称的及び非対称的相同性アームを有するｓｓＯＤＮ鋳型の概略図及びそれによって提供される結果を示す。図２３Ａは、ＯＬＩ８３９４（配列番号９７１）及びＯＬＩ７０６６（配列番号９７０）によって標的化される、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２におけるＣＣＡＡＴボックス標的部位を示す。対称的又は非対称的アームを有するｓｓＯＤＮは、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２の－４ｎｔ欠失（ＨＢＧ－１１２：－１１５）（表１１）をコピーする鋳型を提供するように設計される。ｓｓＯＤＮは、存在しない配列に隣接する配列相同性アームによってそれぞれの欠失を「コード化し」、ＨＢＧ－１１２：－１１５に完全欠失を生成する。
【図２３Ｂ】図２３は、対称的及び非対称的相同性アームを有するｓｓＯＤＮ鋳型の概略図及びそれによって提供される結果を示す。図２３Ｂは、４ｎｔ欠失を「コード化する」、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ及び２．５μＭの様々なｓｓＯＤＮ、ＯＬＩ１６４２４（「９０／９０」）、ＯＬＩ１６４１９（「４０／８０」）又はＯＬＩ１６４２１（「５０／５０」）（ＨＢＧ－１１２：－１１５）（表１１）によるｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物の配列決定によって検出されるインデルの百分率を示す。
【図２４】Ｓｐ３７及びＳｐＡ ｇＲＮＡ（表１２）に複合体化したＤ１０Ａ Ｃａｓ９（「ｓｐ３７－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ＋ｓｐＡ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ」）単独での又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４（「－４ｎｔ－鎖」）（表１１）との組み合わせによるｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物の配列決定によって検出されたインデルの百分率を示す。正確な－４ｎｔ欠失（すなわちΔ－１１２：－１１５）の百分率は、他のインデルと区別される。
【図２５】アシダミノコッカス属（Acidaminococcus）種Ｃｐｆ１（「ＡｓＣｐｆ１」）の変異型、すなわちガイドＲＮＡ ＨＢＧ１－１（ＯＬＩ１３６２０）（表１３）に複合体化したＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｎＮＬＳ（配列番号１０００）及びＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ（配列番号１００１）（「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｎＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ」及び「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ」）で電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞のＨＢＧの遺伝子編集を示す。ＲＮＰは、５μＭ又は２０μＭで電気穿孔された。
【図２６Ａ】図２６は、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ単独で又は様々なｓｓＯＤＮとの組み合わせで電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞のＨＢＧの遺伝子編集を示す。図２６Ａは、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ単独での又はＯＬＩ１６４３２４（「－４ｎｔ－鎖」）、ＯＬＩ１６４３０（「－４ｎｔ＋鎖」）、ＯＬＩ１６４１０（「－１８ｎｔ－鎖」）若しくはＯＬＩ１６４０９（「－１８ｎｔ＋鎖」）との組み合わせによる電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物の配列決定によって検出されたインデルの百分率を示す。

【図２６Ｂ】図２６は、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ単独で又は様々なｓｓＯＤＮとの組み合わせで電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞のＨＢＧの遺伝子編集を示す。図２６Ｂは、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ単独での又はＯＬＩ１６４１０（「－１８ｎｔ－鎖」）又はＯＬＩ１６４０９（「－１８ｎｔ＋鎖」）との組み合わせによる電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物を配列決定することで検出された正確な１８ヌクレオチド欠失インデルの百分率を示す。

【図２６Ｃ】図２６は、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ単独で又は様々なｓｓＯＤＮとの組み合わせで電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞のＨＢＧの遺伝子編集を示す。図２６Ｃは、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ単独での又はＯＬＩ１６４１０（「－１８ｎｔ－鎖」）又はＯＬＩ１６４０９（「－１８ｎｔ＋鎖」）との組み合わせによる電気穿孔の７２時間後、ＨＢＧ ＰＣＲ産物を配列決定することで検出された全てのインデル内の正確な１８ｎｔ欠失の百分率を示す。

【図２７】組み合わせて使用される、ＨＢＧ１－１標的領域とＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９ ｇＲＮＡとの対の概略図を示す。図２７Ａは、ＨＢＧ１－１ ｇＲＮＡ（表１５の配列番号１００２に記載されるＲＮＡ標的化ドメインを含む）の標的領域を示す。ＨＢＧプロモーターの遠位ＣＣＡＡＴボックス（すなわちＨＢＧ１／２ ｃ．－１１１～－１１５）は、灰色のボックスで示される。図２７Ｂは、ＨＢＧ１－１の標的領域、ＨＢＧの遠位ＣＣＡＡＴボックス及び標的領域ＳｐＡ ｇＲＮＡ（表１５の配列番号９４１標的化ドメインを含む）を示す。図２７Ｃは、ＨＢＧ１－１の標的領域、ＨＢＧの遠位ＣＣＡＡＴボックス及び標的領域ＳｐＧ ｇＲＮＡ（表１５の配列番号３５９標的化ドメインを含む）を示す。図２７Ｄは、ＨＢＧ１－１の標的領域、ＨＢＧの遠位ＣＣＡＡＴボックス、ｔＳｐＡ死滅ｇＲＮＡの標的領域（「ｄｇＲＮＡ」）（表１５の配列番号３２６の標的化ドメインを含む）及びＳｐ１８２ ｄｇＲＮＡの標的領域（表１５の配列番号１０２８の標的化ドメインを含む）を示す。図２７Ｅは、ＨＢＧ１－１の標的領域、ＨＢＧの遠位ＣＣＡＡＴボックス及びｔＳｐＡ ｄｇＲＮＡ（表１５の配列番号３２６の標的化ドメインを含む）を示す。図２７Ｆは、ＨＢＧ１－１の標的領域、ＨＢＧの遠位ＣＣＡＡＴボックス及び標的領域Ｓｐ１８２ ｄｇＲＮＡ（表１５の配列番号１０２８標的化ドメインを含む）を示す。

【図２８Ａ】図２８は、ＨＢＧプロモーター領域を標的化するＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１－ＲＮＰを使用した、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の生体外編集によって達成されるＨｂＦ発現を示す。図２８Ａは、Amaxa電気穿孔を介した、５μＭ又は２０μＭのＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１－ＲＮＰ（「ＨＢＧ－１－１」）の送達に続く、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞内のＨＢＧプロモーター領域における編集の結果を示す。Amaxa電気穿孔を介した２０μＭのＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１－ＲＮＰの送達は、最大で約４３％の編集と、２１％のＨｂＦ誘導（バックグラウンドレベルを上回る）とをもたらす。ＨｂＦレベルは、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の赤血球子孫上でＵＰＬＣ解析によって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖発現レベルを示す黒丸で表わされる。灰色バーは、ＨＢＧ ＰＣＲ産物の次世代配列決定法（ＮＧＳ）によって検出された、電気穿孔の７２時間後におけるインデルの百分率を示す。

【図２８Ｂ】図２８は、ＨＢＧプロモーター領域を標的化するＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１－ＲＮＰを使用した、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の生体外編集によって達成されるＨｂＦ発現を示す。図２８Ｂは、MaxCyte電気穿孔を介した、５μＭ又は２０μＭのＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１－ＲＮＰ（「ＨＢＧ－１－１」）の送達に続く、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞内のＨＢＧプロモーター領域における編集の結果を示す。MaxCyte電気穿孔を介した２０μＭのＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１－ＲＮＰの送達は、最大で約１６％の編集と、７％のＨｂＦ誘導（バックグラウンドレベルを上回る）とをもたらす。ＨｂＦレベルは、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の赤血球子孫上でＵＰＬＣ解析によって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖発現レベルを示す黒丸で表わされる。灰色バ

ーは、ＨＢＧ ＰＣＲ産物のＮＧＳによって検出された、電気穿孔の７２時間後におけるインデルの百分率を示す。
【図２９】様々なＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９ ＷＴ又はＣａｓ９ Ｄ１０Ａ ＲＮＰを同時送達することによる、MaxCyte装置上のＨＢＧプロモーター領域における、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰによる強化された編集を示す。「Ｓ．Ｐｙ Ｄ１０Ａ」は、Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａニッカーゼタンパク質を表し、「Ｓ．Ｐｙ ＷＴ」は、Ｃａｓ９ＷＴタンパク質を表す。試験されたＲＮＰには、ＳｐＡ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ、ＳｐＧ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ、ｔＳｐＡ－Ｃａｓ９－ＲＮＰ、Ｓｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰ及びｔＳｐＡ－Ｃａｓ９－ＲＮＰ＋Ｓｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰ（表１４）が含まれる。ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ（「ＨＢＧ１－１」）単独での又はＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９ ＲＮＰ又はＲＮＰ対と組み合わせた送達に続く、ＨＢＧプロモーター領域における全編集（灰色バー）及び関連するＨｂＦタンパク質誘導（黒丸）が示される。ＨｂＦレベルは、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の赤血球子孫上でＵＰＬＣ解析によって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖発現レベルを示す黒丸で表わされる。灰色バーは、ＨＢＧ ＰＣＲ産物のＮＧＳによって検出されたインデルの百分率を示す。
【図３０】ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ（「ＨＢＧ１－１」）単独での又は様々なＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９ ＷＴ又はＣａｓ９ Ｄ１０Ａ ＲＮＰと組み合わせたMaxCyte送達に続くｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の生存率を示す。「Ｓ．ＰｙＤ１０Ａ」は、Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａニッカーゼタンパク質を表し、「Ｓ．Ｐｙ ＷＴ」は、Ｃａｓ９ＷＴタンパク質を表す。試験されたＲＮＰには、ＳｐＡ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ、ＳｐＧ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ、ｔＳｐＡ－Ｃａｓ９－ＲＮＰ、Ｓｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰ及びｔＳｐＡ－Ｃａｓ９－ＲＮＰ＋Ｓｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰ（表１４）が含まれる。電気穿孔の２４時間後、ＤＡＰＩ染色及びフローサイトメトリー解析によって生存率を測定した。
【図３１Ａ】図３１は、標的領域におけるＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ及びＤ１０Ａ－Ｃａｓ９ ＲＮＰの切断部位並びにＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰとＤ１０Ａ ＲＮＰとの同時送達から得られる編集プロファイルを示す。図３１Ａは、標的領域の各鎖上のＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ切断部位の位置（薄い灰色の矢印）並びにＳｐＧ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ及びＳｐＡ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ（表１４）によって標的化されるニッキング部位（濃い矢印）の位置を示す。
【図３１Ｂ】図３１は、標的領域におけるＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ及びＤ１０Ａ－Ｃａｓ９ ＲＮＰの切断部位並びにＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰとＤ１０Ａ ＲＮＰとの同時送達から得られる編集プロファイルを示す。図３１Ｂは、ｍＰＢ ＣＤ３４＋の電気穿孔の７２時間後における、ＨＢＧ ＰＣＲ産物のＮＧＳ分析によって検出される、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ（「ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ」）とＳｐＧ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ（「ｓｐＧ ＲＮＰ」）又はＳｐＡ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ（「ｓｐＡ ＲＮＰ」）との同時送達から得られる編集プロファイルを示す（表１４）。Ｘ軸は、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰプラス鎖切断部位に対するインデルの中心のゲノム位置を表す。Ｙ軸は、インデルの長さを表わし、欠失は、負の値として表わされ、挿入は、正の値として表わされる。各インデルの全頻度は、シンボルの面積によって表わされる。０．１％以上の頻度で生じるインデルが示される。ＳｐＧ及びＳｐＡ標的部位は、破線によって示される。
【図３２Ａ】図３２は、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰとＳｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰとの同時送達が、電気穿孔の７２時間後におけるＨＢＧ ＰＣＲ産物のＮＧＳ分析によって検出されるように、インデルプロファイルの実質的な改変なしに全インデル及び遠位のＣＣＡＡＴボックス妨害インデルの増加をもたらすことを示す。図３２Ａは、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ（「ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ」）単独での又はＳｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰ（「ｓｐ１８２ ＲＮＰ」）との組み合わせによる編集に続くインデルプロファイルを示す。Ｘ軸は、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ

－ＲＮＰプラス鎖切断部位に対するインデルの中心のゲノム位置を表す。Ｙ軸は、インデルの長さを表わし、欠失は、負の値として表わされ、挿入は、正の値として表わされる。各インデルの全頻度は、シンボルの面積によって表わされる。０．１％以上の頻度で生じるインデルが示される。Ｓｐ１８２標的部位は、点線で示される。

【図３２Ｂ】図３２は、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰとＳｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰとの同時送達が、電気穿孔の７２時間後におけるＨＢＧ ＰＣＲ産物のＮＧＳ分析によって検出されるように、インデルプロファイルの実質的な改変なしに全インデル及び遠位のＣＣＡＡＴボックス妨害インデルの増加をもたらすことを示す。図３２Ｂは、遠位ＣＣＡＡＴボックス配列の０ｎｔ、１ｎｔ、２ｎｔ、３ｎｔ、４ｎｔ又は５ｎｔ全体のいずれかを妨害するインデルの頻度を示す。

【図３３】Ｓｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰと同時送達されたＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰの最適用量が全編集及びＨｂＦ産生の増加をもたらすことを示す（表１４）。ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ（「ＨＢＧ１－１」）をＳｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰ（「Ｓｐ１８２」）と一緒にＲＮＰ対として送達することにより、最大３４％のＨｂＦ誘導（バックグラウンドを上回る）（黒丸）を有するＨＢＧプロモーター領域における９２％を超える編集（灰色のバー）が達成された。１２μＭでＳｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰを単独で送達した場合、編集は、観察されなかった。ＨｂＦレベルは、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の赤血球子孫上でＵＰＬＣ解析によって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖発現レベルを示す黒丸で表わされる。灰色バーは、ＨＢＧ ＰＣＲ産物のＮＧＳによって検出されたインデルの百分率を示す。

【図３４】Ｓｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰと組み合わされたＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ（表１４）でＨＢＧプロモーター領域において編集された単一ヒトｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞のクローン性赤血球子孫中でＵＰＬＣによって測定された、全β様鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ鎖発現の分布レベルを示す。各黒丸は、電気穿孔の４８時間後にＦＡＣＳ選別によって単離された単一細胞に由来するクローン性赤血球集団で検出されたγ-グロビンタンパク質レベルを表す。

【図３５Ａ】図３５は、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ Ｈ８００Ａ（表１４の配列番号１０３２）に複合体化した修飾ＨＢＧ１－１ ｇＲＮＡ（表１４の配列番号１０４１）（「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１ＲＮＰ」、図３５Ａ～Ｃで「ＨＢＧ１－１」として表わされる）を含有するＲＮＰと、増加する濃度のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）（図３５Ａ～Ｃで「ＯＬＩ１６４３１」として表わされる）（表１１）との同時送達後における全編集、ＨｂＦ生産量、生存率及びコロニー形成能力を示す。図３５Ａは、６μＭのＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰと、増加する濃度のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１との同時送達後における遠位ＣＡＡＴＴボックス（灰色バー）編集及びＨｂＦ誘導（黒丸）を示す。ＨｂＦレベルは、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の赤血球子孫上でＵＰＬＣ解析によって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖発現レベルを示す黒丸で表わされる。灰色バーは、ＨＢＧ ＰＣＲ産物のＮＧＳによって検出されたインデルの百分率を示す。

【図３５Ｂ】図３５は、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ Ｈ８００Ａ（表１４の配列番号１０３２）に複合体化した修飾ＨＢＧ１－１ ｇＲＮＡ（表１４の配列番号１０４１）（「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１ＲＮＰ」、図３５Ａ～Ｃで「ＨＢＧ１－１」として表わされる）を含有するＲＮＰと、増加する濃度のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）（図３５Ａ～Ｃで「ＯＬＩ１６４３１」として表わされる）（表１１）との同時送達後における全編集、ＨｂＦ生産量、生存率及びコロニー形成能力を示す。図３５Ｂは、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ単独での又は増加する用量のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１と組み合わせての送達に続くｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の生存率を示す。生存率は、電気穿孔の７２時間後におけるＤＡＰＩ除外によって測定された。

【図３５Ｃ】図３５は、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ（表１４の配列番号１０３２）に複合体化した修飾ＨＢＧ１－１　ｇＲＮＡ（表１４の配列番号１０４１）（「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１ＲＮＰ」、図３５Ａ～Ｃで「ＨＢＧ１－１」として表わされる）を含有するＲＮＰと、増加する濃度のｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）（図３５Ａ～Ｃで「ＯＬＩ１６４３１」として表わされる）（表１１）との同時送達後における全編集、ＨｂＦ生産量、生存率及びコロニー形成能力を示す。図３５Ｃは、コロニー形成細胞（ＣＦＣ）アッセイにおける「ＨＢＧ１－１」ＲＮＰ及びｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４３１処理細胞並びにドナー適合未処理対照ＣＤ３４$^{+}$細胞の造血活性を示す。ＣＦＣは、播種された８００個のＣＤ３４$^{+}$細胞当たりの数値を示す。コロニーの数及びサブタイプが表示される（ＧＥＭＭ：顆粒球－赤血球－単球－マクロファージコロニー（黒色）、ＧＭ：顆粒球マクロファージコロニー（濃い灰色）、Ｅ：赤血球コロニー（薄い灰色））。

【図３６Ａ】様々な濃度のｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）（図３６Ａで「ＯＬＩ１６４３１」として表わされる）（表１１）と共に同時送達された、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ（表１４の配列番号１０３２）に複合体化した未修飾ＨＢＧ１－１　ｇＲＮＡ（表１４の配列番号１０２２）（「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１　ＲＮＰ」、図３６Ａで「ＨＢＧ１－１」として表わされる）を含有する異なる濃度のＲＮＰを使用した全編集、ＨｂＦ生産量及び生存率結果を示す。図３６Ａは、様々な濃度のＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１　ＲＮＰ（「ＨＢＧ１－１」）とｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４３１との同時送達後における、遠位ＣＡＡＴＴボックスにおける編集（黒色バー（４８時間）及び淡い灰色バー（赤血球培養１４日目））及びＨｂＦ誘導（黒丸）を示す。ＨｂＦレベルは、ｍＰＢ　ＣＤ３４＋細胞の赤血球子孫上でＵＰＬＣ解析によって測定された、全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖発現レベルを示す黒丸で表わされる。バーは、赤血球培養４８時間（黒色）及び１４日目（軽量灰色）の時点における、ＨＢＧ　ＰＣＲ産物のＮＧＳによって検出されたインデルの百分率を示す。

【図３６Ｂ】様々な濃度のｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）（図３６Ｂで「ＯＬＩ１６４３１」として表わされる）（表１１）と共に同時送達された、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ（表１４の配列番号１０３２）に複合体化した未修飾ＨＢＧ１－１　ｇＲＮＡ（表１４の配列番号１０２２）（「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１　ＲＮＰ」、図３６Ｂで「ＨＢＧ１－１」として表わされる）を含有する異なる濃度のＲＮＰを使用した全編集、ＨｂＦ生産量及び生存率結果を示す。図３６Ｂは、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１　ＲＮＰ単独（「ＨＢＧ１－１」）、ｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４３１単独での又は様々な用量のＨＢＧ１－１及びＯＬＩ１６４３１との組み合わせの送達に続くｍＰＢ　ＣＤ３４＋細胞の生存率を示す。生存率は、電気穿孔の４８時間後及び赤血球培養の１４日後、ＤＡＰＩ除外によって測定された。ｍＰＢ　ＣＤ３４＋細胞の編集に続いて、赤血球系統への生体外分化が１８日間にわたり実施された（Giarratana 2011）。培養１４日目に細胞のサブセットを単離して、生存率（ＤＡＰＩ除外）及び編集（ＨＢ　ＧＰＣＲ産物のＮＧＳ）の測定を行った。

【図３７】ｍＰＢ　ＣＤ３４＋細胞におけるＲＮＰによる編集を示す。表２１に記載されるとおり、ＲＮＰは、Ｃｐｆ１タンパク質に複合体化したｇＲＮＡを含んだ。電気穿孔の７２時間後、単離されたゲノムＤＮＡに対してIllumina配列決定を実施した。

【図３８Ａ】図３８は、電気穿孔の４８時間後にIllumina配列決定によって判定されたＣＤ３４＋細胞集団（黒色バー）、前駆細胞（淡い灰色バー）及びＨＳＣ（濃い灰色バー）のバルク編集を示す。図３８Ａは、単独で送達されたか又はｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）と共に同時送達されたＲＮＰ３３（表２１）を示す。

【図３８Ｂ】図３８は、電気穿孔の４８時間後にIllumina配列決定によって判定されたＣＤ３４＋細胞集団（黒色バー）、前駆細胞（淡い灰色バー）及びＨＳＣ（濃い灰色バー）

のバルク編集を示す。図３８Ｂは、単独で送達されたか又はＳｐ１８２ ＲＮＰ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９（配列番号１０３３）に複合体化した配列番号１０２７（表１４）を含む死滅ｇＲＮＡ）と共に同時送達されたＲＮＰ３３（表２１）を示す。
【図３９】電気穿孔の４８時間後にIllumina配列決定によって判定されたＣＤ３４＋細胞集団（黒色バー）、前駆細胞（淡い灰色バー）及びＨＳＣ（濃い灰色バー）のバルク編集を示す。ＲＮＰ３４、ＲＮＰ３３及びＲＮＰ４３（表２１）は、単独で又はＳｐ１８２ ＲＮＰ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９（配列番号１０３３）に複合体化した配列番号１０２７（表１４）を含む死滅ｇＲＮＡ）若しくはｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）との組み合わせで送達された。
【図４０】電気穿孔の７２時間後にIllumina配列決定によって判定されたＣＤ３４＋細胞の編集を示す。ＲＮＰ６４、ＲＮＰ６３及びＲＮＰ４５（表２１）は、ｇＲＮＡがモル過剰である２又は４のいずれかの化学量論比（ｇＲＮＡ：Ｃｐｆ１の複合体形成比）で送達された。
【図４１】電気穿孔の７２時間後にIllumina配列決定によって判定されたＣＤ３４＋細胞の編集を示す。ＲＮＰ３３、ＲＮＰ６４、ＲＮＰ６３及びＲＮＰ４５（表２１）は、単独で又はＳｐ４５ ＲＮＰ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９（配列番号１０３３）に複合体化した配列番号１０２７（表１４）を含む死滅ｇＲＮＡ）若しくはｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）との組み合わせで送達された。
【図４２】Illumina配列決定によって判定された、ＣＤ３４＋細胞における編集を示す。様々な５’ＤＮＡ延長を有するｇＲＮＡに複合体化したＣｐｆ１（配列番号１０９４）を含むＲＮＰ（表２１）は、単独で又は８μＭのＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）との組み合わせで送達された。
【図４３】Illumina配列決定によって判定された、ＣＤ３４＋細胞における編集を示す。５’末端が一致するｇＲＮＡを含むＲＮＰ（ＲＮＰ４９対ＲＮＰ５８及びＲＮＰ５９対ＲＮＰ６０、表２１）がＣＤ３４＋細胞に送達され、３’修飾の影響が評価された。いずれの比較においても、３’ＰＳ－ＯＭｅを有するｇＲＮＡは、電気穿孔の２４時間後に未修飾の３’バージョンよりも優れていた。
【図４４Ａ】電気穿孔の２４及び４８時間後にIllumina配列決定によって判定された、ＣＤ３４＋細胞における編集を示す。ＲＮＰ５８（表２１）は、モル濃度比２：１、１：１又は０．５：１のいずれかの化学量論比（ｇＲＮＡ：Ｃｐｆ１の複合体形成比）でＣＤ３４＋細胞に送達された。試験された全ての用量において、ＲＮＰが２：１の比率で複合体化した場合、編集は、最高であった。
【図４４Ｂ】電気穿孔の２４及び４８時間後にIllumina配列決定によって判定された、ＣＤ３４＋細胞における編集を示す。ＲＮＰ５８（表２１）は、モル濃度比２：１、１：１又は０．５：１のいずれかの化学量論比（ｇＲＮＡ：Ｃｐｆ１の複合体形成比）でＣＤ３４＋細胞に送達された。試験された全ての用量において、ＲＮＰが２：１の比率で複合体化した場合、編集は、最高であった。
【図４５Ａ】Illumina配列決定によって判定された、ＣＤ３４＋細胞における編集を示す。図４５Ａは、３’修飾又は延長の影響を評価するために、ＣＤ３４＋細胞に送達される、５’末端が一致するが、３’修飾が異なるｇＲＮＡを含むＲＮＰ（表２１）を示す。
【図４５Ｂ】Illumina配列決定によって判定された、ＣＤ３４＋細胞における編集を示す。図４５Ｂは、３’修飾又は延長の影響を評価するために、ＣＤ３４＋細胞に送達される、５’末端が一致するが、３’修飾が異なるｇＲＮＡを含むＲＮＰ（表２１）を示す。
【図４６Ａ】図４６は、ＨＢＧ遺伝子座内の様々な切断部位を標的化するＲＮＰの送達に続く、ＣＤ３４＋細胞及びそれらの赤血球子孫における編集及び赤血球子孫におけるＨｂＦレベルを示す。図４６Ａは、未修飾５’と３’末端の１ｘＰＳ－Ｏｍｅとを含有するガイドＲＮＡを含むＲＮＰ（表２１）を示す。
【図４６Ｂ】図４６は、ＨＢＧ遺伝子座内の様々な切断部位を標的化するＲＮＰの送達に続く、ＣＤ３４＋細胞及びそれらの赤血球子孫における編集及び赤血球子孫におけるＨｂＦレベルを示す。図４６Ｂは、５’の２ＰＳ＋２０ＤＮＡ延長と３’末端の１ｘＰＳ－Ｏｍ

ｅとを含有するガイドＲＮＡを含むＲＮＰ（表２１）を示す。
【図４６Ｃ】図４６は、ＨＢＧ遺伝子座内の様々な切断部位を標的化するＲＮＰの送達に続く、ＣＤ３４＋細胞及びそれらの赤血球子孫における編集及び赤血球子孫におけるＨｂＦレベルを示す。図４６Ｃは、５’の２５ＤＮＡ延長と３’末端の１ｘＰＳ－Ｏｍｅとを含有するガイドＲＮＡを含むＲＮＰ（表２１）を示す。
【図４７】１μＭ、２μＭ及び４μＭのＲＮＰ５８の送達に続く、ＣＤ３４＋細胞の赤血球子孫における編集及びＨｂＦレベルを示す。
【図４８】ＲＮＰのMaxCyte電気穿孔に続く、ＣＤ３４＋細胞における編集を示す。異なるＣｐｆ１タンパク質（配列番号１０９４、１０９６、１１０７、１１０８）に複合体化したｇＲＮＡ配列番号１０５１を含むＲＮＰ５８、ＲＮＰ２６、ＲＮＰ２７及びＲＮＰ２８（表２１）がＣＤ３４＋細胞に送達された。編集は、電気穿孔の２４及び４８時間後、Illumina配列決定によって判定された。
【図４９】ＲＮＰのMaxCyte電気穿孔に続く、ＣＤ３４＋細胞における編集を示す。様々な５’延長を有するガイドＲＮＡに複合体化したＣｐｆ１タンパク質配列番号１０９４を含むＲＮＰ５８、ＲＮＰ２９、ＲＮＰ３０及びＲＮＰ３１（表２１）がＣＤ３４＋細胞に送達された。編集は、電気穿孔の２４及び４８時間後、Illumina配列決定によって判定された。ＲＮＰ３０は、細胞数が限定されていたため、１μＭでは試験されなかった（ｎｔ）。
【図５０】電気穿孔の４８時間後にIllumina配列決定によって判定されたＣＤ３４＋細胞集団（黒色バー）、前駆細胞（濃い灰色バー）及びＨＳＣ（淡い灰色バー）のバルク編集を示す。ＲＮＰ５８、ＲＮＰ２７及びＲＮＰ２６（表２１）が２μＭ又は４μＭでＣＤ３４＋細胞に送達された。
【図５１】電気穿孔の４８時間後にIllumina配列決定によって判定されたＣＤ３４＋細胞集団（黒色バー）、前駆細胞（濃い灰色バー）及びＨＳＣ（淡い灰色バー）のバルク編集を示す。ＲＮＰ６１、ＲＮＰ６２及びＲＮＰ３４（表２１）（８μＭ）は、ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）（８μＭ）と共にＣＤ３４＋細胞に同時送達された。
【図５２】電気穿孔の４８時間後にIllumina配列決定によって判定されたＣＤ３４＋細胞集団（黒色バー）、前駆細胞（濃い灰色バー）及びＨＳＣ（淡い灰色バー）のバルク編集を示す。ＲＮＰ５８及びＲＮＰ３２（表２１）は、２μＭでＣＤ３４＋細胞に送達された。
【図５３】電気穿孔の４８時間後にIllumina配列決定によって判定されたＣＤ３４＋細胞集団（黒色バー）、前駆細胞（濃い灰色バー）及びＨＳＣ（淡い灰色バー）のバルク編集を示す。ＲＮＰ５８及びＲＮＰ１（表２１）は、２μＭ、４μＭ又は８μＭでＣＤ３４＋細胞に送達された。２μＭのＲＮＰ１で編集された細胞は、選別されず（Ｎ．Ｓ）、したがって、編集データは、利用することができない。
【図５４】電気穿孔された細胞の輸液の８週間後における、「ＮＢＳＧＷ」マウスのＢＭから移植されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞のインデルを示す。ＲＮＰ３４及びＲＮＰ３３（表２１）（８μＭ）は、ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）（６μＭ）と共にＣＤ３４＋細胞に同時送達された。
【図５５Ａ】図５５は、電気穿孔された細胞の輸液の８週間後における、移植されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞のインデル及び「ＮＢＳＧＷ」マウスのキメラＢＭ由来の赤血球細胞によるＨｂＦ発現を示す。ＲＮＰ３３又はＲＮＰ３４（表２１）は、Ｓｐ１８２ ＲＮＰ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９（配列番号１０３３）に複合体化した配列番号１０２７（表１４）を含む死滅ｇＲＮＡ）（１６μＭの全ＲＮＰ）と共にＣＤ３４＋細胞に同時送達された。図５５Ａは、模擬形質移入（ＲＮＰなし）又はＲＮＰ形質移入された細胞における、未分画の骨髄又はＣＤ１５＋、ＣＤ１９＋、ＧｌｙＡ＋及びＬｉｎ－ＣＤ３４＋細胞の流動選別された個々の集団におけるインデル頻度を示す。Ｌｉｎ－ＣＤ３４＋細胞は、模擬形質移入（ＲＮＰなし）又はＲＮＰ形質移入されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞で輸液された、非照射ＮＯＤ、Ｂ６．ＳＣＩＤ Ｉｌ２ｒγ－／－Ｋｉｔ（Ｗ４１／Ｗ４１）（「ＮＢＳＧＷ」）マウスの骨髄（ＢＭ）からのＣＤ３、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０及びＣＤ５６）について陰性であるＣＤ３４＋細胞として定義さ

れる。インデルは、Illumina配列決定により、各細胞集団について判定された。
【図５５Ｂ】図５５は、電気穿孔された細胞の輸液の８週間後における、移植されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞のインデル及び「ＮＢＳＧＷ」マウスのキメラＢＭ由来の赤血球細胞によるＨｂＦ発現を示す。ＲＮＰ３３又はＲＮＰ３４（表２１）は、Ｓｐ１８２ ＲＮＰ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９（配列番号１０３３）に複合体化した配列番号１０２７（表１４）を含む死滅ｇＲＮＡ）（１６μＭの全ＲＮＰ）と共にＣＤ３４＋細胞に同時送達された。図５５Ｂは、全キメラＢＭからの１８日間の赤血球分化培養に続く赤血球細胞溶解産物からのγ／β様（％）として、ＵＰＬＣによって計算されたＨｂＦ発現を示す。
【図５６Ａ】図５６は、電気穿孔された細胞の輸液の８週間後における、移植されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞のインデル及び「ＮＢＳＧＷ」マウスのキメラＢＭ由来の赤血球細胞によるＨｂＦ発現を示す。ＲＮＰ６１又はＲＮＰ６２（表２１）（８μＭ）は、ｓｓＯＤＮＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）（８μＭ）と共にＣＤ３４＋細胞に同時送達された。図５６Ａは、模擬形質移入（ＲＮＰなし）又はＲＮＰ形質移入された細胞における、未分画の骨髄又はＣＤ１５＋、ＣＤ１９＋、ＧｌｙＡ＋及びＬｉｎ－ＣＤ３４＋細胞の流動選別された個々の集団のインデルを示す。Ｌｉｎ－ＣＤ３４＋細胞は、模擬形質移入（ＲＮＰなし）又はＲＮＰ形質移入されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞で輸液された非照射ＮＢＳＧＷマウス骨髄（ＢＭ）からのＣＤ３、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０及びＣＤ５６）について陰性のＣＤ３４＋細胞として定義される。インデルは、Illumina配列決定により、各細胞集団について判定された。
【図５６Ｂ】図５６は、電気穿孔された細胞の輸液の８週間後における、移植されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞のインデル及び「ＮＢＳＧＷ」マウスのキメラＢＭ由来の赤血球細胞によるＨｂＦ発現を示す。ＲＮＰ６１又はＲＮＰ６２（表２１）（８μＭ）は、ｓｓＯＤＮＯＬＩ１６４３１（表１１の配列番号１０４０）（８μＭ）と共にＣＤ３４＋細胞に同時送達された。図５６Ｂは、全キメラＢＭからの１８日間の赤血球分化培養に続く赤血球細胞によるγ／β様（％）として、ＵＰＬＣによって計算されたＨｂＦ発現を示す。
【図５７】模擬形質移入（ＲＮＰなし）ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞又はＲＮＰ１（４又は８μＭ）又はＲＮＰ５８（２、４又は８μＭ）（表２１）で編集されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の輸液の８週間後における骨髄内のヒトキメラ現象を示す。ＢＭにおけるヒトキメラ現象及び系統再構成（ＣＤ４５＋、ＣＤ１４＋、ＣＤ１９＋、グリコフォリンＡ（ＧｌｙＡ、ＣＤ２３５ａ＋）、系統並びにＣＤ３４＋及びマウスＣＤ４５＋マーカー発現）は、フローサイトメトリーによって判定された。
【図５８】模擬形質移入（ＲＮＰなし）ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞又はＲＮＰ１（４又は８μＭ）又はＲＮＰ５８（２、４又は８μＭ）（表２１）で編集されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の輸液の８週間後における未分類のバルク骨髄内のインデルを示す。インデルは、Illumina配列決定によって判定された。
【図５９】模擬形質移入（ＲＮＰなし）又はＲＮＰ形質移入された細胞における、未分画の骨髄又はＣＤ１５＋、ＣＤ１９＋、ＧｌｙＡ＋及びＬｉｎ－ＣＤ３４＋細胞の流動選別された個々の集団におけるインデル頻度を示す。Ｌｉｎ－ＣＤ３４＋細胞は、模擬形質移入（ＲＮＰなし）又はＲＮＰ形質移入されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞で輸液された、非照射ＮＯＤ，Ｂ６．ＳＣＩＤ Ｉｌ２ｒγ－／－Ｋｉｔ（Ｗ４１／Ｗ４１）（「ＮＢＳＧＷ」）マウスの骨髄（ＢＭ）からのＣＤ３、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０及びＣＤ５６について陰性であるＣＤ３４＋細胞として定義される。インデルは、Illumina配列決定により、各細胞集団について判定された。
【図６０】模擬（ＲＮＰなし）ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞又はＲＮＰ５８（２、４又は８μＭ）（表２１）で編集されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の輸液の８週間後に骨髄から単離されたＧｌｙＡ＋画分からのＨｂＦを示す。
【図６１】模擬又は編集されたヒト動員ＣＤ３４＋細胞の輸液の８週間後に採取された、骨髄フラッシュからの細胞のコロニー形成能を示す。コロニーの数及びサブタイプが表示される（ＧＥＭＭ：顆粒球－赤血球－単球－マクロファージコロニー（黒色）、ＧＭ：顆

粒球マクロファージコロニー（濃い灰色）、Ｅ：赤血球コロニー（淡い灰色））。
【図６２－１】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。核内局在性配列は、太字で、6-ヒスチジン配列は、下線付きで示される。例えば、２つ以上のｎＮＬＳ配列又はｎＮＬＳ及びｓＮＬＳ配列の組み合わせ（又は他のＮＬＳ配列）のＮ末端／Ｃ末端位置のいずれかへの付加並びに例えば6-ヒスチジン配列などの精製配列を含む及び含まない配列の付加などのＮＬＳ配列の同一性及びＮ末端／Ｃ末端位置の追加的な順列は、現在開示されている主題の範囲内である。
【図６２－２】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【図６２－３】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【図６２－４】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【図６２－５】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【図６２－６】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【図６２－７】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【図６２－８】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【図６２－９】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【図６２－１０】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【図６２－１１】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【図６２－１２】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【図６２－１３】表２０に記載されるＣｐｆ１タンパク質変異型の配列を示す。（以下、図６２－１の説明に同じ）
【発明を実施するための形態】
【００７３】
<u>定義及び略語</u>
別段の指定がない限り、以下の各用語は、このセクションでそれに関連した意味を有する。
【００７４】
不定冠詞「１つの（ａ）」及び「１つの（ａｎ）」は、関連した名詞の少なくとも１つを指し、「少なくとも１つ」及び「１つ又は複数」という用語と互換的に使用される。例えば、「モジュール」は、少なくとも１つのモジュール又は１つ若しくは複数のモジュールを意味する。
【００７５】
接続詞「又は」及び「及び／又は」は、非排他的選言肢として同義的に使用される。
【００７６】
「ドメイン」は、タンパク質又は核酸のセグメントを表すために使用される。特に断りのない限り、ドメインは、いかなる特定の機能特性も有する必要はない。
【００７７】
「外因的トランス作用因子」という用語は、（ａ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はｇＲＮＡへのペプチド又はヌクレオチドの挿入又は融合などの修飾手段により、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はｇＲＮＡと相互作用し、（ｂ）標的ＤＮＡと相互作用してそのらせん構造を

改変する、ゲノム編集システムの任意のペプチド又はヌクレオチド成分を指す。ペプチド又はヌクレオチド挿入又は融合としては、限定することなく、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はｇＲＮＡと外因的トランス作用因子との間の直接共有結合並びに／又はＭＳ２ループなどのＲＮＡ／タンパク質相互作用ドメイン及びＤＺ、Ｌｉｍ又はＳＨ１、２若しくは３ドメインなどのタンパク質／タンパク質相互作用ドメインの挿入又は融合によって媒介される非共有結合が挙げられ得る。他の特定のＲＮＡ及びアミノ酸相互作用モチーフは、当業者によく知られているであろう。トランス作用因子は、一般に、転写活性化剤を含み得る。

【００７８】

「ブースター要素」という用語は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼに複合体化したｇＲＮＡを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体（「ｇＲＮＡ－ヌクレアーゼ－ＲＮＰ」）と共に同時送達された場合、ブースター要素なしの標的核酸の編集と比較して標的核酸の編集を増加させる要素を指す。特定の実施形態では、同時送達は、順次又は同時であり得る。特定の実施形態では、ブースター要素は、ＷＴ Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｓ９ニッカーゼタンパク質（例えば、Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａタンパク質）又は酵素的に不活性なＣａｓ９（ｅｉＣａｓ９）タンパク質に複合体化した死滅ガイドＲＮＡを含むＲＮＰ複合体であり得る。特定の実施形態では、ブースター要素は、Ｃａｓ９ニッカーゼタンパク質（例えば、Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａタンパク質）又は酵素的に不活性なＣａｓ９（ｅｉＣａｓ９）タンパク質に複合体化したガイドＲＮＡを含むＲＮＰ複合体であり得る。特定の実施形態では、ブースター要素は、一本鎖又は二本鎖ドナー鋳型ＤＮＡであり得る。特定の実施形態では、１つ又は複数のブースター要素がｇＲＮＡ－ヌクレアーゼ－ＲＮＰと共に同時送達されて、標的核酸の編集を増加させ得る。特定の実施形態では、ブースター要素は、Ｃｐｆ１分子に複合体化したｇＲＮＡ（「ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰ」）を含むＲＮＰと共に同時送達されて、標的核酸の編集を増加させ得る。

【００７９】

「生産的インデル」は、ＨｂＦ発現をもたらすインデル（欠失及び／又は挿入）を指す。特定の実施形態では、生産的インデルは、ＨｂＦ発現を誘導し得る。特定の実施形態では、生産的インデルは、ＨｂＦ発現のレベルの増加をもたらし得る。

【００８０】

「インデル」は、核酸配列中の挿入及び／又は欠失である。インデルは、本開示のゲノム編集システムによって形成された二本鎖切断などのＤＮＡ二本鎖切断の修復の産物であり得る。インデルは、最も一般的には、下述したＮＨＥＪ経路などの「誤りがちな」修復経路によって中断が修復された場合に形成される。

【００８１】

「遺伝子変換」とは、内因性相同配列（例えば、遺伝子アレイ内の相同配列）の組み込みによるＤＮＡ配列の改変を指す。「遺伝子修正」とは、外因性一本鎖又は二本鎖ドナー鋳型ＤＮＡなどの外因性相同配列の組み込みによるＤＮＡ配列の改変を指す。遺伝子変換及び遺伝子修正は、下述したものなどのＨＤＲ経路によるＤＮＡ二本鎖切断の修復の産物である。

【００８２】

インデル、遺伝子変換、遺伝子修正及び他のゲノム編集結果は、典型的には配列決定によって（最も一般的には「次世代」又は「合成による配列決定」法により、ただしサンガー配列決定も依然として使用され得る）評価され、全ての配列決定読み取りにおける数値変化の相対頻度（例えば、±１、±２又はそれを超える塩基）によって定量化される。配列決定のためのＤＮＡサンプルは、当技術分野で公知の多様な方法によって調製され得、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）による目的部位の増幅、Tsai 2016（参照により本明細書に援用される）に記載されるＧＵＩＤＥｓｅｑプロセスにおけるような二本鎖切断によって生じるＤＮＡ末端の捕捉を伴い得るか、又は当技術分野で周知の別の手段によって調製され得る。ゲノム編集結果は、Genomic Vision（Bagneux、France）によって製品化されているFiberComb（登録商標）システムなどの原位置ハイブリダイゼーション法及び当技術分野で公知任意の他の適切な方法によっても評価され得る。

【００８３】
「Ａｌｔ－ＨＤＲ」、「代替相同指向修復」又は「代替ＨＤＲ」は、同義的に使用されて、相同核酸（例えば、姉妹染色分体などの内因性相同配列又は例えば鋳型核酸などの外因性核酸）を使用して、ＤＮＡ損傷を修復するプロセスを指す。Ａｌｔ－ＨＤＲは、プロセスが、標準ＨＤＲと異なる経路を利用し、標準ＨＤＲ媒介物であるＲＡＤ５１及びＢＲＣＡ２によって阻害され得るという点で標準ＨＤＲと異なる。Ａｌｔ－ＨＤＲは一本鎖又はニックの入った相同核酸鋳型の関与によっても区別されるのに対し、標準ＨＤＲは、一般に、二本鎖相同鋳型を伴う。
【００８４】
「標準ＨＤＲ」、「標準相同指向修復」又は「ｃＨＤＲ」は、相同核酸（例えば、姉妹染色分体などの内因性相同配列又は例えば鋳型核酸などの外因性核酸）を使用したＮＡ損傷を修復するプロセスを指す。標準ＨＤＲは、二本鎖切断で顕著な切除があり、少なくとも１つのＤＮＡの一本鎖部分が形成する場合に典型的に機能する。正常細胞では、ｃＨＤＲは、典型的に、切断の認識、切断の安定化、切除、一本鎖ＤＮＡの安定化、ＤＮＡクロスオーバー中間体の形成、クロスオーバー中間体の分解及びライゲーションなどの一連の工程を伴う。プロセスは、ＲＡＤ５１及びＢＲＣＡ２を必要とし、相同核酸は、典型的には、二本鎖である。
【００８５】
特に断りのない限り、「ＨＤＲ」という用語は、本明細書の用法では標準ＨＤＲ及びａｌｔ－ＨＤＲの両方を包含する。
【００８６】
「非相同末端結合」又は「ＮＨＥＪ」は、標準ＮＨＥＪ（ｃＮＨＥＪ）及び代替ＮＨＥＪ（ａｌｔＮＨＥＪ）などのライゲーション媒介修復及び／又は非鋳型媒介修復を指し、これは、次に、マイクロホモロジー媒介末端結合（ＭＭＥＪ）、一本鎖アニーリング（ＳＳＡ）及び合成依存性マイクロホモロジー媒介末端結合（ＳＤ－ＭＭＥＪ）を含む。
【００８７】
「置換」又は「置換された」は、分子（例えば、核酸又はタンパク質）の修飾に関して使用される場合、プロセス制限を必要とせず、単に置換実体が存在することを示す。
【００８８】
「対象」は、ヒト、マウス又は非ヒト霊長類を意味する。ヒト対象は、任意の年齢（例えば、乳児、子供、若年成人又は成人）であり得、疾患に罹患しているか又は遺伝子の改変を必要としていることができる。
【００８９】
「治療する」、「治療すること」及び「治療」は、疾病を抑制すること、すなわちその発症又は進行を阻止又は防止すること；疾病を緩和させること、すなわち疾病状態の退縮を引き起こすこと；疾病の１つ又は複数の症状を緩和すること；疾病を治癒させることの１つ又は複数をはじめとする、対象（例えば、ヒト対象）における疾病の治療を意味する。
【００９０】
「予防する」、「予防すること」及び「予防」は、（ａ）疾病を回避又は排除すること；（ｂ）疾病に対する素因に影響を及ぼすこと；又は（ｃ）疾病の少なくとも１つの症状の発症を予防又は遅延させることをはじめとする、対象における疾病の予防を指す。
【００９１】
「キット」とは、特定の目的のために使用され得る機能単位を一緒に構成する２つ以上の構成要素の任意の集合を指す。例証として（且つ限定ではなく）、本開示による１つのキットは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと複合体化した又は複合体化することができるガイドＲＮＡを含み得、（例えば、その中に懸濁された又は懸濁可能な）薬学的に許容可能な担体を伴う。特定の実施形態では、キットは、ブースター要素を含み得る。例えば、細胞又は対象において所望のゲノムの改変を引き起こす目的でキットを使用して、このような細胞又は対象に複合体を導入し得る。キットの構成要素は、一緒に包装され得るか、又はそれらは、別々に包装され得る。本開示によるキットは、例えば、本開示の方法によるキッ

トの使用を説明する使用説明書（ＤＦＵ）も任意選択的に含む。ＤＦＵは、キットと共に物理的に包装され得るか、又はそれは、例えば、電子的手段によってキット使用者に提供され得る。

【００９２】

「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、ＤＮＡ及びＲＮＡ中の一連のヌクレオチド塩基（「ヌクレオチド」とも称される）を指し、２つ以上のヌクレオチドの任意の鎖を意味する。ポリヌクレオチド、ヌクレオチド配列、核酸などは、一本鎖若しくは二本鎖のキメラ混合物又はそれらの誘導体若しくは修飾バージョンであり得る。それらは、例えば、塩基部分、糖部分又はリン酸骨格で修飾されて、分子の安定性、そのハイブリダイゼーションパラメーターなどが改善され得る。ヌクレオチド配列は、典型的には、タンパク質及び酵素を製造するために細胞機構によって使用される情報をはじめとするが、これに限定されるものではない遺伝情報を保有する。これらの用語は、二本鎖又は一本鎖のゲノムＤＮＡ、ＲＮＡ、任意の合成及び遺伝子操作ポリヌクレオチド並びにセンス及びアンチセンスポリヌクレオチドの両方を含む。これらの用語は、修飾塩基を含有する核酸も含む。

【００９３】

下記の表１に示されるように、慣用的なＩＵＰＡＣ表記法は、本明細書で提示されるヌクレオチド配列において使用される（参照により本明細書に援用されるCornish-Bowden A, Nucleic Acids Res. 1985 May 10; 13(9):3021-30も参照されたい）。しかし、配列がＤＮＡ又はＲＮＡのいずれかによって例えばｇＲＮＡ標的化ドメインにおいてコードされ得る場合、「Ｔ」は、「チミン又はウラシル」を示すことに留意すべきである。

【００９４】

【表１】

表 1:IUPAC 核酸表記法

特性	塩基
A	アデニン
T	チミン又はウラシル
G	グアニン
C	シトシン
U	ウラシル
K	G 又は T/U
M	A 又は C
R	A 又は G
Y	C 又は T/U
S	C 又は G
W	A 又は T/U
B	C、G 又は T/U
V	A、C 又は G
H	A、C 又は T/U
D	A、G 又は T/U
N	A、C、G 又は T/U

【００９５】

「タンパク質」、「ペプチド」及び「ポリペプチド」という用語は、同義的に使用され、ペプチド結合を介して共に連結するアミノ酸の連続鎖を指す。この用語は、個々のタンパク質、共に結合するタンパク質の群又は複合体並びにそのようなタンパク質の断片又は部分、変異型、誘導体及び類似体を含む。ペプチド配列は、左側のアミノ又はＮ末端から開始して、右側のカルボキシル又はＣ末端に進む、慣用的な表記法を用いて本明細書に提示される。標準的な一文字又は三文字略語が使用され得る。

【００９６】

「ＣＣＡＡＴボックス標的領域」などの表記は、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２遺伝子の転写開始部位（ＴＳＳ）の５’側に位置する配列を指す。ＣＣＡＡＴボックスは、α様及びβ様グロビン遺伝子のプロモーター領域内の高度に保存されたモチーフである。ＣＣＡＡＴボックス内又はその近傍の領域は、グロビン遺伝子の制御に重要な役割を果たす。例えば、γ-グロビン遠位ＣＣＡＡＴボックスは、胎児型ヘモグロビンの遺伝性持続性に関連する。いくつかの転写因子は、例えば、ＮＦ－Ｙ、ＣＯＵＰ－ＴＦＩＩ（ＮＦ－Ｅ３）、ＣＤＰ、ＧＡＴＡ１／ＮＦ－Ｅ１及びＤＲＥＤなどのγ-グロビンプロモーターの重複ＣＣＡＡＴボックス領域に結合することが報告されている（Martyn 2017）。理論による拘束を望むものではないが、転写活性化因子ＮＦ－Ｙの結合部位は、γ-グロビンプロモーターの転写抑制因子と重なると考えられる。例えば、ＣＣＡＡＴボックス内又はその近傍など、遠位γ-グロビンプロモーター領域内に存在するＨＰＦＨ変異は、これらの因子の競合的結合を改変し、したがってγ-グロビン発現の増加及びＨｂＦレベルの上昇に寄与し得る。ＨＢＧ１及びＨＢＧ２について本明細書で提供されるゲノム位置は、ＮＣＢＩ参照配列NC_000011 “Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p12 Primary Assembly,” (Version NC_000011.10)で提供される座標に基づく。ＨＢＧ１及びＨＢＧ２の遠位ＣＣＡＡＴボックスは、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２　ｃ．－１１１～－１１５に位置する（ゲノム位置は、それぞれＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９６８～Ｃｈｒ１１：５，２４９，９７２及びＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，８９２～Ｃｈｒ１１：５，２５４，８９６である）。ＨＢＧ１　ｃ．－１１１～－１１５領域は、配列番号９０２（ＨＢＧ１）で位置２８２３～２８２７に例示され、ＨＢＧ２　ｃ．－１１１～－１１５領域は、配列番号９０３（ＨＢＧ２）で位置２７４７～２７５１に例示される。特定の実施形態では、「ＣＣＡＡＴボックス標的領域」は、遠位ＣＣＡＡＴボックスの領域又はその近傍の領域を示し、遠位ＣＣＡＡＴボックスのヌクレオチドと、遠位ＣＣＡＡＴボックス上流（５’）の２５ヌクレオチド及び下流（３’）の２５ヌクレオチド（すなわちＨＢＧ１／２　ｃ．－８６～－１４０）とを含む（ゲノム位置は、それぞれＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５２４９９４３～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５２４９９９７及びＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５２５４８６７～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５２５４９２１である）。ＨＢＧ１　ｃ．－８６～－１４０領域は、配列番号９０２（ＨＢＧ１）で位置２７９８～２８５２に例示され、ＨＢＧ２　ｃ．－８６～－１４０領域は、配列番号９０３（ＨＢＧ２）で位置２７２３～２７７６に例示される。他の実施形態では、「ＣＣＡＡＴボックス標的領域」は、遠位ＣＣＡＡＴボックスの領域又はその近傍の領域を示し、遠位ＣＣＡＡＴボックスのヌクレオチドと、遠位ＣＣＡＡＴボックス上流（５’）の５ヌクレオチド及び下流（３’）の５ヌクレオチド（すなわちＨＢＧ１／２ｃ．－１０６～－１２０（ゲノム位置は、それぞれＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５２４９９６３～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５２４９９７７（ＨＧＢ１及びＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５２５４８８７～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５２５４９０１である））とを含む。ＨＢＧ１　ｃ．－１０６～－１２０領域は、配列番号９０２（ＨＢＧ１）で位置２８１８～２８３２に例示され、ＨＢＧ２　ｃ．－１０６～－１２０領域は、配列番号９０３（ＨＢＧ２）で位置２７４２～２７５６に例示される。「ＣＣＡＡＴボックス標的部位改変」という用語は、ＣＣＡＡＴボックス標的領域の１つ又は複数のヌクレオチドの改変（例えば、欠失、挿入、変異）などを指す。例示的なＣＣＡＡＴボックス標的領域改変の例としては、限定することなく、１ｎｔ欠失、４ｎｔ欠失、１１ｎｔ欠失、１３ｎｔ欠失及び１８ｎｔ欠失並びに－１１７Ｇ＞Ａ改変が挙げられる。本明細書の用法では、「ＣＣＡＡＴボックス」及び「ＣＡＡＴボックス」という用語は、同義的に使用され得る。

【００９７】

「ｃ．－１１４～－１０２領域」、「ｃ．－１０２～－１１４領域」、「－１０２：－１１４」、「１３ｎｔ標的領域」などの表記は、それぞれゲノム位置Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９５９～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９７１及びＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，８８３～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，８９５におけるＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２遺伝子の転写開始部位（ＴＳＳ）の５’側の配列を指す。ＨＢＧ１ｃ．－１０２～－１１４領域は、配列番号９０２（ＨＢＧ１）で位置２８２４～２８３６

に例示され、ＨＢＧ２　ｃ．－１０２～－１１４領域は、配列番号９０３（ＨＢＧ２）で位置２７４８～２７６０に例示される。「１３ｎｔ欠失」などの用語は、１３ｎｔの標的領域の欠失を指す。

【００９８】

「ｃ．－１２１～－１０４領域」、「ｃ．－１０４～－１２１領域」、「－１０４：－１２１」、「１８ｎｔ標的領域」などの表記は、それぞれゲノム位置Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９６１～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９７８及びＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，８８５～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，９０２におけるＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２遺伝子の転写開始部位（ＴＳＳ）の５’側の配列を指す。ＨＢＧ１ｃ．－１０４～－１２１領域は、配列番号９０２（ＨＢＧ１）で位置２８１７～２８３４に例示され、ＨＢＧ２　ｃ．－１０４～－１２１領域は、配列番号９０３（ＨＢＧ２）で位置２７４１～２７５８に例示される。「１８ｎｔ欠失」などの用語は、１８ｎｔの標的領域の欠失を指す。

【００９９】

「ｃ．－１０５～－１１５領域」、「ｃ．－１１５～－１０５領域」、「－１０５：－１１５」、「１１ｎｔ標的領域」などの表記は、それぞれゲノム位置Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９６２～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９７２及びＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，８８６～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，８９６におけるＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２遺伝子の転写開始部位（ＴＳＳ）の５’側の配列を指す。ＨＢＧ１ｃ．－１０５～－１１５領域は、配列番号９０２（ＨＢＧ１）で位置２８２３～２８３３に例示され、ＨＢＧ２　ｃ．－１０５～－１１５領域は、配列番号９０３（ＨＢＧ２）で位置２７４７～２７５７に例示される。「１１ｎｔ欠失」などの用語は、１１ｎｔの標的領域の欠失を指す。

【０１００】

「ｃ．－１１５～－１１２領域」、「ｃ．－１１２～－１１５領域」、「－１１２：－１１５」、「４ｎｔ標的領域」などの表記は、それぞれゲノム位置Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９６９～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９７２及びＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，８９３～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，８９６におけるＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２遺伝子の転写開始部位（ＴＳＳ）の５’側の配列を指す。ＨＢＧ１ｃ．－１１２～－１１５領域は、配列番号９０２で位置２８２３～２８２６に例示され、ＨＢＧ２　ｃ．－１１２～－１１５領域は、配列番号９０３（ＨＢＧ２）で位置２７４７～２７５０に例示される。「４ｎｔ欠失」などの用語は、４ｎｔの標的領域の欠失を指す。

【０１０１】

「ｃ．－１１６領域」、「ＨＢＧ－１１６」、「１ｎｔ標的領域」などの表記は、それぞれゲノム位置Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９７３及びＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，８９７におけるＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２遺伝子の転写開始部位（ＴＳＳ）の５’側の配列を指す。ＨＢＧ１　ｃ．－１１６領域は、配列番号９０２で位置２８２２に例示され、ＨＢＧ２ｃ．－１１６領域は、配列番号９０３（ＨＢＧ２）で位置２７４６に例示される。「１ｎｔ欠失」などの用語は、１ｎｔの標的領域の欠失を指す。

【０１０２】

「ｃ．－１１７Ｇ＞Ａ領域」、「ＨＢＧ－１１７Ｇ＞Ａ」、「－１１７Ｇ＞Ａ標的領域」などの表記は、それぞれゲノム位置Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９７４～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２４９，９７４及びＨｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，８９８～Ｈｇ３８　Ｃｈｒ１１：５，２５４，８９８におけるＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２遺伝子の転写開始部位（ＴＳＳ）の５’側の配列を指す。ＨＢＧ１　ｃ．－１１７Ｇ＞Ａ領域は、配列番号９０２で位置２８２１におけるグアニン（Ｇ）からアデニン（Ａ）への置換によって例示され、ＨＢＧ２　ｃ．－１１７Ｇ＞Ａ領域は、配列番号９０３（ＨＢＧ２）で位置２７４５におけるＧからＡへの置換によって例示される。「－１１７Ｇ＞Ａ改変」などの用語は、－１１７Ｇ＞Ａ標的領域におけるＧからＡへの置換を指す。

【０１０３】

「近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列」という用語は、１３ｎｔ標的領域を含むＨＢＧ１／２プロモーター配列の近位の５０、１００、２００、３００、４００又は５００ｂｐ内の領域を示す。本開示に従ったゲノム編集システムによる改変は、赤血球子孫におけるＨｂＦ生産の上方制御を容易にする（例えば、引き起こすか、促進するか又は可能性を増加させる傾向がある）。

【０１０４】

「ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ」という用語は、ＢＣＬ１１Ａ遺伝子のイントロン２の＋５８　ＤＮａｓｅＩ高感受性部位（ＤＨＳ）領域にある、ＢＣＬ１１Ａ（ＢＣＬ１１Ａｅ）の赤血球特異的エンハンサー中のＧＡＴＡ１結合モチーフである配列を指す。ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフのゲノム座標は、ｃｈｒ２：６０，４９５，２６５～６０，４９５，２７０である。＋５８　ＤＨＳ部位は、配列番号９６８に記載される１１５塩基対（ｂｐ）配列を含む。約５００ｂｐ上流及び約２００ｂｐ下流を含めた＋５８　ＤＨＳ部位配列は、配列番号９６９で記載される。

【０１０５】

本明細書で範囲が提供される場合、端点が含まれる。さらに、特に断りのない限り又はさもなければ文脈及び／若しくは当業者の理解から明白な場合を除いて、範囲として表される値は、本発明の異なる実施形態において、文脈上例外が明記されていない限り、範囲下限値の単位の１０分の１まで、記述される範囲内の任意の特定値を取り得るものと理解される。また、特に断りのない限り又はさもなければ文脈及び／若しくは当業者の理解から明白な場合を除いて、範囲で表わされる値は、与えられた範囲内の任意の部分的範囲を取ることができ、部分範囲の端点は、範囲の下限値の単位の１０分の１の同じ精度で表されるものと理解される。

【０１０６】

概要

本開示の様々な実施形態は、一般に、ヘモグロビンのＡγ及びＧγサブユニットをそれぞれコード化するＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２遺伝子の転写を増強するように、染色体ＤＮＡに改変（例えば、欠失若しくは挿入又は他の変異）を導入するように構成されたゲノム編集システムに関する。特定の実施形態では、本明細書に提供される方法を用いた１つ又は複数のγ-グロビン遺伝子（例えば、ＨＢＧ１、ＨＢＧ２）の発現の増加は、ＨｂＡに優るＨｂＦの優先的な形成をもたらし、且つ／又は総ヘモグロビンの百分率としてＨｂＦレベルが増加する。特定の実施形態では、本開示は、一般に、Ｃｐｆ１分子に複合体化したｇＲＮＡを含むＲＮＰ複合体の使用に関する。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、未修飾であるか又は修飾され得、Ｃｐｆ１分子は、野生型Ｃｐｆ１タンパク質又は修飾Ｃｐｆ１タンパク質であり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１３、表１８又は表１９に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５～３９、１０９４～１０９７、１１０７～０９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１、１１１０～１７（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列によってコード化され得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、表２１に記載されるＲＮＰ複合体を含み得る。例えば、ＲＮＰ複合体は、配列番号１０５１に記載される配列を含むｇＲＮＡと、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化される修飾Ｃｐｆ１タンパク質とを含み得る（表２１のＲＮＰ３２）。

【０１０７】

胎児型ヘモグロビン（ＨＰＦＨ）の遺伝性持続性の病状を有する患者は、γ-グロビン調節要素に変異を有し、それは、出産前後に抑圧されず、生涯にわたる胎児型γ-グロビンの発現をもたらすことが以前に示されている（Martyn 2017）。これは、胎児型ヘモグロビン（ＨｂＦ）の発現の上昇をもたらす。ＨＰＦＨ変異は、欠失性又は非欠失性（例えば、点変異）であり得る。ＨＰＦＨを有する対象は、生涯にわたるＨｂＦの発現を示し、すなわちグロビンスイッチングを受けないか又は貧血の症状なしに部分的にのみ受ける。

【０１０８】

ＨｂＦ発現は、例えば、ＨＢＧ１　ｃ．－１１４　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－１１７　Ｇ＞Ａ；ｃ．－１５８　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－１６７　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－１７０　Ｇ＞Ａ；ｃ．－１７５　Ｔ＞Ｇ；ｃ．－１７５　Ｔ＞Ｃ；ｃ．－１９５　Ｃ＞Ｇ；ｃ．－１９６　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－１９７　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－１９８　Ｔ＞Ｃ；ｃ．－２０１　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－２０２　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－２１１　Ｃ＞Ｔ、ｃ．－２５１　Ｔ＞Ｃ；又はｃ．－４９９　Ｔ＞Ａ；又はＨＢＧ２　ｃ．－１０９　Ｇ＞Ｔ；ｃ．－１１０　Ａ＞Ｃ；ｃ．－１１４　Ｃ＞Ａ；ｃ．－１１４　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－１１４　Ｃ＞Ｇ；ｃ．－１５７　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－１５８　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－１６７　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－１６７　Ｃ＞Ａ；ｃ．－１７５　Ｔ＞Ｃ；ｃ．－１９７　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－２００＋Ｃ；ｃ．－２０２　Ｃ＞Ｇ；ｃ．－２１１　Ｃ＞Ｔ；ｃ．－２２８　Ｔ＞Ｃ；ｃ．－２５５　Ｃ＞Ｇ；ｃ．－３０９　Ａ＞Ｇ；ｃ．－３６９　Ｃ＞Ｇ；又はｃ．－５６７　Ｔ＞Ｇをはじめとする、自然発生のＨＰＦＨ変異型に関連するγ-グロビン調節エレメントの点変異を通じて誘導され得る。

【０１０９】

ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２遺伝子のプロモーター（すなわちＨＢＧ１／２　ｃ．－１１１～－１１５）内に見られる、遠位ＣＣＡＡＴボックスモチーフにおける自然発生の変異もγ-グロビンの継続的発現及びＨＰＦＨの病状をもたらすことが示されている。ＣＣＡＡＴボックスの改変（変異又は欠失）は、１つ又は複数の転写リプレッサーの結合を妨害し、γ-グロビン遺伝子の継続的発現及びＨｂＦ発現の上昇をもたらし得ると考えられる（Martyn 2017）。例えば、自然発生の１３塩基対ｄｅｌ　ｃ．－１１４～－１０２（「１３ｎｔ欠失」）は、ＨｂＦレベルの上昇に関連することが示されている（Martyn 2017）。遠位ＣＣＡＡＴボックスは、成人期に発現されてＨＢＧを抑制する、陰性調節転写因子のＣＣＡＡＴボックス内及びその周囲の結合モチーフと重なる可能性が高い（Martyn 2017）。

【０１１０】

本明細書で開示される遺伝子編集ストラテジーは、遠位ＣＣＡＡＴボックス内及び／又は遠位ＣＣＡＡＴボックス周囲の１つ又は複数のヌクレオチドを妨害することでＨｂＦ発現を増加させることである。特定の実施形態では、「ＣＣＡＡＴボックス標的領域」は、遠位ＣＣＡＡＴボックスの領域又はその近傍の領域であり得、遠位ＣＣＡＡＴボックスのヌクレオチドと、遠位ＣＣＡＡＴボックス上流（５’）の２５ヌクレオチド及び下流（３’）の２５ヌクレオチドとを含む（すなわちＨＢＧ１／２　ｃ．－８６～－１４０）。他の実施形態では、「ＣＣＡＡＴボックス標的領域」は、遠位ＣＣＡＡＴボックスの領域又はその近傍の領域であり得、遠位ＣＣＡＡＴボックスのヌクレオチドと、遠位ＣＣＡＡＴボックス上流（５’）の５ヌクレオチド及び下流（３’）の５ヌクレオチドとを含む（すなわちＨＢＧ１／２　ｃ．－１０６～－１２０）。限定することなく、ＨＢＧ　ｄｅｌ　ｃ．－１０４ｔｏ－１２１（「１８ｎｔ欠失」）、ＨＢＧ　ｄｅｌ　ｃ．－１０５ｔｏ－１１５（「１１ｎｔ欠失」）、ＨＢＧ　ｄｅｌ　ｃ．－１１２ｔｏ－１１５（「４ｎｔ欠失」）及びＨＢＧ　ｄｅｌ　ｃ．－１１６（「１ｎｔ欠失」）をはじめとする、ＨＢＧ発現を誘導する、ＣＣＡＡＴボックス標的領域の固有の非自然発生の改変が本明細書で開示される。特定の実施形態では、本明細書で開示されるゲノム編集システムを用いて、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２のＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変が導入され得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＣＣＡＡＴボックス標的領域の改変（欠失、挿入又は変異などの）をコード化するＤＮＡドナー鋳型の１つ又は複数を含み得る。特定の実施形態では、改変は、非自然発生の改変又は自然発生の改変であり得る。特定の実施形態では、ドナー鋳型は、１ｎｔ欠失、４ｎｔ欠失、１１ｎｔ欠失、１３ｎｔ欠失、１８ｎｔ欠失又はｃ．－１１７　Ｇ＞Ａ改変をコード化し得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、Ｃａｓ９、修飾Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１又は修飾Ｃｐｆ１をはじめとするＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含み得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、ｇＲＮＡ及びＣｐｆ１分子を含むＲＮＰを含み得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、未修飾であるか又は修飾され得、Ｃｐｆ１分子は、野生型Ｃｐｆ１タンパク質若しくは修飾Ｃｐｆ１タンパク質又はそれらの組み合わせであり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１３、表１８又は

表１９に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５～３９、１０９４～１０９７、１１０７～０９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１、１１１０～１７（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列によってコード化され得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、表２１に記載されるＲＮＰ複合体を含み得る。例えば、ＲＮＰ複合体は、配列番号１０５１に記載される配列を含むｇＲＮＡと、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化される修飾Ｃｐｆ１タンパク質とを含み得る（表２１のＲＮＰ３２）。

【０１１１】

ＨｂＦ発現は、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２を発現停止させるリプレッサーをコード化する転写リプレッサーである、ＢＣＬ１１Ａの赤血球細胞特異的発現の標的化妨害を通じても誘導され得る（Canvers 2015）。本明細書で開示される別の遺伝子編集ストラテジーは、ＢＣＬ１１Ａの赤血球特異的エンハンサー（ＢＣＬ１１Ａｅ）の標的化妨害によってＨｂＦ発現を増加させることである（その全体が参照により本明細書に援用される、2015年10月1日に公開された、本発明の譲受人に譲渡されたFriedland et al.（「Friedland」）による国際公開第２０１５／１４８８６０号でも論じられる）。特定の実施形態では、妨害の標的になるＢＣＬ１１Ａｅの領域は、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフであり得る。特定の実施形態では、本明細書で開示されるゲノム編集システムを用いて、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、ＨＢＧ１及び／若しくはＨＢＧ２の１３ｎｔ標的領域又はそれらの組み合わせに改変が導入され得る。

【０１１２】

本開示のゲノム編集システムは、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１などのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び標的領域内又はその近傍の配列に相補的な標的化ドメインを有する１つ又は複数のｇＲＮＡ並びに任意選択的に標的領域内又はその近傍の特定の変異（欠失又は挿入など）をコード化するＤＮＡドナー鋳型の１つ又は複数、及び／又は限定することなく、ランダムオリゴヌクレオチド、ＤＮＡ修復又はＤＮＡ損傷応答に関与する遺伝子産物の小分子作動薬若しくは拮抗薬又はペプチド剤をはじめとする、このような変異が生じる効率を高める薬剤を含み得る。

【０１１３】

ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフに変異を導入するための様々なアプローチが本開示の実施形態で用いられ得る。１つのアプローチでは、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ内で二本鎖切断などの単一改変が生成され、例えばインデルの形成又は領域の欠失をコード化するドナー鋳型配列の組み込みにより、領域の機能を妨害する様式で修復される。第２のアプローチでは、領域の両側に２つ以上の改変が生成され、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフをはじめとする介在配列の欠失がもたらされる。

【０１１４】

遺伝子治療及び／又はゲノム編集による異常ヘモグロビン症の治療は、疾患によって表現型的に影響を受ける細胞である赤血球又はＲＢＣが除核されており、上記の例示的なゲノム編集アプローチにおいて標的化される、異常ヘモグロビンタンパク質（Ｈｂ）サブユニット又はＡγ又はＧγサブユニットのいずれかをコード化する遺伝物質を含まないという事実によって複雑になっている。この複雑な状況は、本開示の特定の実施形態において、赤血球に分化する能力があるか又はさもなければ赤血球を生じる能力がある細胞の改変によって対処される。本開示の様々な実施形態に従って改変される赤血球系統内の細胞としては、限定することなく、造血幹及び前駆細胞（ＨＳＣ）、赤芽球（好塩基性、多染性及び／又は正染性赤芽球をはじめとする）、前赤芽球、多染性赤血球又は網状赤血球、胚性幹（ＥＳ）細胞及び／又は誘導多能性幹（ｉＰＳＣ）細胞が挙げられる。これらの細胞は、原位置（例えば、対象の組織内）又は生体外で改変され得る。原位置及び生体外にお

ける細胞改変のためのゲノム編集システムの実装形態については、以下の「ゲノム編集システムの実装形態：送達、製剤及び投与経路」の見出しの下に記載される。

【０１１５】

特定の実施形態では、Ａγ及び／又はＧγ発現の誘導をもたらす改変は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２のＣＣＡＡＴボックス標的領域内又はそれに近接する配列（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域の１０、２０、３０、４０又は５０、１００、２００、３００、４００又は５００塩基以内）に相補的な標的化ドメインを有する少なくとも１つのｇＲＮＡとを含むゲノム編集システムの使用を通じて得られる。以下でより詳細に論じられるように、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｇＲＮＡは、ＣＣＡＡＴボックス標的領域又はそれに近接する領域に結合して改変することができる複合体を形成する。本明細書で開示される実施形態で使用するための、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２のＣＣＡＡＴボックス標的領域又はそれに近接する領域に向けられた適切なｇＲＮＡ及びｇＲＮＡ標的化ドメインの例としては、限定することなく、配列番号２５１～９０１、９４０～９４２、９７０、９７１、９９６、９９７、１００２及び１００４に記載されるものが挙げられる。

【０１１６】

特定の実施形態では、Ａγ及び／又はＧγ発現の誘導をもたらす改変は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２の１３ｎｔ標的領域内又はそれに近接する配列（例えば、１３ｎｔ標的領域の１０、２０、３０、４０又は５０、１００、２００、３００、４００又は５００塩基以内）に相補的な標的化ドメインを有する少なくとも１つのｇＲＮＡとを含むゲノム編集システムの使用を通じて得られる。以下でより詳細に論じられるように、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｇＲＮＡは、１３ｎｔ標的領域又はそれに近接する領域に結合して改変することができる複合体を形成する。本明細書で開示される実施形態で使用するための、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２の１３ｎｔ標的領域又はそれに近接する領域に向けられた適切なｇＲＮＡ及びｇＲＮＡ標的化ドメインの例としては、限定することなく、配列番号２５１～９０１、９４０～９４２、９７０、９７１、９９６、９９７、１００２及び１００４に記載されるものが挙げられる。

【０１１７】

特定の実施形態では、ＨｂＦ発現の誘導をもたらす改変は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ内の又はそれに近接する配列（例えば、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフの１０、２０、３０、４０又は５０、１００、２００、３００、４００又は５００塩基内）に相補的な標的化ドメインを有する少なくとも１つのｇＲＮＡとを含むゲノム編集システムの使用を通じて得られる。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｇＲＮＡは、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフに結合して改変することができる複合体を形成する。本明細書で開示される実施形態で使用するための、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフに向けられた適切な標的化ドメインの例としては、限定することなく、配列番号９５２～９５５に記載されるものが挙げられる。

【０１１８】

ゲノム編集システムは、以下で詳細に論じられるように様々な方法で実装され得る。一例として、本開示のゲノム編集システムは、その中で複数のｇＲＮＡが使用される、リボ核タンパク質複合体又は複数の複合体として実装され得る。このリボ核タンパク質複合体は、その全体が参照により本明細書に援用される、2016年11月17日に公開された、Jennifer Gori（「Gori」）による共同譲渡された国際公開第２０１６／１８２９５９号に記載されるように、電気穿孔をはじめとする当技術分野で公知の方法を用いて標的細胞に導入され得る。

【０１１９】

これらの組成物内のリボ核タンパク質複合体は、限定することなく、電気穿孔（例えば、Lonza、Basel、Switzerlandによって製品化された技術であるヌクレオフェクション（商標）又は例えばMaxCyte Inc. Gaithersburg、Marylandによって製品化された類似

技術の使用）及びリポフェクション（例えば、Thermo Fisher Scientific、Waltham Massachusettsによって製品化されたリポフェクタミン（商標）試薬の使用）をはじめとする、当技術分野で公知の方法によって標的細胞内に導入される。代わりに又は加えて、リボ核タンパク質複合体は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び／又はｇＲＮＡをコード化する核酸の導入に続いて標的細胞自体内で形成される。これら及び他の送達様式は、以下の一般的用語及びGoriで説明される。

【０１２０】

本開示に従って生体外で改変されている細胞は、対象へのそれらの送達前に操作され得る（例えば、増殖、継代、凍結、分化、脱分化、導入遺伝子による形質導入など）。細胞は、様々に、それらが、それから得られた対象に送達される（「自己由来」移植）か、又は細胞のドナーと免疫学的に異なるレシピエントに送達される（「同種異系」移植）。

【０１２１】

場合により、自己由来移植は、対象から、末梢血中を循環しているか又は骨髄若しくは他の組織（例えば、脾臓、皮膚など）内を循環している複数の細胞を入手するステップと、これらの細胞を操作して（例えば、ｉＰＳＣを生成するための誘導、ＣＤ３４、ＣＤ９０、ＣＤ４９ｆなどの特定の細胞表面マーカーを発現する細胞の精製及び／又はＣＤ１０、ＣＤ１４、ＣＤ３８などの非赤血球系統に特徴的な表面マーカーを発現しない細胞の精製によって）、赤血球系統内の細胞を富化させるステップとを含む。細胞は、任意選択的に又は追加的に、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフを標的化するゲノム編集システムによる形質導入前に増殖され、導入遺伝子で形質導入され、サイトカイン又は他のペプチド又は小分子薬剤に曝露され、且つ／又は凍結／解凍される。ゲノム編集システムは、リボ核タンパク質複合体として、分離されたタンパク質及び核酸成分として、及び／又はゲノム編集システムの構成要素をコード化する核酸としてなど、任意の適切な形式で細胞に実装又は送達され得る。

【０１２２】

特定の実施形態では、本明細書で開示されるゲノム編集方法を使用して編集されているＣＤ３４＋造血幹及び前駆細胞（ＨＳＰＣ）は、それを必要とする対象における異常ヘモグロビン症の治療のために使用され得る。特定の実施形態では、異常ヘモグロビン症は、重篤な鎌状赤血球症（ＳＣＤ）又はβサラセミア、δサラセミア又はβ／δ-サラセミアなどのサラセミアであり得る。特定の実施形態では、異常ヘモグロビン症の治療の例示的プロトコルは、それを必要とする対象からＣＤ３４＋ＨＳＰＣ採取すること、本明細書で開示されるゲノム編集方法を使用して自己由来ＣＤ３４＋ＨＳＰＣをエクスビボで編集すること、それに続いて、編集された自己由来ＣＤ３４＋ＨＳＰＣを対象に再輸液することを含み得る。特定の実施形態では、編集された自己由来ＣＤ３４＋ＨＳＰＣによる治療は、ＨｂＦ誘導の増加をもたらし得る。

【０１２３】

特定の実施形態では、ＣＤ３４＋ＨＳＰＣの採取前に、対象は、適用可能な場合にはヒドロキシ尿素による治療を中止し、十分なヘモグロビン（Ｈｂ）レベルを維持するために輸血を受け得る。特定の実施形態では、骨髄から末梢血中にＣＤ３４＋ＨＳＰＣを動員するために、対象にプレリキサホル（例えば、０．２４ｍｇ／ｋｇ）が静脈内投与され得る。特定の実施形態では、対象は、１回又は複数回の白血球アフェレーシスサイクルを受け得る（例えば、サイクル間がおよそ１ヶ月間で、１サイクルは、連日実施される２回のプレリキサホル動員白血球アフェレーシス採取として定義される）。特定の実施形態では、対象に実施される白血球アフェレーシスサイクルの回数は、バックアップ保存のための未編集の自己由来ＣＤ３４＋ＨＳＰＣ／ｋｇの用量と共に、対象に再輸液するための（例えば、≧１．５×10^6細胞／ｋｇ）、編集された自己由来ＣＤ３４＋ＨＳＰＣの用量（例えば、≧２×10^6細胞／ｋｇ、≧３×10^6細胞／ｋｇ、≧４×10^6細胞／ｋｇ、≧５×10^6細胞／ｋｇ、２×10^6細胞／ｋｇ～３×10^6細胞／ｋｇ、３×10^6細胞／ｋｇ～４×10^6細胞／ｋｇ、４×10^6細胞／ｋｇ～５×10^6細胞／ｋｇ）を達成するの

に必要な回数であり得る。特定の実施形態では、対象から採取されたＣＤ３４＋ＨＳＰＣは、本明細書で考察されるゲノム編集方法のいずれかを使用して編集され得る。特定の実施形態では、本明細書で開示される、ｇＲＮＡの任意の１つ又は複数及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの１つ又は複数がゲノム編集方法で使用され得る。

【０１２４】

特定の実施形態では、治療は、自己由来幹細胞移植を含み得る。特定の実施形態では、対象は、ブスルファン馴化による骨髄破壊的馴化を受け得る（例えば、１ｍｇ／ｋｇの試験用量で初回用量薬物動態分析に基づいて用量調整される）。特定の実施形態では、馴化は、４日間連続して行われ得る。特定の実施形態では、３日間のブスルファン休薬期間後、編集された自己由来ＣＤ３４＋ＨＳＰＣ（例えば、≧２×１０^{6}細胞／ｋｇ、≧３×１０^{6}細胞／ｋｇ、≧４×１０^{6}細胞／ｋｇ、≧５×１０^{6}細胞／ｋｇ、２×１０^{6}細胞／ｋｇ～３×１０^{6}細胞／ｋｇ、３×１０^{6}細胞／ｋｇ～４×１０^{6}細胞／ｋｇ、４×１０^{6}細胞／ｋｇ～５×１０^{6}細胞／ｋｇ）が対象に再輸液され得る（例えば、末梢血中に）。特定の実施形態では、編集された自己由来ＣＤ３４＋ＨＳＰＣは、特定の対象のために製造され、凍結保存され得る。特定の実施形態では、対象は、連続的な骨髄破壊的馴化レジメン及び編集された自己由来ＣＤ３４＋細胞の輸液に続いて、好中球の移植を達成し得る。好中球移植は、≧０．５×１０^{9}／ＬのＡＮＣの３回の連続測定として定義され得る。

【０１２５】

どのように実装されていても、ゲノム編集システムは、限定することなく、StemRegenin-1（ＳＲ１）、ＵＭ１７１、ＬＧＣ０００６、α-ナフトフラボン及びＣＨ－２２３１９１などのアリール炭化水素受容体拮抗薬並びに／又はシクロスポリンＡ、デキサメタゾン、レスベラトロール、ＭｙＤ８８阻害性ペプチド、ＲＮＡｉ剤標的化Ｍｙｄ８８、Ｂ１８Ｒ組換えタンパク質、グルココルチコイド、ＯｘＰＡＰＣ、ＴＬＲ拮抗薬、ラパマイシン、ＢＸ７９５及びＲＬＲ ｓｈＲＮＡなどの自然免疫応答拮抗薬をはじめとする、編集中及び編集後に細胞の生存能力を改善する１つ又は複数の要因を含み得るか、又はそれと共に同時送達され得る。編集中及び編集後の細胞生存能力を改善するこれら及び他の要因は、参照により本明細書に援用されるGoriで３６～６１ページの「I. Optimization of Stem Cells」という見出しの下に記載される。

【０１２６】

ゲノム編集システムの送達に続いて、細胞は、任意選択的に操作され、例えば赤血球系統内のＨＳＣ及び／若しくは細胞並びに／又は編集された細胞が富化され、それらが増殖され、凍結／解凍されるか、又は対象に戻すために、細胞は、別の方法で準備される。次に、編集された細胞は、例えば、静脈内送達又は送達の手段によって循環系内又は骨髄などの固形組織内へと対象に戻される。

【０１２７】

機能的に、本開示の組成物、方法及びゲノム編集システムを用いたＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフの改変は、ヘモグロビン発現細胞間において、例えば未修飾対照と比較してＡγ及び／又はＧγサブユニット発現の少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％以上の誘導などのＡγ及び／又はＧγサブユニット（ＨｂＦ発現として同義的に言及される）の有意な誘導をもたらす。このタンパク質発現の誘導は、一般に、例えば、限定することなく、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ内又はその近傍のインデル、挿入又は欠失をはじめとする配列の改変を含む少なくとも１つの対立遺伝子を含む、複数の細胞の少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％など、処理された複数の細胞の一部又は全部におけるＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ（例えば、複数の細胞内におけるインデル変異を含む全ゲノムの百分率で表される）の改変の結果である

【０１２８】
本開示のゲノム編集システム及び方法によって引き起こされたか又は促進された改変の機能効果は、任意の数の好適な方法で評価され得る。例えば、胎児型ヘモグロビンの発現に対する改変の効果は、タンパク質又はｍＲＮＡレベルで評価され得る。ＨＢＧ１及びＨＢＧ２ ｍＲＮＡの発現は、処理サンプル又は未処理サンプルから採取されたｍＲＮＡの逆転写によって得られたｃＤＮＡサンプル上で実施されるデジタル液滴ＰＣＲ（ｄｄＰＣＲ）によって評価され得る。ＨＢＧ１、ＨＢＧ２、ＨＢＢ及び／又はＨＢＡのためのプライマーは、当技術分野で公知の方法を用いて、個別に又は多重化して使用され得る。例えば、サンプルのｄｄＰＣＲ分析は、BioRad（Hercules、CA）によって製品化されたＱＸ２００（商標）ｄｄＰＣＲシステム及びＢｉｏ－Ｒａｄによって公開された関連プロトコルを用いて実施され得る。胎児型ヘモグロビンタンパク質は、例えば、Chang 2017（参照により本明細書に援用される）の１４３～４４ページで論じられる方法に従い、高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）又は高速タンパク質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）により、当技術分野で公知のように、ＨｂＦ、ＨｂＢ及びＨｂＡ及び／又はＡγ及びＧγグロビン鎖を分離するイオン交換カラム及び／又は逆相カラムを使用して評価され得る。
【０１２９】
ＣＣＡＡＴボックス標的領域（例えば、１８ｎｔ、１１ｎｔ、４ｎｔ、１ｎｔ、ｃ．－１１７　Ｇ＞Ａ標的領域）、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフが標的細胞内で改変される率は、オリゴヌクレオチドドナー鋳型などの任意選択的なゲノム編集システム構成要素の使用によって修正され得ることに留意すべきである。ドナー鋳型の設計は、「ドナー鋳型の設計」という見出しの下において以下の一般用語で説明される。１３ｎｔ標的領域の標的化で使用するためのドナー鋳型としては、限定することなく、ＨＢＧ１　ｃ．－１１４～－１０２（配列番号９０２のヌクレオチド２８２４～２８３６に対応する）、ＨＢＧ１　ｃ．－２２５～－２２２（配列番号９０２のヌクレオチド２７１６～２７１９に対応する））及び／又はＨＢＧ２　ｃ．－１１４～－１０２（配列番号９０３のヌクレオチド２７４８～２７６０に対応する）の改変（例えば、欠失）をコード化するドナー鋳型が挙げられ得る。例示的な５’及び３’相同性アーム並びにｃ．－１１４～－１０２などの欠失をコード化する例示的な完全長ドナー鋳型も以下に提示される（配列番号９０４～９０９）。特定の実施形態では、１８ｎｔ標的領域の標的化で使用するためのドナー鋳型としては、限定することなく、ＨＢＧ１　ｃ．－１０４～－１２１、ＨＢＧ２　ｃ．－１０４～－１２１又はそれらの組み合わせの改変（例えば、欠失）をコード化するドナー鋳型が挙げられ得る。ｃ．－１０４～－１２１などの欠失をコード化する例示的な完全長ドナー鋳型としては、配列番号９７４及び９７５が挙げられる。特定の実施形態では、１１ｎｔ標的領域の標的化で使用するためのドナー鋳型としては、限定することなく、ＨＢＧ１　ｃ．－１０５～－１１５、ＨＢＧ２　ｃ．－１０５～－１１５又はそれらの組み合わせの改変（例えば、欠失）をコード化するドナー鋳型が挙げられ得る。ｃ．－１０５～－１１５などの欠失をコード化する例示的な完全長ドナー鋳型としては、配列番号９７６及び９７８が挙げられる。特定の実施形態では、４ｎｔ標的領域の標的化で使用するためのドナー鋳型としては、限定することなく、ＨＢＧ１　ｃ．－１１２～－１１５、ＨＢＧ２　ｃ．－１１２～－１１５又はそれらの組み合わせの改変（例えば、欠失）をコード化するドナー鋳型が挙げられ得る。ｃ．－１１２～－１１５などの欠失をコード化する例示的な完全長ドナー鋳型としては、配列番号９８４～９９５が挙げられる。特定の実施形態では、１ｎｔ標的領域の標的化で使用するためのドナー鋳型としては、限定することなく、ＨＢＧ１　ｃ．－１１６、ＨＢＧ２　ｃ．－１１６又はそれらの組み合わせの改変（例えば、欠失）をコード化するドナー鋳型が挙げられ得る。ｃ．－１１６などの欠失をコード化する例示的な完全長ドナー鋳型としては、配列番号９８２及び９８３が挙げられる。特定の実施形態では、ｃ．－１１７　Ｇ＞Ａ標的領域の標的化で使用するためのドナー鋳型としては、限定することなく、ＨＢＧ１　ｃ．－１１７　Ｇ＞Ａ、ＨＢＧ２　ｃ．－１１７　Ｇ＞Ａ又はそれらの組み合わせの改変（例えば、欠失）をコード化するドナー鋳型が挙げられ得る。ｃ．－

１１７　Ｇ＞Ａなどの欠失をコード化する例示的な完全長ドナー鋳型としては、配列番号９８０及び９８１が挙げられる。特定の実施形態では、ドナー鋳型は、プラス鎖又はマイナス鎖であり得る。

【０１３０】

本明細書で使用されるドナー鋳型は、標的配列内又はその近傍のＤＮＡの領域に非相同的な非特異的鋳型であり得る。特定の実施形態では、１３ｎｔ標的領域の標的化で使用するためのドナー鋳型としては、限定することなく、１３ｎｔ標的領域内又はその近傍のＤＮＡの領域と非相同的な非標的特異的鋳型が挙げられ得る。例えば、１３ｎｔ標的領域の標的化で使用するための非特異的ドナー鋳型は、１３ｎｔ標的領域内又はその近傍のＤＮＡ領域に非相同的であり得、ＨＢＧ１　ｃ．－２２５～－２２２（配列番号９０２のヌクレオチド２７１６～２７１９に対応する）の欠失をコード化するドナー鋳型を含み得る。特定の実施形態では、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ標的化で使用するためのドナー鋳型としては、限定することなく、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ標的配列内又はその近傍のＤＮＡの領域と非相同的な非標的特異的鋳型が挙げられ得る。ＢＣＬ１１Ａｅの標的化で使用するための他のドナー鋳型としては、限定することなく、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１モチーフはじめとするＢＣＬ１１Ａｅの改変（例えば、欠失）を含むドナー鋳型が、限定することなく挙げられ得る。

【０１３１】

本明細書に記載される実施形態は、霊長類、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ及びネコをはじめとするが、これらに限定されるものではない脊椎動物の全てのクラスで使用され得る。

【０１３２】

この概要は、細胞を改変するゲノム編集システム及びＣＲＩＳＰＲ媒介方法の原理を描写する少数の例示的な実施形態に焦点を当てている。しかし、明確さのために、本開示は、上記で明示的に取り上げられていないが、当業者に明らかであろう修正形態及び変形形態を包含する。これを念頭に置いて、以下の本開示は、ゲノム編集システムの動作原理をより一般的に例証することを意図している。以下の内容は、限定的なものとして理解されるべきではなく、むしろゲノム編集システム及びこれらのシステムを利用したＣＲＩＳＰＲ媒介方法の特定の原理を例証するものであり、これらは、本開示と組み合わされて、その範囲内にある追加的な実装形態及び修正形態について当業者に情報を提供するであろう。

【０１３３】

ＲＮＡ誘導ヘリカーゼ、ガイドＲＮＡ及び死滅ガイドＲＮＡ

本開示の様々な実施形態は、一般に、核酸のらせん構造を改変して、核酸中の標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）のゲノム編集を増強するように構成されたゲノム編集システム並びにその方法及び組成物にも関する。多くの実施形態は、核酸中の標的領域内又はそれに隣接するＤＮＡのらせん構造を改変する事象を配置することが、このような標的領域に向けられたゲノム編集システムの活性を改善し得るという観察に関連する。いかなる理論による拘束も望まないが、ＤＮＡ標的領域内又はその近位のらせん構造の（例えば、巻き戻しによる）改変がゲノム編集システムの標的領域へのアクセス性を誘導するか又は増加させて、ゲノム編集システムによる標的領域の編集の増加をもたらし得ると考えられる。

【０１３４】

ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼは、主に、ゲノムがクロマチンに自然に組織化されていないウイルス性病原体から細菌を防御するために進化した。対照的に、真核生物のゲノムは、ヒストン周辺に巻かれたゲノムＤＮＡセグメントを含むヌクレオソーム単位に編成される。いくつかの細菌科からのＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼは、真核生物のＤＮＡ編集に不活性であることが分かっており、ヌクレオソーム結合ＤＮＡの編集能力は、酵素によって異なり得ることが示唆される（Ran 2015）。生化学的証拠は、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）のＣａｓ９がヌクレオソームの端では効率的にＤＮＡを切断し得るが、標的部位がヌク

レオソームダイアドの中心付近に位置する場合に活性低下を有することを示す（Hinz 2016)。

【０１３５】

多くの細胞型では、目的の標的部位は、ヌクレオソームによって強く結合され得るか、又はヌクレオソームの存在下で効率的に編集されない酵素の隣接ＰＡＭのみを保有し得る。この場合、問題のあるヌクレオソームは、ヌクレオソーム縁部により近いか、又はヌクレオソームＤＮＡを結合させるのにより効果的な酵素によって結合される隣接する標的部位を使用することによって最初に置換され得る。しかし、これらの隣接部位における切断は、治療ストラテジーに有害であり得る。したがって、これらの隣接部位に結合するが、切断しない、プログラム可能な酵素があれば、より効率的な機能編集が可能になる。

【０１３６】

関連ストラテジーは、外因的トランス作用因子の動員を利用して、ヌクレオソーム置換を促進する。しかしながら、本開示のシステム及び方法は、標的化ドメインの切り詰めを超えるｇＲＮＡの修飾を必要とせず、外因的トランス作用因子の動員を必要とせず、増大した編集率を達成するための転写活性化を必要としないことから、このストラテジーよりも有利である。

【０１３７】

核酸の巻き戻し及び改変のための様々なアプローチが本開示の様々な実施形態において採用される。１つのアプローチは、細胞内の核酸の標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１ＡｅのＧＡＴＡ１結合モチーフ）内又はその近位のクロマチンセグメントを巻き戻し（又は開放し）、核酸の標的領域内に二本鎖切断（ＤＳＢ）を発生させ、それによって標的領域を改変することを含む。特定の実施形態では、ＤＳＢは、標的領域を改変する様式で修復され得る。本明細書に提供される方法を用いてクロマチンセグメントを巻き戻すことは、触媒活性なＲＮＰ（例えば、触媒活性ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｇＲＮＡ）のクロマチンへのアクセスの増加を促進し、ＤＮＡのより効率的な編集を可能にし得る。例えば、これらの方法を使用して、クロマチンが閉鎖型クロマチンなどのヌクレオソームによって占有されているために、リボヌクレオタンパク質（例えば、ｇＲＮＡに複合体化したＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ）がアクセスしにくい、クロマチン中の標的領域が編集され得る。特定の実施形態では、クロマチンセグメントの巻き戻しは、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼ活性を介して起こる。特定の実施形態では、巻き戻しステップは、クロマチンセグメントへの外因的トランス作用因子の動員を必要としない。特定の実施形態では、クロマチンセグメントを巻き戻すステップは、クロマチンセグメント内の核酸に一本鎖又は二本鎖切断を形成するステップを含まない。

【０１３８】

上記のアプローチ及び方法の特定の実施形態では、ＤＮＡらせん構造の改変は、「ＲＮＡ誘導ヘリカーゼ」の作用を通じて達成され、この用語は、一般に、（ａ）ｇＲＮＡと相互作用し（例えば、複合体化する）、（ｂ）ｇＲＮＡと一緒に標的部位に結合して巻き戻す、典型的にはペプチドである分子を指すために使用される。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、ヌクレアーゼ活性を欠くように構成されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含み得る。しかし、本発明者らは、切断能力があるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであっても、長さが１５以下のヌクレオチドの短縮型標的化ドメインを有する死滅ｇＲＮＡに複合体化させることにより、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼとしての使用に適応され得ることを観察している。死滅ｇＲＮＡと野生型ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとの複合体は、ＲＮＡ切断活性の低下又は消失を示すが、ヘリカーゼ活性を維持しているように見える。ＲＮＡ誘導ヘリカーゼ及び死滅ｇＲＮＡは、以下でより詳細に説明される。

【０１３９】

ＲＮＡ誘導ヘリカーゼに関して、本開示によれば、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、限定することなく、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをはじめとする、本明細書及び以下で「ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ」と題された見出しの下に開示されるＲＮＡ誘導ヌクレ

アーゼのいずれかを含み得る。これらのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼのヘリカーゼ活性は、ＤＮＡの巻き戻しを可能にし、編集されるべき所望の標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）へのゲノム編集システム構成要素（例えば、限定することなく、触媒的に活性なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｇＲＮＡ）の増加したアクセスを提供する。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性を有する触媒活性ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、ヌクレアーゼ活性を欠くように構成され得る。例えば、特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、触媒不活性型Ｃａｓ９分子など、ヌクレアーゼ活性を欠く触媒能のないＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得、それは、ヘリカーゼ活性をなおも提供する。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、死滅ｇＲＮＡに複合体化して、核酸を切断することができない死滅ＲＮＰを形成し得る。他の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、死滅ｇＲＮＡに複合体化して、核酸を切断することができない死滅ＲＮＰを形成する触媒活性ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、編集されるべき所望の標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）に外因的トランス作用因子を動員するように構成されていない。

【０１４０】

死滅ｇＲＮＡを参照すると、これらとしては、本明細書及び以下で「死滅ｇＲＮＡ分子」と題された見出しの下に考察される死滅ｇＲＮＡのいずれかが挙げられる。死滅ｇＲＮＡ（本明細書では「ｄｇＲＮＡ」とも称される）は、ｇＲＮＡ標的化ドメイン配列の５’末端を切り詰めて、長さが１５ヌクレオチド以下の標的化ドメイン配列をもたらすことで生成され得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、本明細書の表２又は表１０で開示されるｇＲＮＡ標的化ドメイン配列のいずれか１つの５’末端を切り詰めることで生成され得る。本開示に従った死滅ガイドＲＮＡ分子としては、減少した、低い又は検出不能な切断活性を有する死滅ガイドＲＮＡ分子が挙げられる。死滅ガイドＲＮＡ標的化ドメイン配列は、活性ガイドＲＮＡの標的化ドメイン配列と比較して長さが１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０ヌクレオチド短いことができる。死滅ｇＲＮＡ分子は、標的核酸中の標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）の近位の又はそれ以内の領域に相補的な標的化ドメインを含み得る。特定の実施形態では、「近位」は、標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）の１０、２５、５０、１００又は２００ヌクレオチド以内の領域を示し得る。特定の実施形態では、死滅ｇＲＮＡは、ＤＮＡの転写鎖又は非転写鎖に相補的な標的化ドメインを含む。特定の実施形態では、死滅ガイドＲＮＡは、標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）に外因的トランス作用因子を動員するように構成されていない。

【０１４１】

標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）内又はその近位のＤＮＡを、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼを使用して巻き戻し、標的領域内にＤＳＢを生成し、ＤＳＢの修復を通じて標的領域内にインデルを形成することにより、標的核酸中のインデル形成の率を増加させる方法も本明細書で提供される。ＲＮＡ誘導ヘリカーゼを使用してＤＮＡを巻き戻すステップは、ヘリカーゼを使用しないインデル形成方法と比較して増加したインデル形成を提供する。

【０１４２】

本開示は、細胞内の標的核酸のセグメントを欠失させる方法であって、細胞をＲＮＡ誘導ヘリカーゼに接触させ、標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標

的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）内に二本鎖切断（ＤＳＢ）を発生させるステップを含む方法をさらに包含する。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、標的核酸の標的領域内又はその近位に結合し、標的領域内又はその近位の二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を巻き戻すように構成される。特定の実施形態では、標的核酸は、遺伝子のプロモーター領域、遺伝子のコード領域、遺伝子の非コード領域、遺伝子のイントロン又は遺伝子のエクソンである。特定の実施形態では、欠失されるべき標的核酸のセグメントは、長さが少なくとも約１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５又は１００塩基対であり得る。特定の実施形態では、ＤＳＢは、標的核酸のセグメントを欠失させる方法で修復される。

【０１４３】

らせん構造に改変を導入するように構成されたゲノム編集システムは、以下で詳細に論じられるように様々な方法で実装され得る。一例として、本開示のゲノム編集システムは、その中で複数のｇＲＮＡが使用される、リボ核タンパク質複合体又は複数の複合体として実装され得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システムのリボ核タンパク質複合体は、死滅ガイドＲＮＡに複合体化したＲＮＡ誘導ヘリカーゼであり得る。リボ核タンパク質複合体は、Goriに記載されるように、電気穿孔をはじめとする当技術分野で公知の方法を用いて標的細胞に導入され得る。ＲＮＡ誘導ヘリカーゼを組み込んだゲノム編集システムは、限定することなく、標的領域内又はその近傍の特定の変異（欠失又は挿入など）をコード化するＤＮＡドナー鋳型の１つ又は複数の組み込み及び／又は限定することなく、ランダムオリゴヌクレオチド、ＤＮＡ修復又はＤＮＡ損傷応答に関与する遺伝子産物の小分子作動薬若しくは拮抗薬又はペプチド剤をはじめとする、このような変異が生じる効率を高める薬剤をはじめとする任意の適切な様式でも修正され得る。これらの修正は、以下で「ゲノム編集ストラテジー」の見出しの下でより詳細に説明される。明確さのために、本開示は、１つ若しくは複数のｇＲＮＡ、死滅ｇＲＮＡ、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼ、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はそれらの組み合わせを含む組成物を含む。

【０１４４】

上記の例示的な実施形態のいくつかがＤＮＡの巻き戻しに焦点を当てている一方、他のらせんの改変も本開示の範囲内であることに留意すべきである。これらとしては、限定することなく、巻き過剰、巻き不足、標的領域内若しくはそれに近接したＤＮＡ鎖上のねじれひずみ（例えば、トポイソメラーゼ活性を通じた）の増加若しくは減少、変性若しくは鎖分離及び／又はクロマチン構造の修飾をもたらす他の適切な改変が挙げられる。これらの改変のそれぞれは、ＲＮＡ誘導活性又は内因性因子の標的領域への動員によって触媒され得る。

【０１４５】

活性ガイドによって生成された１つ又は複数のインデル（例えば、インデルシグネチャ）を改変するゲノム編集システム及び方法も本明細書で提供される。本発明者らが本明細書において発見したように、死滅ＲＮＰ（ｄＲＮＰ）（すなわちＲＮＡ誘導ヌクレアーゼに複合体化した死滅ガイドＲＮＡ）と、活性ＲＮＰ（すなわちＲＮＡ誘導ヌクレアーゼに複合体化した活性ガイドＲＮＡ）との対形成は、活性ＲＮＰのみ（ｄＲＮＰ非含有）によって生成されたインデル（例えば、インデルシグネチャ）の方向性の変化をもたらし得る。以下の実施例で示されるように、死滅ガイドＲＮＡの使用は、活性ガイドＲＮＡ切断部位から死滅ガイドＲＮＡ結合部位に向けて伸びる、より大型の欠失の頻度の増加をもたらし得る。したがって、死滅ガイドＲＮＡを使用して、所望の標的部位に向けて欠失編集を効果的に「方向付け」得る。特定の実施形態では、活性ガイドＲＮＡと合わせた死滅ガイドＲＮＡの使用は、マイクロホモロジーに関連しない欠失の頻度を増加させ得る。

【０１４６】

以下の実施例のセクションに開示される実施例は、ＣＣＡＡＴボックス標的領域の改変を対象としているが、当業者は、本明細書に記載されるゲノム編集システム、方法、細胞及び組成物を使用して、他の任意の標的領域を改変し、例えば、限定することなく、標的

領域における欠失の頻度を増加させ、マイクロホモロジーに関連しない標的領域における欠失（例えば、ＭＭＥＪを介して修復されない）の頻度を増加させ得ることを想定するであろう。

【０１４７】

この概要は、細胞を改変するゲノム編集システム及びＣＲＩＳＰＲ媒介方法の原理を描写する少数の例示的な実施形態に焦点を当てている。しかし、明確さのために、本開示は、上記で明示的に取り上げられていないが、当業者に明らかであろう修正形態及び変形形態を包含する。これを念頭に置いて、以下の本開示は、ゲノム編集システムの動作原理をより一般的に例証することを意図している。以下の内容は、限定的なものとして理解されるべきではなく、むしろゲノム編集システム及びこれらのシステムを利用したＣＲＩＳＰＲ媒介方法の特定の原理を例証するものであり、これらは、本開示と組み合わされて、その範囲内にある追加的な実装形態及び修正形態について当業者に情報を提供するであろう。

【０１４８】

ゲノム編集システム

「ゲノム編集システム」という用語は、ＲＮＡ誘導ＤＮＡ編集活性を有する任意のシステムを指す。本開示のゲノム編集システムは、天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムから適合された、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの少なくとも２つの構成要素を含む。これらの２つの構成要素は、特定の核酸配列と結合して、例えば１つ又は複数の一本鎖切断（ＳＳＢ又はニック）、二重鎖切断（ＤＳＣ）及び／又は点変異を生成することにより、核酸配列中又はその周囲のＤＮＡを編集できる複合体を形成する。

【０１４９】

特定の実施形態では、本開示のゲノム編集システムは、ＤＮＡを巻き戻すためのヘリカーゼを含み得る。特定の実施形態では、ヘリカーゼは、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１分子など、本明細書に記載されるようなＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的領域に外因的トランス作用因子を動員するように構成されていない。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性を欠くように構成され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、本明細書で開示されるような死滅ガイドＲＮＡと複合体化し得る。例えば、死滅ガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）は、長さが１５ヌクレオチド未満の標的化ドメイン配列を含み得る。特定の実施形態では、死滅ガイドＲＮＡは、標的領域に外因的トランス作用因子を動員するように構成されていない。

【０１５０】

天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムは、進化的に２つのクラス及び５つの型に組織化され（Makarova 2011、参照により本明細書に援用される）、本開示のゲノム編集システムは、任意の型又はクラスの天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムの構成要素を適合させ得る一方、本明細書に提示される実施形態は、一般にクラス２及びＩＩ型又はＶ型のＣＲＩＳＰＲシステムから適合される。ＩＩ型及びＶ型を包含するクラス２システムは、相対的に大型の多ドメインＲＮＡ誘導ヌクレアーゼタンパク質（例えば、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１）と、１つ又は複数のガイドＲＮＡ（例えば、ｃｒＲＮＡ、任意選択的にｔｒａｃｒＲＮＡ）とによって特徴付けられ、それは、ｃｒＲＮＡの標的（又はスペーサー）配列に相補的な特定の遺伝子座と会合（標的化）して切断するリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成する。本開示によるゲノム編集システムは、細胞ＤＮＡ配列を同様に標的化して編集するが、天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムと著しく異なる。例えば、本明細書に記載の単分子ガイドＲＮＡは、自然界に存在せず、且つ本開示によるガイドＲＮＡ及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、いずれも天然に存在しない任意の数の修飾を組み込み得る。

【０１５１】

ゲノム編集システムは、様々な方法で実装され得（例えば、細胞又は対象に投与又は送達され得る）、異なる実装形態が異なる用途に適し得る。例えば、ゲノム編集システムは、特定の実施形態では、タンパク質／ＲＮＡ複合体（リボ核タンパク質又はＲＮＰ）とし

て実装され、それは、限定されないが、脂質若しくはポリマーの微粒子若しくはナノ粒子、ミセル又はリポソームなどの薬学的に許容可能な担体及び／又は封入剤を任意選択的に含む医薬組成物に含まれ得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、上述したＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びガイドＲＮＡ構成要素をコード化する１つ又は複数の核酸として（任意選択的に１つ又は複数の追加的な構成要素と共に）実装され；特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、このような核酸を含む１つ又は複数のベクター、例えばアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターとして実装され（「ゲノム編集システムの実装形態：送達、製剤及び投与経路」の見出しの下にある以下のセクションを参照されたい）；特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、前述のいずれかの組合せとして実装される。本明細書に記載の原理に従って動作する追加的な又は修正された実装形態は、当業者に明らかであり、本開示の範囲内である。

【０１５２】

本開示のゲノム編集システムは、単一の特定のヌクレオチド配列を標的化し得るか又は標的化し得、２つ以上のガイドＲＮＡの使用により、２つ以上の特定のヌクレオチド配列を並行して編集できることに留意すべきである。複数のｇＲＮＡの使用は、本開示を通して「多重化」と称され、関心のある複数の無関係の標的配列を標的化するため又は単一の標的ドメイン内に複数のＳＳＢ若しくはＤＳＢを形成するため、場合によりこのような標的ドメイン内で特定の編集をするために用いられ得る。例えば、参照により本明細書に援用される、Maeder et al.（「Maeder」）による国際公開第２０１５／１３８５１０号は、潜在的なスプライス部位の生成をもたらし、その結果として遺伝子の機能を低下させ又は排除する、ヒトＣＥＰ２９０遺伝子における点変異を修正する（Ｃ．２９９１＋１６５５ＡからＧへ）ためのゲノム編集システムを記載する。Maederのゲノム編集システムは、点変異の両側の（すなわちそれを挟む）配列を標的化する２つのガイドＲＮＡを利用して、変異側面に位置するＤＳＢを形成する。これは、次に、変異を含む介在配列の欠失を促進し、それによって潜在的スプライス部位を除去し、正常な遺伝子機能を回復させる。

【０１５３】

別の例として、参照により本明細書に援用される、Cotta-Ramusinoら（「Cotta-Ramusino」）による国際公開第２０１６／０７３９９０号は、「二重ニッカーゼシステム」と称される配置である、Ｃａｓ９ニッカーゼ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｄ１０Ａなどの一本鎖ニックを生じるＣａｓ９）と組み合わせて、２つのｇＲＮＡを利用するゲノム編集システムを記載する。Cotta-Ramusinoの二重ニッカーゼシステムは、１つ又は複数のヌクレオチドでオフセットされている目的の配列の逆ストランドに２つのニックを生じるように構成され、上記ニックが組み合わされて、オーバーハングを有する二本鎖切断を作り出す（の場合には５’であるが、３’オーバーハングも可能である）。オーバーハングは、次に、いくつかの状況において相同指向修復事象を促進し得る。また、別の例として、Palestrantらによる国際公開第２０１５／０７００８３号（参照により本明細書に援用される）は、Ｃａｓ９をコードするヌクレオチド配列を標的化するｇＲＮＡ（「支配ＲＮＡ」と称される）を記載し、それは、例えば、いくつかのウイルス形質導入細胞において、さもなければ構成的に発現され得るＣａｓ９の一過性発現を可能にするために、１つ又は複数の追加的なｇＲＮＡを含むゲノム編集システムに含まれ得る。これらの多重化用途は、限定的ではなく、むしろ例示的であること意図しており、当業者は、他の多重化用途が、一般に、本明細書に記載のゲノム編集システムと適合性があることを理解するであろう。

【０１５４】

本明細書で開示されるように、特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ又はＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２の１３ｎｔ標的領域に変異を導入するために使用され得る複数のｇＲＮＡを含み得る。特定の実施形態では、本明細書で開示されるゲノム編集システムは、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ及びＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２の１３ｎｔ標的領域に変異を導入するために使用される複数のｇＲＮＡを含み得る。

【０１５５】
ゲノム編集システムは、場合により、ＮＨＥＪ又はＨＤＲなどの細胞ＤＮＡ二本鎖切機序断によって修復される二本鎖切断を形成し得る。これらの機序は、文献にわたり記載されている（例えば、Davis&Maizels 2014（Ａｌｔ－ＨＤＲについて記載する）；Frit 2014（Ａｌｔ－ＮＨＥＪについて記載する）；Iyama&Wilson 2013（標準ＨＤＲ及びＮＨＥＪ経路について一般的に記載する）を参照されたい）。
【０１５６】
ゲノム編集システムがＤＳＢを形成することによって機能する場合、このようなシステムは、任意選択的に、特定の様式の二本鎖切断修復又は特定の修復結果を促進するか又は容易にする１つ又は複数の構成要素を含む。例えば、Cotta-Ramusinoは、その中に一本鎖オリゴヌクレオチド「ドナー鋳型」が付加されているゲノム編集システムも記載しており；ドナー鋳型は、ゲノム編集システムによって切断される細胞ＤＮＡの標的領域に組み込まれ、標的配列の変化をもたらし得る。
【０１５７】
特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、一本鎖又は二本鎖の切断を引き起こすことなく、標的配列を改変するか又は標的配列中若しくはその付近の遺伝子の発現を改変する。例えば、ゲノム編集システムは、ＤＮＡに作用する機能ドメインに融合したＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含み得、それによって標的配列又はその発現を改変する。一例として、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、シチジンデアミナーゼ機能ドメインに結合（例えば、融合）し得、標的化されたＣからＡへの置換を生成することによって機能し得る。例示的なヌクレアーゼ／デアミナーゼ融合体は、参照により本明細書に援用されるKomor 2016に記載される。代わりに、ゲノム編集システムは、死滅したＣａｓ９（ｄＣａｓ９）などの切断不活性化（すなわち「死滅した」）ヌクレアーゼを利用し得、細胞ＤＮＡの１つ又は複数の標的化領域上に安定な複合体を形成し、それにより、限定されるものではないが、ｍＲＮＡ転写、クロマチンリモデリングなどをはじめとする、標的領域が関与する機能を妨害することによって機能し得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、一本鎖又は二本鎖切断を引き起こすことなく、標的配列内又はその近位のＤＮＡを巻き戻すＲＮＡ誘導ヘリカーゼを含み得る。例えばゲノム編集システムは、標的配列内又はその付近に結合してＤＮＡを巻き戻し、標的配列へのアクセス性を誘導するように構成されたＲＮＡ誘導ヘリカーゼを含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、切断活性を欠くように構成された死滅ガイドＲＮＡに複合体化し、ＤＮＡの切断を引き起こすことなくＤＮＡを巻き戻せるようにし得る。
【０１５８】
<u>ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）分子</u>
「ガイドＲＮＡ」及び「ｇＲＮＡ」という用語は、細胞内のゲノム又はエピソーム配列などの標的配列に対する、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１などのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの特定の結合（又は「標的化」）を促進する任意の核酸を指す。ｇＲＮＡは、単分子（単一のＲＮＡ分子を含むか又はキメラとも称される）又はモジュール型（例えば、二重化によって通常互いに結合する、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡなどの２つ以上、典型的には２つの別々のＲＮＡ分子を含む）であり得る。ｇＲＮＡ及びそれらの構成部分は、文献にわたり記載されている（例えば、参照により援用されるBriner 2014；Cotta-Ramusinoを参照されたい）。本明細書の実施形態に従って使用され得るモジュラー及び単分子のｇＲＮＡの例としては、限定することなく、配列番号２９～３１及び３８～５１に記載される配列が挙げられる。本明細書の実施形態に従って使用され得るｇＲＮＡ近位及び尾部ドメインの例としては、限定することなく、配列番号３２～３７に記載される配列が挙げられる。
【０１５９】
細菌及び古細菌では、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムは、一般に、Ｃａｓ９などのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼタンパク質；外来配列に相補的な５’領域を含むＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）；及びｃｒＲＮＡの３’領域に相補的であり、それと二重鎖を形成する、５’領域を含むトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含む。いかなる理論にも拘

束されることは意図されないが、この二重鎖は、Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体の形成を促進し、その活性に必要であると考えられる。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムを遺伝子編集における使用に適合させる間、１つの非限定的例において、ｃｒＲＮＡ（その３’末端）及びｔｒａｃｒＲＮＡ（その５’末端）の相補的領域を架橋する４ヌクレオチド（例えば、ＧＡＡＡ）「テトラループ」又は「リンカー」配列により、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡが単一の単分子又はキメラガイドＲＮＡに連結され得ることが発見された。（Mali 2013；Jiang 2013；Jinek 2012；全て参照により本明細書に援用される）。

【０１６０】

ガイドＲＮＡは、単分又はモジュラー型を問わず、編集が望まれる細胞のゲノム中のＤＮＡ配列などの標的配列中の標的ドメインに完全に又は部分的に相補的な「標的化ドメイン」を含む。標的化ドメインは、限定されるものではないが、「ガイド配列」（Hsu 2013、参照により本明細書に援用される）、「相補的領域」（Cotta-Ramusino）、「スペーサー」（Briner 2014）及び包括的に「ｃｒＲＮＡ」（Ｊｉａｎｇ）をはじめとする文献において様々な名称で呼ばれている。それらに与えられた名称とはかかわりなく、標的化ドメインは、典型的には１０～３０ヌクレオチド長であり、特定の実施形態では１６～２４ヌクレオチド長（例えば、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３又は２４ヌクレオチド長）であり、Ｃａｓ９ ｇＲＮＡの場合には５’末端又はその付近にあり、Ｃｐｆ１ ｇＲＮＡの場合には３’末端又はその付近にある。

【０１６１】

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

【０１６２】

第１及び第２の相補的ドメインと共に、Ｃａｓ９ｇ ＲＮＡは、典型的には、インビボでヌクレアーゼ活性に関与するが、インビトロで必ずしも関与しない２つ以上の追加的な二重鎖領域を含む。（Nishimasu 2015）。第二の相補的ドメインの３’部分の付近にある第１のステムループ１は、「近位ドメイン」（Cotta-Ramusino）、「ステムループ１」（Nishimasu 2014及び2015）及び「ｎｅｘｕｓ」（Briner 2014）など、様々に呼ばれる。１つ又は複数の追加的なステムループ構造は、一般に、ｇＲＮＡの３’末端の付近に存在し、数は、種によって異なり、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）ｇＲＮＡは、典型的に２つの３’ステムループ（リピート：アンチリピート二重鎖を含む合計４つのステムループ構造：アンチリピート二重鎖）を含む一方、Ｓ．アウレウス（S. aureus）及び他の種は、単に１つのみ有する（合計３つのステムループ構造）。種毎にまとめられた保存的ステムループ構造（及びより一般的にはｇＲＮＡ構造）の説明は、Briner 2014に提供されている。

【０１６３】

前述の説明は、Ｃａｓ９と共に使用するためのｇＲＮＡに焦点を当ててきたが、ここまで記載されたものといくつかの点で異なるｇＲＮＡを利用する他のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼが存在することを理解されたい。例えば、Ｃｐｆ１（「プレボテラ属（Prevotella）及びフランシセラ属（Francicella）１」からのＣＲＩＳＰＲ）は、最近発見されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり、機能するためにｔｒａｃｒＲＮＡを必要としない。（Zetsche

2015、参照により本明細書に援用される）。Ｃｐｆ１ゲノム編集システムにおいて使用するためのｇＲＮＡは、一般に、標的化ドメイン及び相補的ドメイン（代わりに「ハンドル」と称される）を含む。Ｃｐｆ１と共に使用するためのｇＲＮＡにおいて、標的化ドメインは、通常、Ｃａｓ９ ｇＲＮＡに関して上述したように、５’末端ではなく、むしろ３’末端又はその付近に存在する（ハンドルは、Ｃｐｆ１ ｇＲＮＡの５’末端又はその付近にある）ことにも留意すべきである。Ｃｐｆ１ ｇＲＮＡの例示的な標的化ドメインは、表１３及び表１８に記載される。

【０１６４】

しかしながら、当業者は、異なる原核生物種由来のｇＲＮＡ間又はＣｐｆ１及びＣａｓ９のｇＲＮＡ間に構造上の相違が存在し得るが、ｇＲＮＡが作用する原理が概して一貫していることを理解するであろう。この動作の一貫性のため、ｇＲＮＡは、広い意味でそれらの標的化ドメイン配列によって定義され得、当業者は、所与の標的化ドメイン配列が、単分子若しくはキメラｇＲＮＡ又は１つ若しくは複数の化学修飾及び／若しくは配列修飾（置換、追加のヌクレオチド、切断など）を含むｇＲＮＡをはじめとする任意の適切なｇＲＮＡに組み込まれ得ることを理解するであろう。したがって、本開示における提示の経済性のため、ｇＲＮＡは、それらの標的化ドメイン配列の観点のみから記載され得る。

【０１６５】

より一般的には、当業者は、本開示のいくつかの態様が、複数のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを使用して実装され得るシステム、方法及び組成物に関することを理解するであろう。この理由から、別段の指定がない限り、ｇＲＮＡという用語は、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１の特定の種と適合性のｇＲＮＡだけでなく、任意のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと共に使用され得る任意の適切なｇＲＮＡを包含するものと理解されるべきである。例として、ｇＲＮＡという用語は、特定の実施形態では、ＩＩ型又はＶ型などのクラス２ ＣＲＩＳＰＲシステム又はＣＲＩＳＰＲシステムに存在する任意のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと共に又はそれに由来するか若しくはそれから適合化されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと共に使用するためのｇＲＮＡを含み得る。

【０１６６】

ｇＲＮＡ設計

標的配列の選択及び検証並びにオフターゲット分析の方法は、以前に記載されている（例えば、Mali 2013；Hsu 2013；Fu 2014；Heigwer 2014；Bae 2014；Xiao 2014を参照されたい）。これらの参考文献のそれぞれは、参照により本明細書に援用される。非限定的例として、ｇＲＮＡ設計は、例えば、ゲノム全体にわたる総オフターゲット活性を最小化するために、使用者の標的配列に対応する潜在的な標的配列の選択を最適化するためのソフトウェアツールの使用を伴い得る。オフターゲット活性は、切断に限定されないものの、各オフターゲット配列における切断効率は、例えば、実験的に導出された重み付けスキームを用いて予測され得る。これらの及び他のガイド選択方法は、Maeder及びCotta-Ramusinoに詳細に記載されている。

【０１６７】

ＨＢＧ１／２標的部位（例えば、１３ｎｔ標的領域）に向けられたｇＲＮＡ標的化ドメイン配列の選択に関して、インシリコｇＲＮＡ標的ドメイン同定ツールが利用され、ヒットは、４層に階層化された。Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）では、第１層標的化ドメインは、（１）標的部位（すなわちＨＢＧ１／２ １３ｎｔ標的領域）のいずれかの末端からの上流又は下流の距離、具体的には標的部位のいずれかの末端の４００ｂｐ以内の距離、（２）高レベルの直交性、及び（３）５’Ｇの存在に基づいて選択された。第２層標的化ドメインは、（１）標的部位（すなわちＨＢＧ１／２ １３ｎｔ標的領域）のいずれかの末端からの上流又は下流の距離、具体的には標的部位のいずれかの末端の４００ｂｐ以内の距離、及び（２）高レベルの直交性に基づいて選択された。第３層標的化ドメインは、（１）標的部位（すなわちＨＢＧ１／２ １３ｎｔ標的領域）のいずれかの末端からの上流又は下流の距離、具体的には標的部位のいずれかの末端の４００ｂｐ以内の距離、及び（２）５’Ｇの存在に基づいて選択された。第４層標的化ドメインは、標的部位（すなわち

ＨＢＧ１／２　１３ｎｔ標的領域）のいずれかの末端からの上流又は下流の距離、具体的には標的部位のいずれかの末端の４００ｂｐ以内の距離に基づいて選択された。

【０１６８】

Ｓ．アウレウス（S. aureus）では、第１層標的化ドメインは、（１）標的部位（すなわちＨＢＧ１／２　１３ｎｔ標的領域）のいずれかの末端からの上流又は下流の距離、具体的には標的部位のいずれかの末端の４００ｂｐ以内の距離、（２）高レベルの直交性、（３）５’Ｇの存在、及び（４）ＮＮＧＲＲＴ配列（配列番号２０４）を有するＰＡＭに基づいて選択された。第２層標的化ドメインは、（１）標的部位（すなわちＨＢＧ１／２　１３ｎｔ標的）のいずれかの末端からの上流又は下流の距離、具体的には標的部位のいずれかの末端の４００ｂｐ以内の距離、（２）高レベルの直交性、及び（３）ＮＮＧＲＲＴ配列（配列番号２０４）を有するＰＡＭに基づいて選択された。第３層標的化ドメインは、（１）標的部位（すなわちＨＢＧ１／２　１３ｎｔ標的領域）のいずれかの末端からの上流又は下流の距離、具体的には標的部位のいずれかの末端の４００ｂｐ以内の距離、及び（２）ＮＮＧＲＲＴ配列（配列番号２０４）を有するＰＡＭに基づいて選択された。第４層標的化ドメインは、（１）標的部位（すなわちＨＢＧ１／２　１３ｎｔ標的）のいずれかの末端からの上流又は下流の距離、具体的には標的部位のいずれかの末端の４００ｂｐ以内の距離、及び（２）ＮＮＧＲＲＶ配列（配列番号２０５）を有するＰＡＭに基づいて選択された。

【０１６９】

以下の表２は、（ａ）層（第１、２、３又は４）及び（ｂ）ＨＢＧ１又はＨＢＧ２で分類されたＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）及びＳ．アウレウス（S. aureus）のｇＲＮＡの標的化ドメインを示す。

【０１７０】

【表２】

表 2:HBG1/2 標的部位の gRNA 標的化ドメイン配列

	HBG1	HBG2
S. ピオゲネス(S. pyogenes) 第1層	251-256	760-764
第2層	257-274	765-781
第3層	275-300	275-281, 283-300
第4層	301-366	301-311, 313-342, 344-348, 350-366, 782, 783

	HBG1	HBG2
S. アウレウス(S. aureus) 第1層	367-376	784-791
第2層	343, 377-393	778, 792-803
第3層	357, 365, 394-461	357, 365, 394-461
第4層	252-254, 256, 268, 272-274, 292, 295, 347, 348, 353, 360-362, 366, 598-759	292, 295, 347, 348, 353, 360-362, 366, 462-468 476-481, 489-587, 601-607, 614-620, 640-666, 674-679, 687-693, 708-714, 733-753, 762-764, 775, 779-781, 804-901

【０１７１】

ＣＣＡＡＴボックス標的領域の改変を標的とするように設計された追加的なｇＲＮＡ配列としては、これらに限定されないが、配列番号９７０及び９７１に記載される配列が挙げられる。ＣＣＡＡＴボックス標的領域の妨害を標的とするように設計されたｇＲＮＡの標的化ドメイン配列としては、これらに限定されないが、配列番号１００２が挙げられる。ＣＣＡＡＴボックス標的領域の妨害を標的とするように設計されたｇＲＮＡの標的化ドメイン配列プラスＰＡＭ（ＵＵＵＧ）としては、これらに限定されないが、配列番号１００４が挙げられる。特定の実施形態では、配列番号１００２及び／又は１００４に記載される配列を含むｇＲＮＡは、Ｃｐｆ１タンパク質又は修飾Ｃｐｆ１タンパク質に複合体化して、ＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変を生成し得る。特定の実施形態では、表１５、表１８又は表１９に記載されるＣｐｆ１ ｇＲＮＡのいずれかを含むｇＲＮＡは、Ｃｐｆ１タンパク質又は修飾Ｃｐｆ１タンパク質に複合体化してＲＮＰ（「ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰ」）を形成し、ＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変を生成し得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｎＮＬＳ（配列番号１０００）又はＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ（配列番号１００１）であり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ－Ｃｐｆ１－ＲＮＰのＣｐｆ１分子は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５～３９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列によってコード化され得る。

【０１７２】

ｇＲＮＡは、ＢＣＬ１１Ａ（ＢＣＬ１１Ａｅ）の赤血球特異的エンハンサーを標的化して、転写リプレッサーＢＣＬ１１Ａの発現を妨害するように設計され得る（参照により本明細書に援用される、Friedlandに記載される）。ｇＲＮＡは、イントロン２の＋５８ ＤＨＳ領域にある、ＢＣＬ１１Ａの赤血球特異的エンハンサー中にあるＧＡＴＡ１結合モチーフ（すなわちＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）を標的化するように設計され、＋５８ ＤＨＳエンハンサー領域は、配列番号９６８に記載される配列を含む。ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフの妨害を標的とするように設計されたｇＲＮＡの標的化ドメイン配列としては、これらに限定されないが、配列番号９５２～９５５に記載される配列が挙げられる。ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフの妨害を標的とするように設計されたｇＲＮＡの標的化ドメイン配列プラスＰＡＭ（ＮＧＧ）としては、これらに限定されないが、配列番号９６０～９６３に記載される配列が挙げられる。

【０１７３】

ｇＲＮＡ修飾

ｇＲＮＡの活性、安定性又は他の特徴は、特定の修飾を組み込むことによって改変され得る。一例として、一過性に発現又は送達された核酸は、例えば、細胞ヌクレアーゼによる分解を起こし易いものであり得る。したがって、本明細書に記載のｇＲＮＡは、ヌクレアーゼに対して安定性を導入する１つ又は複数の修飾されたヌクレオシド又はヌクレオチドを含み得る。理論による拘束を望むものではないが、本明細書に記載の特定の修飾ｇＲＮＡは、細胞に導入された際、先天性免疫応答の低下を示し得るとも考えられている。当業者は、外因性核酸、特にウイルス又は細菌起源のものに応答して、例えば哺乳類細胞などの細胞において一般的に観察される特定の細胞応答を承知している。サイトカインの発現及び放出の誘導並びに細胞死を含み得るそのような応答は、本明細書に提示される修飾によって低下するか又は完全に排除され得る。

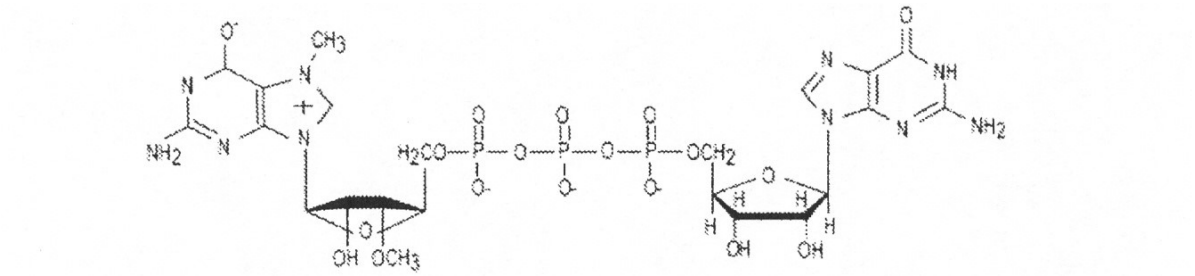
【０１７４】

このセクションで論じられる特定の例示的な修飾は、限定されるものではないが、５’末端又はその付近（例えば、５’末端の１～１０、１～５又は１～２ヌクレオチド以内）及び／又は３’末端又はその付近（例えば、３’末端の１～１０、１～５又は１～２ヌクレオチド以内）などのｇＲＮＡ配列中の任意の位置に含まれ得る。場合により、修飾は、Ｃａｓ９ ｇＲＮＡのリピート：アンチリピート二重鎖、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１ ｇＲＮＡのステムループ構造及び／又はｇＲＮＡの標的化ドメインなどの機能的モチーフ内に位置する。

【０１７５】

一例として、ｇＲＮＡの５’末端は、以下で示されるような真核生物のｍＲＮＡキャップ構造又はＧキャップ類似体（例えば、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇキャップ類似体、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇキャップ類似体又は３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ抗キャップ類似体（ＡＲＣＡ））を含み得る。

【化１】



キャップ又はキャップ類似体は、ｇＲＮＡの化学合成又はインビトロ転写中に含まれ得る。

【０１７６】

類似した路線でｇＲＮＡの５’末端には５’三リン酸基が欠如し得る。例えば、インビトロ転写ｇＲＮＡを（例えば、仔ウシ腸アルカリホスファターゼを使用することで）ホスファターゼ処理して、５’三リン酸基が除去され得る。

【０１７７】

別の一般的な修飾は、ｇＲＮＡの３’末端に、ポリＡトラクトと称される複数の（例えば、１～１０、１０～２０又は２５～２００個の）アデニン（Ａ）残基を付加することを伴う。ポリＡ配列は、ポリアデノシンポリメラーゼ（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ポリ（Ａ）ポリメラーゼ）を使用したインビトロ転写に続く化学合成中に又はMaederに記載されるようにインビボでポリアデニル化配列によってｇＲＮＡに付加され得る。

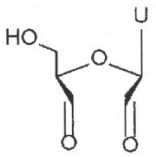
【０１７８】

本明細書に記載の修飾は、任意の適切な方法で組み合わされ得、例えばインビボでＤＮＡベクターから転写されるか、又はインビトロで転写されたｇＲＮＡは、５’キャップ構造又はキャップ類似体のいずれか又は両方と３’ポリＡ配列とを含み得ることに留意すべきである。

【０１７９】

ガイドＲＮＡは、３’末端Ｕリボースで修飾され得る。例えば、Ｕリボースの２つの末端ヒドロキシル基は、アルデヒド基に酸化され得、同時のリボース環の開環は、下に示される修飾ヌクレオシドをもたらし、

【化２】

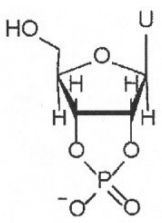


式中、「Ｕ」は、未修飾又は修飾ウリジンであり得る。

【０１８０】

３’末端Ｕリボースは、以下で示されるように２’３’環状リン酸エステルで修飾され得、

【化３】



式中、「Ｕ」は、未修飾又は修飾ウリジンであり得る。

【０１８１】

ガイドＲＮＡは、例えば、本明細書に記載の修飾ヌクレオチドの１つ又は複数を組み込むことによって分解に対して安定化され得る３’ヌクレオチドを含有し得る。特定の実施形態では、ウリジンは、例えば、5-(2-アミノ)プロピルウリジン及び5-ブロモウリジン又は本明細書に記載されるいずれかの修飾ウリジンなどの修飾ウリジンで置換され得；アデノシン及びグアノシンは、例えば、8-ブロモグアノシンなどの例えば８位が修飾された修飾アデノシン及びグアノシン又は本明細書に記載されるいずれかの修飾アデノシン又はグアノシンによって置換され得る。

【０１８２】

特定の実施形態では、糖修飾リボヌクレオチドがｇＲＮＡに組み込まれ得、例えば、２’ＯＨ基は、Ｈ、－ＯＲ、－Ｒ（式中、Ｒは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール又は糖であり得る）、ハロ、－ＳＨ、－ＳＲ（式中、Ｒは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール又は糖であり得る）、アミノ（式中、アミノは、例えば、NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ又はアミノ酸であり得る）；又はシアノ（－ＣＮ）から選択される基によって置換される。特定の実施形態では、リン酸骨格は、例えば、ホスホロチオエート（ＰｈＴｘ）基で、本明細書に記載されるように修飾され得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡのヌクレオチドの１つ又は複数は、それぞれ独立して、2'-Ｏ-メチル、2'-Ｏ-メトキシエチルなどの２’－糖修飾又は例えば2’-Ｆ若しくは2'-Ｏ-メチル、アデノシン（Ａ）、2’-Ｆ若しくは2'-Ｏ-メチル、シチジン（Ｃ）、2’-Ｆ若しくは2'-Ｏ-メチル、ウリジン（Ｕ）、2’-Ｆ若しくは2'-Ｏ-メチル、チミジン（Ｔ）1,2’-Ｆ若しくは2'-Ｏ-メチル、グアノシン（Ｇ）をはじめとする2’-フルオロ修飾、2'-Ｏ-メトキシエチル-5-メチルウリジン（Ｔｅｏ）、2'-Ｏ-メトキシエチルアデノシン（Ａｅｏ）、2'-Ｏ-メトキシエチル-5-メチルシチジン（ｍ５Ｃｅ０）及びそれらの任意の組み合わせをはじめとするが、これに限定されるものではない修飾又は未修飾ヌクレオチドであり得る。

【０１８３】

ガイドｇＲＮＡは、「ロックド」核酸（ＬＮＡ）も含み得、ここで、２’ＯＨ基は、例えば、同一リボース糖の４’炭素へのＣ１～６アルキレン又はＣ１～６ヘテロアルキレン架橋によって結合され得る。このような架橋を提供するために、限定されるものではないが、メチレン、プロピレン、エーテル又はアミノ架橋；Ｏ－アミノ（式中、アミノは、例えば、NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン又はポリアミノであり得る）及びアミノアルコキシ又はＯ（CH_2）$_n$－アミノ（式中、アミノは、例えば、NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン又はポリアミノであり得る）をはじめとする任意の適切な部分が使用され得る。

【０１８４】

特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、多環である修飾ヌクレオチド（例えば、トリシクロ；及びグリコール核酸（ＧＮＡ）などの「アンロックド」形態（例えば、その中でリボースがリン酸ジエステル結合に付着するグリコール単位で置換される、Ｒ－ＧＮＡ又はＳ－ＧＮＡ）又はトレオース核酸（その中でリボースがα-L-トレオフラノシル-(3’→2’)で置換されるＴＮＡ）を含み得る。

【０１８５】

一般に、ｇＲＮＡは、酸素を有する５員環の糖類であるリボースを含む。代表的な修飾ｇＲＮＡとしては、限定されるものではないが、リボース中の酸素の置換（例えば、硫黄（Ｓ）、セレン（Ｓｅ）又は例えばメチレン又はエチレンなどのアルキレンによる）；二重結合の付加（例えば、リボースをシクロペンテニル又はシクロヘキセニルで置換する）

；リボース環縮小（例えば、シクロブタン又はオキセタンの４員環を形成する）；リボース環拡大（例えば、アンヒドロヘキシトール、アルトリトール、マンニトール、シクロヘキサニル、シクロヘキセニル及びホスホロアミダート骨格も有するモルホリノなどの追加的な炭素又はヘテロ原子を有する６又は７員環を形成する）が挙げられる。糖類似体改変の大部分は、２’位に局在するが、４’位をはじめとする他の部位も修飾を受け入れ易い。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、４’-S、４’-Se又は4’-C-アミノメチル-2'-O-Ｍｅ修飾を含む。

【０１８６】

特定の実施形態では、例えば、7-デアザ-アデノシンなどのデアザヌクレオチドがｇＲＮＡに組み込まれ得る。特定の実施形態では、例えばN6-メチルアデノシンなどのO-及びN-アルキル化ヌクレオチドがｇＲＮＡに組み込まれ得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ中の１つ又は複数の又は全てのヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドである。

【０１８７】

特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、本明細書の用法では、修飾又は未修飾ｇＲＮＡであり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、１つ又は複数の修飾を含み得る。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ホスホロチオエート結合修飾、ホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、2'-O-メチル修飾又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端又はそれらの組み合わせにあり得る。

【０１８８】

特定の実施形態では、ｇＲＮＡ修飾は、１つ又は複数のホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾を含み得る。

【０１８９】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、本明細書では「ＤＮＡ延長」とも称される１つ若しくは複数又は一続きのデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）塩基を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端又はそれらの組み合わせにＤＮＡ延長を含む。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、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、９９又は１００ＤＮＡ塩基長であり得る。例えば、特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、１、２、３、４、５、１０、１５、２０又は２５ＤＮＡ塩基長であり得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）又はチミン（Ｔ）から選択される１つ又は複数のＤＮＡ塩基を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、同一のＤＮＡ塩基を含む。例えば、ＤＮＡ延長は、一続きのアデニン（Ａ）塩基を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、一続きのチミン（Ｔ）塩基を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、異なるＤＮＡ塩基の組み合わせを含む。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。例えば、ＤＮＡ延長は、配列番号１２３５～１２５０に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ＤＮＡ延長及び１つ若しくは複数のホスホロチオエート結合修飾、１つ若しくは複数のホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、１つ若しくは複数の2'-O-メチル修飾又はそれらの組み合わせを含む。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端又はそれらの組み合わせにあり得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長を含むｇＲＮＡは、ＤＮＡ延長を含む表１９に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長を含むｇＲＮＡは、配列番号１０５１に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長を

含むｇＲＮＡは、配列番号：１０４６～１０６０、１０６７、１０６８、１０７４、１０７５、１０７８、１０８１～１０８４、１０８６～１０８７、１０８９～１０９０、１０９２～１０９３、１０９８～１１０２及び１１０６からなる群から選択される配列を含み得る。理論による拘束を望むものではないが、ｇＲＮＡによって標的化される標的核酸とハイブリッド形成せず、またこのようなＤＮＡ延長を含まないｇＲＮＡと比較して標的核酸部位における編集の増加を示す限り、本明細書では任意のＤＮＡ延長が使用され得ることが想定される。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、本明細書では「ＲＮＡ延長」とも称される１つ若しくは複数又は一続きのリボ核酸（ＲＮＡ）塩基を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端又はそれらの組み合わせにＲＮＡ延長を含む。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、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、９９又は１００ＲＮＡ塩基長であり得る。例えば、特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、１、２、３、４、５、１０、１５、２０又は２５ＲＮＡ塩基長であり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、アデニン（ｒＡ）、グアニン（ｒＧ）、シトシン（ｒＣ）又はウラシル（ｒＵ）から選択される１つ又は複数のＲＮＡ塩基を含み得、ここで、「ｒ」は、ＲＮＡ、2’-ヒドロキシを表す。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、同一ＲＮＡ塩基を含む。例えば、ＲＮＡ延長は、一続きのアデニン（ｒＡ）塩基を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、異なるＲＮＡ塩基の組み合わせを含む。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、表２４に記載される配列を含み得る。例えば、ＲＮＡ延長は、１２３１～１２３４、１２５１～１２５３に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ＲＮＡ延長並びに１つ又は複数のホスホロチオエート結合修飾、１つ又は複数のホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、１つ又は複数の2'-O-メチル修飾又はそれらの組み合わせを含む。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端又はそれらの組み合わせにあり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長を含むｇＲＮＡは、ＲＮＡ延長を含む表１９に記載される配列を含み得る。ｇＲＮＡの５’末端にＲＮＡ延長を含むｇＲＮＡは、配列番号１０４２～１０４５、１１０３～１１０５からなる群から選択される配列を含み得る。ｇＲＮＡの３’末端にＲＮＡ延長を含むｇＲＮＡは、配列番号１０７０～１０７５、１０７９、１０８１、１０９８～１１００からなる群から選択される配列を含み得る。

【０１９１】

本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ＲＮＡ延長及びＤＮＡ延長も含み得ることが想定される。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長及びＤＮＡ延長のいずれもｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端又はそれらの組み合わせにあり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、ｇＲＮＡの５’末端にあり、ＤＮＡ延長は、ｇＲＮＡの３’末端にある。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、ｇＲＮＡの３’末端にあり、ＤＮＡ延長は、ｇＲＮＡの５’末端にある。

【０１９２】

いくつかの実施形態では、３’末端のホスホロチオエート修飾及び５’末端のＤＮＡ延長の両方を含むｇＲＮＡは、例えば、Ｃｐｆ１などのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼに複合体化してＲＮＰを形成し、これは、次に、ＨＢＧ遺伝子座で生体外の（すなわちこのような細胞が由来する対象の体外の）造血幹細胞（ＨＳＣ）又はＣＤ３４＋細胞を編集するために使用される。

【０１９３】
本明細書の用法では、ｇＲＮＡの一例は、配列番号１０５１に記載される配列を含む。
【０１９４】
死滅ｇＲＮＡ分子
本開示に従った死滅ガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）分子としては、減少した、低い又は検出不能な切断活性を有する死滅ガイドＲＮＡ分子が挙げられる。死滅ガイドＲＮＡ標的化ドメイン配列は、活性ガイドＲＮＡの標的化ドメイン配列と比較して長さが１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０ヌクレオチド短い。特定の実施形態では、死滅ガイドＲＮＡ分子は、１５ヌクレオチド以下の長さ、１４ヌクレオチド以下の長さ、１３ヌクレオチド以下の長さ、１２ヌクレオチド以下の長さ又は１１ヌクレオチド以下の長さを含む標的化ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、死滅ガイドＲＮＡは、それらがＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ切断事象を提供しないように構成される。死滅ガイドＲＮＡは、短縮型標的化ドメイン配列をもたらす、ｇＲＮＡ標的化ドメイン配列の５’末端の除去によって生成され得る。例えば、切断事象を提供するように構成されたｇＲＮＡ配列（すなわち長さが１７ヌクレオチド以上）が、長さが２０ヌクレオチドである標的化ドメイン配列を有する場合、ｇＲＮＡ配列の５’末端から５ヌクレオチドを除去することにより、死滅ガイドＲＮＡが生成され得る。例えば、本明細書で使用されるｄｇＲＮＡは、ｇＲＮＡ配列の５’末端から切り詰められて、１５ヌクレオチド以下の長さを含む、表２又は表１０に記載される標的化ドメインを含み得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、編集されるべき標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）内又はその近位の核酸配列に結合（又は会合）するように構成され得る。例えば、表１０に記載のｄｇＲＮＡのいずれかを使用して、１３ｎｔ標的領域又はＣＣＡＡＴボックス標的領域の近位の核酸配列に結合させ得る。特定の実施形態では、近位とは、標的領域（例えば、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、１３ｎｔ標的領域、近位ＨＢＧ１／２プロモーター標的配列及び／又はＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ）の１０、２５、５０、１００又は２００ヌクレオチド以内の領域を示し得る。特定の実施形態では、死滅ガイドＲＮＡは、標的領域に外因的トランス作用因子を動員するように構成されていない。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼに複合体化した際にＤＮＡ切断事象を提供しないように構成される。当業者は、死滅ガイドＲＮＡ分子が標的核酸中の標的領域の近位の又はその中の領域に相補的な標的化ドメインを含むように設計され得ることを理解するであろう。特定の実施形態では、死滅ガイドＲＮＡは、二本鎖ＤＮＡの転写鎖又は非転写鎖に相補的な標的化ドメイン配列を含む。本明細書のｄｇＲＮＡは、本明細書の「ｇＲＮＡ修飾」のセクションでガイドＲＮＡについて記載されるように、ｇＲＮＡの５’及び３’末端に修飾を含み得る。例えば、特定の実施形態では、死滅ガイドＲＮＡは、ＲＮＡの５’末端にアンチリバースキャップ類似体（ＡＲＣＡ）を含み得る。特定の実施形態では、ｄｇＲＮＡは、３’末端にポリＡ尾部を含み得る。
【０１９５】
特定の実施形態では、本明細書で開示されるゲノム編集システム及び方法による死滅ガイドＲＮＡの使用は、活性ガイドＲＮＡの全編集レベルを増加させ得る。特定の実施形態では、本明細書で開示されるゲノム編集システム及び方法による死滅ガイドＲＮＡの使用は、欠失の頻度を増加させ得る。特定の実施形態では、欠失は、活性ガイドＲＮＡの切断部位から死滅ガイドＲＮＡ結合部位に向けて延び得る。このようにして、死滅ガイドＲＮＡは、活性ガイドＲＮＡの方向性を変化させ、所望の標的領域に向けて編集を方向付け得る。
【０１９６】
本明細書の用法では、「死滅ｇＲＮＡ」及び「短縮型ｇＲＮＡ」という用語は、同義的に使用される。
【０１９７】
ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ

本開示に従ったＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとしては、Ｃａｓ９及びＣｐｆ１などの自然発生のクラス２　ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ並びにそれらから誘導される又は得られる他のヌクレアーゼが挙げられるが、これらに限定されない。また、Ｃａｓ９などの特定のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、核酸を巻き戻せるようにするヘリカーゼ活性も有することが示されている。特定の実施形態では、本開示に従ったＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、本明細書及び上の「ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ」と題されたセクションに記載されるＲＮＡ－ヌクレアーゼのいずれであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、標的領域に外因的トランス作用因子を動員するように構成されていない。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、ヌクレアーゼ活性を欠くように構成されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得る。例えば、特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヘリカーゼは、ヌクレアーゼ活性を欠くが、そのヘリカーゼ活性をなおも維持する、触媒能のないＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、変異されて、そのヌクレアーゼ活性が消滅され得（例えば、死滅Ｃａｓ９）、核酸を切断することができないが、なおもＤＮＡを巻き戻し得る触媒能のないＲＮＡ誘導ヌクレアーゼが生成される。特定の実施形態では、本明細書に記載されるような死滅ガイドＲＮＡのいずれかに複合体化したＲＮＡ誘導ヘリカーゼであり得る。例えば、触媒活性ＲＮＡ誘導ヘリカーゼ（例えば、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１）は、死滅ガイドＲＮＡとＲＮＰ複合体を形成し、触媒能のない死滅ＲＮＰ（ｄＲＮＰ）をもたらし得る。特定の実施形態では、触媒能のないＲＮＡ誘導ヘリカーゼ（例えば、死滅Ｃａｓ９）及び死滅ガイドＲＮＡは、ｄＲＮＰを形成し得る。これらのｄＲＮＰは、切断事象を提供することができないが、核酸の巻き戻しに重要なヘリカーゼ活性をなおも維持する。

【０１９８】

機能的には、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、（ａ）ｇＲＮＡと相互作用し（例えば、複合体形成し）；及び（ｂ）ｇＲＮＡと一緒に、（ｉ）ｇＲＮＡの標的化ドメインに相補的な配列、及び任意選択的に（ｉｉ）下でより詳細に記載される、「プロトスペーサー隣接モチーフ」又は「ＰＡＭ」と称される追加的な配列を含むＤＮＡの標的領域と結合し、任意選択的に切断又は修飾するヌクレアーゼとして定義される。以下の実施例が例証するように、同一ＰＡＭ特異性又は切断活性を共有する個々のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ間に変動が存在し得るとしても、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、広い意味でそれらのＰＡＭ特異性及び切断活性によって定義され得る。当業者は、本開示のいくつかの態様が、特定のＰＡＭ特異性及び／又は切断活性を有する任意の適切なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを使用して実装され得るシステム、方法及び組成物に関することを理解するであろう。この理由から、別段の指定がない限り、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼという用語は、総称として理解されるべきであり、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼのいかなる特定の型（例えば、Ｃａｓ９と対比したＣｐｆ１）、種（例えば、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）と対比したＳ．アウレウス（S. aureus））又はバリエーション（例えば、完全長と対比した短縮型又は分割；天然ＰＡＭ特異性と対比した操作されたＰＡＭ特異性など）にも限定されない。

【０１９９】

様々なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ＰＡＭとプロトスペーサーとの間の異なる配列関係を必要とし得る。一般に、Ｃａｓ９は、プロトスペーサーの３’であるＰＡＭ配列を認識する。他方、Ｃｐｆ１は、一般にプロトスペーサーの５’であるＰＡＭ配列を認識する。

【０２００】

ＰＡＭ及びプロトスペーサーの特定の配列の向きを認識することに加えて、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、特定のＰＡＭ配列も認識し得る。例えば、Ｓ．アウレウス（S. aureus）Ｃａｓ９は、ＮＮＧＲＲＴ又はＮＮＧＲＲＶのＰＡＭ配列を認識し、ここで、Ｎ残基は、ｇＲＮＡ標的化ドメインによって認識される領域の３’に隣接する。Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９は、ＮＧＧ　ＰＡＭ配列を認識する。また、Ｆ．ノビシダ（F. novicida）Ｃｐｆ１は、ＴＴＮ　ＰＡＭ配列を認識する。ＰＡＭ配列は、様々なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼについて同定されており、新規ＰＡＭ配列を同定するためのストラテジーは、Shmakov 2015によって記載されている。操作されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、参照分

子のＰＡＭ特異性と異なるＰＡＭ特異性を有し得ることにも留意すべきである（例えば、操作されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの場合、参照分子は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼがそれに由来する天然に存在する変異型であり得るか、又は操作されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとの最大アミノ酸配列相同性を有する天然に存在する変異型であり得る）。本明細書の実施形態に従って使用され得るＰＡＭの例としては、限定することなく、配列番号１９９～２０５に記載される配列が挙げられる。

【０２０１】

それらのＰＡＭ特異性に加えて、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、それらのＤＮＡ切断活性によって特徴付けられ得、天然ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、典型的には標的核酸中でＤＳＢを形成するが、ＳＳＢのみを生じるか又は全く切断しない、操作された変異型が生成されている（上記及び参照により本明細書に援用されるRan&Hsu 2013において論じられている）。

【０２０２】

Ｃａｓ９

結晶構造は、単分子ガイドＲＮＡ及び標的ＤＮＡと複合体形成したＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９（Jinek 2014）及びＳ．アウレウス（S. aureus）Ｃａｓ９について決定されている（Nishimasu 2014；Anders 2014及びNishimasu 2015）。

【０２０３】

自然発生のＣａｓ９タンパク質は、認識（ＲＥＣ）ローブ及びヌクレアーゼ（ＮＵＣ）ローブの２つのローブを含み、そのそれぞれは、特定の構造ドメイン及び／又は機能ドメインを含む。ＲＥＣローブは、アルギニンに富む架橋らせん（ＢＨ）ドメイン及び少なくとも１つのＲＥＣドメイン（例えば、ＲＥＣ１ドメイン、任意選択的にＲＥＣ２ドメイン）を含む。ＲＥＣローブは、他の既知のタンパク質と構造的類似性を共有せず、独特の機能ドメインであることが示唆される。いかなる理論による拘束も望まないが、変異解析は、ＢＨ及びＲＥＣドメインの特定の機能的役割を示唆する。ＢＨドメインは、ｇＲＮＡ：ＤＮＡ認識において役割を果たすようである一方、ＲＥＣドメインは、ｇＲＮＡのリピート：アンチリピート二重鎖と相互作用し、Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体の形成を媒介すると考えられている。

【０２０４】

ＮＵＣローブは、ＲｕｖＣドメイン、ＨＮＨドメイン及びＰＡＭ相互作用（ＰＩ）ドメインを含む。ＲｕｖＣドメインは、レトロウイルスインテグラーゼスーパーファミリーメンバーとの構造的類似性を共有し、標的核酸の非相補的（すなわち下部）鎖を切断する。それは、２つ以上の分割ＲｕｖＣモチーフ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）及びＳ．アウレウス（S. aureus）中のＲｕｖＣＩ、ＲｕｖＣＩＩ及びＲｕｖＣＩＩＩなど）から形成され得る。一方、ＨＮＨドメインは、ＨＮＮエンドヌクレアーゼモチーフと構造的に類似しており、標的核酸の相補的（すなわち上部）鎖を切断する。その名前が示唆するように、ＰＩドメインは、ＰＡＭ特異性に寄与する。本明細書の実施形態に従って使用され得る、Ｃａｓ９ ＲｕｖＣ様及びＣａｓ９ ＨＮＨ様ドメインをコード化するポリペプチド配列の例は、配列番号１５～２３、５２～１２３（ＲｕｖＣ様ドメイン）及び配列番号２４～２８、１２４～１９８（ＨＮＨ様ドメイン）に記載される。

【０２０５】

Ｃａｓ９の特定の機能は、（それによって必ずしも完全に決定されるわけではないが）上記の特定のドメインに関連づけられている一方、これらの及び他の機能は、他のＣａｓ９ドメイン又はいずれかのローブ上の複数のドメインによって媒介又は影響され得る。例えば、Nishimasu 2014に記載されるように、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９では、ｇＲＮＡのリピート：アンチリピート二重鎖がＲＥＣとＮＵＣローブとの間の溝に入り、二重鎖中のヌクレオチドがＢＨ、ＰＩ及びＲＥＣドメイン中のアミノ酸と相互作用する。第２の及び第３のステムループ内のいくつかのヌクレオチド（ＲｕｖＣ及びＰＩドメイン）がそうであるように、第１のステムループ構造内のいくつかのヌクレオチドは、複数のドメイン（ＰＩ、ＢＨ及びＲＥＣ１）内のアミノ酸とも相互作用する。本明細書の

実施形態に従って使用され得るＣａｓ９分子をコード化するポリペプチド配列の例は、配列番号１～２、４～６、１２及び１４に記載される。

【０２０６】

Ｃｐｆ１

ｃｒＲＮＡと、ＴＴＴＮ　ＰＡＭ配列などの二本鎖（ｄｓ）ＤＮＡ標的と複合体形成したアシダミノコッカス属（Acidaminococcus）種Ｃｐｆ１の結晶構造は、Yamano 2016（参照により本明細書に援用される）によって解析されている。Ｃａｓ９と同様に、Ｃｐｆ１には、ＲＥＣ（認識）ローブとＮＵＣ（ヌクレアーゼ）ローブの２つのローブがある。ＲＥＣローブは、ＲＥＣ１及びＲＥＣ２ドメインを含み、これらは、いかなる既知のタンパク質構造とも類似性がない。一方、ＮＵＣローブは、３つのＲｕｖＣドメイン（ＲｕｖＣ－Ｉ、－ＩＩ及び－ＩＩＩ）と１つのＢＨドメインとを含む。しかし、Ｃａｓ９とは対照的に、Ｃｐｆ１　ＲＥＣローブは、ＨＮＨドメインを欠いており、既知のタンパク質構造との類似性を欠く他のドメイである、構造的にユニークなＰＩドメインと、３つのウェッジ（ＷＥＤ）ドメイン（ＷＥＤ－Ｉ、－ＩＩ及び－ＩＩＩ）と、ヌクレアーゼ（Ｎｕｃ）ドメインとを含む。

【０２０７】

Ｃａｓ９及びＣｐｆ１は、構造及び機能において類似性を共有する一方、特定のＣｐｆ１活性は、いずれのＣａｓ９ドメインにも類似していない構造ドメインによって媒介されることを理解すべきである。例えば、標的ＤＮＡの相補鎖の切断は、Ｃａｓ９のＨＮＨドメインと配列的及び空間的に異なるＮｕｃドメインによって媒介されるようである。さらに、Ｃｐｆ１ ｇＲＮＡの非標的化部分（ハンドル）は、Ｃａｓ９ ｇＲＮＡ中のリピート：アンチリピート二重鎖によって形成されるステムループ構造ではなく、むしろ偽結び目構造を取る。

【０２０８】

特定の実施形態では、Ｃｐｆ１タンパク質は、修飾Ｃｐｆ１タンパク質であり得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、１つ又は複数の修飾を含み得る。特定の実施形態では、修飾は、限定することなく、Ｃｐｆ１ヌクレオチド配列又はＣｐｆ１アミノ酸配列中の１つ又は複数の変異、Ｈｉｓタグ又は核局在化シグナル（ＮＬＳ）などの１つ又は複数の追加的な配列又はそれらの組み合わせであり得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１は、本明細書でＣｐｆ１変異型とも称され得る。

【０２０９】

特定の実施形態では、Ｃｐｆ１タンパク質は、アシダミノコッカス属（Acidaminococcus）種株ＢＶ３Ｌ６　Ｃｐｆ１タンパク質（ＡｓＣｐｆ１）、ラクノスピラ菌（Lachnospiraceae bacterium）ＮＤ２００６　Ｃｐｆ１タンパク質（ＬｂＣｐｆ１）及びラクノスピラ菌（Lachnospiraceae bacterium）ＭＡ２０２０（Ｌｂ２Ｃｐｆ１）からなる群から選択されるＣｐｆ１タンパク質に由来し得る。特定の実施形態では、Ｃｐｆ１タンパク質は、それぞれ配列番号１０１９～１０２１のコドン最適化核酸配列を有する、配列番号１０１６～１０１８からなる群から選択される配列を含み得る。

【０２１０】

特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含み得る。例えば、限定されるものではないが、本明細書で開示される方法及び組成物に関連して有用なＮＬＳ配列は、細胞核へのタンパク質移入を促進できるアミノ酸配列を含むであろう。本明細書で開示される方法及び組成物に関連して有用なＮＬＳ配列は、当技術分野で公知である。このようなＮＬＳ配列の例としては、アミノ酸配列：ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号１００６）を有するヌクレオプラスミンＮＬＳ及びアミノ酸配列ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号１００７）を有するシミアンウイルス４０「ＳＶ４０」ＮＬＳが挙げられる。

【０２１１】

特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質のＮＬＳ配列は、Ｃｐｆ１タンパク質配列のＣ末端又はその近傍に配置される。例えば、限定されるものではないが、修飾Ｃｐｆ

１タンパク質は、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｎＮＬＳ（配列番号１０００）；Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ（配列番号１００８）；及びＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ（配列番号１００１）から選択され得、式中、「Ｈｉｓ」は、6-ヒスチジン精製配列を指し、「ＡｓＣｐｆ１」は、アシダミノコッカス属（Acidaminococcus）種Ｃｐｆ１タンパク質配列を指し、「ｎＮＬＳ」は、ヌクレオプラスミンＮＬＳを指し、「ｓＮＬＳ」は、ＳＶ４０　ＮＬＳを指す。例えば、２つ以上のｎＮＬＳ配列の付加又はｎＮＬＳ及びｓＮＬＳ配列の組み合わせ（又は他のＮＬＳ配列）の付加並びに例えば6-ヒスチジン配列などの精製配列を含む又は含まない配列の付加などのＮＬＳ配列の同一性及びＣ末端位置の追加的な順列は、現在開示されている主題の範囲内である。

【０２１２】

特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質のＮＬＳ配列は、Ｃｐｆ１タンパク質配列のＮ末端又はその近傍に配置され得る。例えば、限定されるものではないが、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｈｉｓ－ｓＮＬＳ－ＡｓＣｐｆ１（配列番号１００９）、Ｈｉｓ－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ－ＡｓＣｐｆ１（配列番号１０１０）及びｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ－ＡｓＣｐｆ１（配列番号１０１１）から選択され得る。例えば、２つ以上のｎＮＬＳ配列の付加又はｎＮＬＳ及びｓＮＬＳ配列の組み合わせ（又は他のＮＬＳ配列）の付加並びに例えば6-ヒスチジン配列などの精製配列を含む又は含まない配列の付加などのＮＬＳ配列の同一性及びＮ末端位置の追加的な順列は、現在開示されている主題の範囲内である。

【０２１３】

特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｃｐｆ１タンパク質配列のＮ末端及びＣ末端の両方又はその近傍に位置するＮＬＳ配列を含み得る。例えば、限定されるものではないが、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｈｉｓ－ｓＮＬＳ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ（配列番号１０１２）及びＨｉｓ－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ（配列番号１０１３）から選択され得る。例えば、２つ以上のｎＮＬＳ配列又はｎＮＬＳ及びｓＮＬＳ配列の組み合わせ（又は他のＮＬＳ配列）のＮ末端／Ｃ末端位置のいずれかへの付加並びに例えば6-ヒスチジン配列などの精製配列を含む又は含まない配列の付加などのＮＬＳ配列の同一性及びＮ末端／Ｃ末端位置の追加的な順列は、現在開示されている主題の範囲内である。

【０２１４】

特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｃｐｆ１タンパク質配列の１つ又は複数のシステイン残基に改変（例えば、欠失又は置換）を含み得る。例えば、限定されるものではないが、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｃ６５、Ｃ２０５、Ｃ３３４、Ｃ３７９、Ｃ６０８、Ｃ６７４、Ｃ１０２５及びＣ１２４８からなる群から選択される位置に改変を含み得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、セリン又はアラニンの１つ又は複数のシステイン残基の置換を含み得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｃ６５Ｓ、Ｃ２０５Ｓ、Ｃ３３４Ｓ、Ｃ３７９Ｓ、Ｃ６０８Ｓ、Ｃ６７４Ｓ、Ｃ１０２５Ｓ及びＣ１２４８Ｓからなる群から選択される改変を含み得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｃ６５Ａ、Ｃ２０５Ａ、Ｃ３３４Ａ、Ｃ３７９Ａ、Ｃ６０８Ａ、Ｃ６７４Ａ、Ｃ１０２５Ａ及びＣ１２４８Ａからなる群から選択される改変を含み得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、位置Ｃ３３４及びＣ６７４又はＣ３３４、Ｃ３７９及びＣ６７４に改変を含み得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｃ３３４Ｓ及びＣ６７４Ｓ又はＣ３３４Ｓ、Ｃ３７９Ｓ及びＣ６７４Ｓの改変を含み得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｃ３３４Ａ及びＣ６７４Ａ又はＣ３３４Ａ、Ｃ３７９Ａ及びＣ６７４Ａの改変を含み得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、例えば、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｎＮＬＳ　Ｃｙｓ－ｌｅｓｓ（配列番号１０１４）又はＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｎＮＬＳ　Ｃｙｓ－ｌｏｗ（配列番号１０１５）などの１つ又は複数のシステイン残基改変並びに１つ又は複数のＮＬＳ配列の導入の両方を含み得る。様々な実施形態では、１つ又は複数のシステイン残基の欠失又は置換を含むＣｐｆ１タンパク質は、凝集の減少を示す。

【０２１５】

特定の実施形態では、当技術分野で公知の他の修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、本明細書に記載される方法及びシステムと共に使用され得る。例えば、特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１は、変異Ｓ５４２Ｒ／Ｋ５４８Ｖ／Ｎ５５２Ｒを含有するＣｐｆ１（「Ｃｐｆ１ＲＶＲ」）であり得る。Ｃｐｆ１　ＲＶＲは、ＴＡＴＶ　ＰＡＭを有する標的部位を切断することが示されている。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１は、変異Ｓ５４２Ｒ／Ｋ６０７Ｒを含有するＣｐｆ１（「Ｃｐｆ１　ＲＲ」）であり得る。Ｃｐｆ１　ＲＲは、ＴＹＣＶ／ＣＣＣＣ　ＰＡＭを有する標的部位を切断することが示されている。

【０２１６】

いくつかの実施形態では、Ｃｐｆ１変異型が本明細書で使用され、ここで、Ｃｐｆ１変異型は、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、３４、３６、３９、４０、４３、４６、４７、５０、５４、５７、５８、１１１、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、５３２、５３３、５３４、５３５、５３６、５３７、５３８、５３９、５４０、５４１、５４２、５４３、５４４、５４５、５４６、５４７、５４８、５４９、５５０、５５１、５５２、５５３、５５４、５５５、５５６、５６５、５６６、５６７、５６８、５６９、５７０、５７１、５７２、５７３、５７４、５７５、５９２、５９３、５９４、５９５、５９６、５９７、５９８、５９９、６００、６０１、６０２、６０３、６０４、６０５、６０６、６０７、６０８、６０９、６１０、６１１、６１２、６１３、６１４、６１５、６１６、６１７、６１８、６１９、６２０、６２６、６２７、６２８、６２９、６３０、６３１、６３２、６３３、６３４、６３５、６３６、６３７、６３８、６４２、６４３、６４４、６４５、６４６、６４７、６４８、６４９、６５１、６５２、６５３、６５４、６５５、６５６、６７６、６７９、６８０、６８２、６８３、６８４、６８５、６８６、６８７、６８８、６８９、６９０、６９１、６９２、６９３、７０７、７１１、７１４、７１５、７１６、７１７、７１８、７１９、７２０、７２１、７２２、７３９、７６５、７６８、７６９、７７３、７７７、７７８、７７９、７８０、７８１、７８２、７８３、７８４、７８５、７８６、８７０、８７１、８７２、８７３、８７４、８７５、８７６、８７７、８７８、８７９、８８０、８８１、８８２、８８３、８８４若しくは１０４８又はＡｓＣｐｆ１のオルソログ、ホモログ若しくは変異型の対応する位置からなる群から選択されるＡｓＣｐｆ１（アシダミノコッカス属（Acidaminococcus）種ＢＶ３Ｌ６）の１つ又は複数の残基に変異を含む。

【０２１７】

特定の実施形態では、Ｃｐｆ１変異型は、本明細書の用法では、参照により本明細書に援用される、Zhang et al.による国際公開第２０１７／１８４７６８号（「’７６８公開」）に記載されるＣｐｆ１タンパク質のいずれかを含み得る。

【０２１８】

特定の実施形態では、本明細書で使用される修飾Ｃｐｆ１タンパク質（Ｃｐｆ１変異型とも称される）は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５－３９、１０９４～１０９７、１１０７～０９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１、１１１０～１７（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列のいずれかによってコード化され得る。表２０は、例示的なＣｐｆ１変異型アミノ酸及びヌクレオチド配列を記載する。これらの配列は、6-ヒスチジン配列（下線付き文字）及びＮＬＳ配列（太字）の位置を詳細に示す図６２に記載される。例えば、２つ以上のｎＮＬＳ配列又はｎＮＬＳ及びｓＮＬＳ配列組み合わせ（又は他のＮＬＳ配列）のＮ末端／Ｃ末端位置のいずれかへの付加並びに例えば6-ヒスチジン配列などの精製配列を含む又は含まない配列の付加などのＮＬＳ配列の同一性及びＮ末端／Ｃ末端位置の追加的な順列は、現在開示されている主題の範囲内である。

【０２１９】

特定の実施形態では、本明細書で開示されるＣｐｆ１タンパク質又は修飾Ｃｐｆ１タン

パク質のいずれかは、配列番号１００２及び／又は１００４に記載される標的化ドメインを含む１つ又は複数のｇＲＮＡに複合体化して、ＣＣＡＡＴボックス標的領域を改変し得る。特定の実施形態では、本明細書で開示されるＣｐｆ１タンパク質又は修飾Ｃｐｆ１タンパク質のいずれかは、表１８又は表１９に記載される配列を含む１つ又は複数のｇＲＮＡに複合体化し得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｎＮＬＳ（配列番号１０００）又はＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ（配列番号１００１）であり得る。特定の実施形態では、本明細書で使用される修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５～３９、１０９４～１０９７、１１０７～０９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１、１１１０～１７（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列のいずれかによってコード化され得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、配列番号１０９７に記載される配列を含み得る。

【０２２０】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの修飾

上述したＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、様々な用途に有用であり得る活性及び特性を有するが、当業者は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼも、場合により修飾されて、切断活性、ＰＡＭ特異性又は他の構造的若しくは機能的特徴が改変され得ることを認識するであろう。

【０２２１】

まず、切断活性を改変する修飾に目を向けると、ＮＵＣローブ内のドメインの活性を低減又は排除する変異が上に記載されている。ＲｕｖＣドメイン、Ｃａｓ９ ＨＮＨドメイン又はＣｐｆ１ Ｎｕｃドメインに生成され得る例示的な変異は、Ran&Hsu 2013及びYamano並びにCotta-Ramusinoに記載されている。一般に、２つのヌクレアーゼドメインの１つの活性を低減又は排除する変異は、ニッカーゼ活性を有するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをもたらすが、ニッカーゼ活性の種類は、いずれのドメインが不活性化されるかによって変化することに留意すべきである。一例として、Ｃａｓ９のＲｕｖＣドメインの不活性化は、以下に示されるように（ここで、Ｃは、切断の部位を示す）、相補鎖又は上部鎖を切断するニッカーゼをもたらす。

【０２２２】

他方、Ｃａｓ９ ＨＮＨドメインの不活性化は、下部鎖又は非相補鎖を切断するニッカーゼをもたらす。

【０２２３】

自然発生のＣａｓ９参照分子と比較したＰＡＭ特異性の修飾は、Kleinstiver et al.により、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）（Kleinstiver 2015a）及びＳ．アウレウス（S. aureus）（Kleinstiver 2015b）の両方について記載されている。Kleinstiver et al.は、Ｃａｓ９の標的化忠実度を改善する修飾についても記載している（Kleinstiver 2016）。これらの参考文献のそれぞれは、参照により本明細書に援用される。

【０２２４】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、（いずれも参照により本明細書に援用される）Zetsche 2015及びFine 2015によって記載されるように、２つ以上の部分に分割される。

【０２２５】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、特定の実施形態では、例えばｇＲＮＡ結合、標的及びＰＡＭ認識並びに切断活性をなおも維持しながら、ヌクレアーゼのサイズを低下させる１つ又は複数の欠失を通じてサイズ最適化又は短縮され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、任意選択でリンカーにより、別のポリペプチド、ヌクレオチド又は他の構造に共有結合的に又は非共有結合的に結合する。例示的な結合ヌクレアーゼ及びリンカーは、あらゆる目的のために参照により本明細書に援用されるGuilinger 2014によって記載される。

【０２２６】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、任意選択的に、核局在化シグナルをはじめとするが、これに限定されるものではない標識を含んで、核内へのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼタンパク質の

移動も容易にする。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃ末端及び／又はＮ末端の核局在化シグナルを組み込み得る。核局在化配列は、当技術分野で公知であり、Maeder及び他の箇所に記載される。

【０２２７】

前述の修飾の一覧は、本質的に例示的であることを意図しており、当業者は、本開示に鑑みて、他の修正が特定の用途において可能であるか、又は望ましいことがあり得ることを理解するであろう。したがって、簡潔さのために、本開示の例示的なシステム、方法及び組成物は、特定のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを参照して提示されるが、使用されるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、それらの動作原理を変えない様式で改変され得るものと理解されるべきである。このような改変は、本開示の範囲内である。

【０２２８】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする核酸

例えば、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１又はその機能性断片などのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコード化する核酸が本明細書で提供される。本明細書の実施形態に従って使用され得るＣａｓ９分子をコード化する核酸配列の例は、配列番号３、７～１１、１３に記載される。ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコード化する例示的な核酸は、以前記載されている（例えば、Cong 2013；Wang 2013；Mali 2013；Jinek 2012を参照されたい）。

【０２２９】

場合により、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする核酸は、合成核酸配列であり得る。例えば、合成核酸分子は、化学修飾され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡは、以下の特性の１つ又は複数の（例えば、全て）を有するであろう：それは、キャップされ得；ポリアデニル化され得；5-メチルシチジン及び／又はプソイドウリジンで置換され得る。

【０２３０】

合成核酸配列もコドン最適化され得、例えば少なくとも１つの一般的でないコドン又はそれほど一般的でないコドンが一般的なコドンによって置き換えられる。例えば、合成核酸は、例えば、本明細書に記載される哺乳類発現系内での発現のために最適化された最適化メッセンジャーｍＲＮＡの合成を誘導し得る。コドン最適化されたＣａｓ９コード配列の例は、Cotta-Ramusinoに提示されている。

【０２３１】

さらに又は代わりに、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする核酸は、核局在化配列（ＮＬＳ）を含み得る。核局在化配列は、当技術分野で公知である。

【０２３２】

候補分子の機能解析

候補ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、ｇＲＮＡ及びそれらの複合体は、当技術分野で公知の標準法によって評価され得る。例えば、Cotta-Ramusinoを参照されたい。ＲＮＰ複合体の安定性は、下述される示差走査型蛍光定量法によって評価され得る。

【０２３３】

示差走査型蛍光定量法（ＤＳＦ）

ｇＲＮＡ及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体の熱安定性は、ＤＳＦによって測定され得る。ＤＳＦ技術は、例えば、ｇＲＮＡなどの結合ＲＮＡ分子の添加などの好ましい条件下で増加し得るタンパク質の熱安定性を測定する。

【０２３４】

ＤＳＦアッセイは、任意の適切なプロトコルに従って実施され得、限定されるものではないが、（ａ）異なる条件（例えば、異なる化学量論比のｇＲＮＡ：ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼタンパク質、異なる緩衝液など）を試験して、ＲＮＰ形成のための最適条件を同定すること；及び（ｂ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び／又はｇＲＮＡの修飾（例えば、化学修飾、配列改変など）を試験して、ＲＮＰ形成又は安定性を改善する修飾を同定することをはじめとする任意の適切な設定で使用され得る。ＤＳＦアッセイの１つの読み取りは、ＲＮＰ複合体の融解温度の変化であり；比較的高い変化は、ＲＮＰ複合体が、より低い変化

によって特徴付けられる標準ＲＮＰ複合体と比較してより安定している（したがってより大きい活性又はより好ましい形成動態、分解動態又は別の機能特性を有し得る）ことを示唆する。ＤＳＦアッセイがスクリーニングツールとして展開される場合、閾値融解温度変化が特定され得、それにより、結果は、閾値以上の融解温度変化を有する１つ又は複数のＲＮＰである。例えば、閾値は、５～１０°Ｃ（例えば、５℃°、６℃、７℃、８℃、９℃、１０℃）又はそれを超えるものであり得、結果は、閾値以上の融解温度変化によって特徴付けられる１つ又は複数のＲＮＰであり得る。

【０２３５】

ＤＳＦアッセイ条件の２つの非限定的例は、下記のとおりである。

【０２３６】

ＲＮＰ複合体を形成するための最良の溶液を判定するために、水中の固定濃度（例えば、２μＭ）のＣａｓ９＋１０×SYPRO Orange（登録商標）(Life Technologies、カタログ番号S-6650）を３８４ウェルプレート内に分注する。次に、様々なｐＨ及び塩を有する溶液中に希釈された等モル量のｇＲＮＡを添加する。室温で１０分間インキュベートし、短時間遠心分離してあらゆる気泡を除去した後、Bio-Rad CFXマネージャーソフトウエアと共にBio-Rad CFX384（商標）リアルタイムシステムC1000 Touch（商標）サーマルサイクラーを使用して、２０℃から９０℃まで１０秒毎に１℃の増分で勾配を実行する。

【０２３７】

第２のアッセイは、様々な濃度のｇＲＮＡを上記のアッセイ１からの最適緩衝液中の固定濃度（例えば、２μＭ）のＣａｓ９ｉに混合し、３８４ウェルプレート内で（例えば、室温で１０分間）インキュベートすることからなる。等容積の最適緩衝液＋１０×SYPRO Orange（登録商標）（Life Technologies、カタログ番号S-6650）を添加し、プレートをMicroseal（登録商標）Ｂ接着剤（MSB-1001）で密封する。短時間遠心分離してあらゆる気泡を除去した後、Bio-Rad CFXマネージャーソフトウエアと共にBio-Rad CFX384（商標）リアルタイムシステムC1000 Touch（商標）サーマルサイクラーを使用して、２０℃から９０℃まで、１０秒毎に１℃の増分で勾配を実行する。

【０２３８】

<u>ゲノム編集ストラテジー</u>

上述したゲノム編集システムを使用して、本開示の様々な実施形態において、細胞内で又は細胞から得られたＤＮＡの標的領域内で編集する（すなわち改変する）。特定の編集をするための様々なストラテジーが本明細書に記載され、これらのストラテジーは、一般に所望の修復結果、個々の編集（例えば、ＳＳＢ又はＤＳＢ）の数と位置及びこのような編集の標的部位によって記述される。

【０２３９】

ＳＳＢ又はＤＳＢの形成を伴うゲノム編集ストラテジーは、（ａ）標的領域の全部又は一部の欠失；（ｂ）標的領域の全部又は一部内への挿入又はその置換；又は（ｃ）標的領域の全部又は一部の中断をはじめとする修復結果によって特徴付けられる。このグループ分けは、任意の特定の理論又はモデルを限定することも又はそれに拘束されることも意図されず、提示の経済性のためにのみ提供される。当業者は、列挙される結果が相互に排他的でなく、いくつかの修復が他の結果をもたらし得ることを理解するであろう。特定の編集ストラテジー又は方法の説明は、別段の指定がない限り、特定の修復結果を必要とすると理解されるべきではない。

【０２４０】

標的領域の置換は、例えば、ＨＤＲ経路によって媒介される２つの修復結果である、遺伝子修正又は遺伝子変換を通じた、相同配列による、標的領域内に存在する配列の全部又は一部の置換を一般に伴う。ＨＤＲは、以下でより詳細に記載されるように、一本鎖又は二本鎖であり得るドナー鋳型の使用によって促進される。一本鎖又は二本鎖鋳型は外因性であり得、その場合、それらは、遺伝子修正を促進するか、又はそれらは、内因性（例えば、細胞ゲノム中の相同配列）であり得、遺伝子変換を促進する。外因性鋳型は、例えば

、Richardson 2016（参照により本明細書に援用される）によって記載されるように、非対称オーバーハングを有することができる（すなわち、ＤＳＢの部位に相補的な鋳型の部分は、鋳型内の中心に位置するのではなく、むしろ３’又は５’方向にオフセットされ得る）。鋳型が一本鎖である場合、それは、標的領域の相補的（上部）又は非相補的（下部）鎖のいずれかに対応し得る。

【０２４１】

Ran&Hsu及びCotta-Ramusinoに記載されるように、遺伝子変換及び遺伝子修正は、場合により、標的領域内又はその周囲に１つ又は複数のニックを形成することによって促進される。場合により、二重ニッカーゼストラテジーを使用して、２つのオフセットＳＳＢが形成され、次にオーバーハング（例えば、５’オーバーハング）を有する単一のＤＳＢが形成される。

【０２４２】

標的配列の全部又は一部の中断及び／又は欠失は、様々な修復結果によって達成され得る。一例として、ＬＣＡ１０変異についてMaederに記載されているように、標的領域を挟む２つ以上のＤＳＢを同時に生成することによって配列を欠失させ得、次に、それは、ＤＳＢが修復される際に切除される。別の例として、配列は、一本鎖オーバーハングを有する二本鎖切断の形成、それに続く修復前のオーバーハングのヌクレオチド末端加水分解プロセシングによって生成される欠失によって中断され得る。

【０２４３】

標的配列中断の１つの特定のサブセットは、標的配列中のインデルの形成によって媒介され、ここで、修復結果は、典型的には、ＮＨＥＪ経路（Ａｌｔ－ＮＨＥＪをはじめとする）によって媒介される。ＮＨＥＪは、そのインデル変異との関連のために「誤りがちな」修復経路と称される。しかし、場合により、ＤＳＢは、その周囲の配列の改変なしにＮＨＥＪによって修復され（いわゆる「完璧」又は「無瘢痕」修復）；これは、一般に、ＤＳＢの両端が完全にライゲートされることを必要とする。一方、インデルは、それらがライゲートされる前の遊離ＤＮＡ末端の酵素的プロセシングから生じると考えられ、それは、一方又は両方の遊離末端の一方又は両方の鎖にヌクレオチドを付加し及び／又はそれから除去する。

【０２４４】

遊離ＤＳＢ末端の酵素的プロセシングは、本質的に確率論的であり得るため、インデル変異は変動する傾向があり、分布に沿って発生し、特定の標的部位、使用される細胞型、使用されるゲノム編集ストラテジーをはじめとする様々な要因によって影響され得る。それでもなお、インデル形成について限定的に一般化することは、可能であり：単一のＤＳＢの修復によって形成される欠失は、最も一般的には１～５０ｂｐの範囲であるが、１００～２００ｂｐを超えることもあり得る。単一のＤＳＢの修復によって形成された挿入は、より短くなる傾向があり、多くの場合に切断部位を直接取り囲む配列の短い重複を含む。しかし、大きい挿入を得ることが可能であり、これらの場合、挿入配列は、多くの場合、ゲノムの他の領域又は細胞内に存在するプラスミドＤＮＡに由来が突き止められている。

【０２４５】

インデル変異及びインデルを生成するように構成されたゲノム編集システムは、例えば、特定の最終配列の生成が必要でない場合及び／又はフレームシフト変異が耐容される場合、標的配列を中断するのに有用である。それらは、所望の特定の配列が所与の部位におけるＳＳＢ又はＤＳＢの修復から優先的に生じる傾向がある限り、特定の配列が好ましい状況でも有用であり得る。インデル変異は、特定のゲノム編集システム及びそれらの構成要素の活性を評価又はスクリーニングするための有用なツールでもある。これらの及び他の設定では、インデルは、（ａ）ゲノム編集システムと接触される細胞のゲノムにおけるそれらの相対的及び絶対的頻度、及び（ｂ）例えば未編集の配列に対する±１、±２、±３などの数値的な差の分布によって特徴付けられ得る。一例として、リード発見設定では、複数のｇＲＮＡをスクリーニングして、制御された条件下でのインデル読み取りに基づいて、標的部位での切断を最も効率的に推進するｇＲＮＡが同定され得る。閾値頻度以上

のインデルを生成するガイド又はインデルの特定の分布を生成するガイドがさらなる研究及び開発のために選択され得る。インデルの頻度及び分布は、例えば、ｇＲＮＡを一定に保ち、他の特定の反応条件又は送達方法を変化させることにより、異なるゲノム編集システムの実装又は製剤化及び送達方法を評価するための読み取りとしても有用であり得る。

【０２４６】

多重ストラテジー

本開示に従ったゲノム編集システムは、同一遺伝子座又は異なる遺伝子座のいずれかで２つ以上のＤＳＢを発生させる多重遺伝子編集のためにも用いられ得る。本明細書で開示されるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｇＲＮＡのいずれも多重遺伝子編集のためのゲノム編集システムで使用され得る。複数のＤＳＢ又はＳＳＢの形成を含む編集ストラテジーは、例えば、Cotta-Ramusinoに記載される。

【０２４７】

本明細書で開示されるように、複数のｇＲＮＡは、ゲノム編集システムで使用されて、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２の１３ｎｔ標的領域に改変（例えば、欠失、挿入）が導入され得る。特定の実施形態では、配列番号２５１～９０１、９４０～９４２に記載される標的化ドメインを含む１つ又は複数のｇＲＮＡは、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２の１３ｎｔ標的領域に改変を導入するのに使用され得る。他の実施形態では、複数のｇＲＮＡがゲノム編集システムで使用されて、ＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変が導入され得る。特定の実施形態では、配列番号９７０、９７１、９９６、９９７に記載される配列を含む１つ又は複数のｇＲＮＡは、ＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変を導入するのに使用され得る。特定の実施形態では、配列番号１００２、１００４に記載される標的化ドメインを含む１つ又は複数のｇＲＮＡは、ＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変を導入するのに使用され得る。他の実施形態では、複数のｇＲＮＡがゲノム編集システムで使用されて、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフに改変が導入され得る。特定の実施形態では、配列番号９５２～９５５に記載される標的化ドメインを含む１つ又は複数のｇＲＮＡを使用して、ＢＣＬ１１ＡｅのＧＡＴＡ１結合モチーフに改変が導入され得る。複数のｇＲＮＡは、ゲノム編集システムでも使用されて、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ、ＣＣＡＡＴボックス標的領域、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２の１３ｎｔ標的領域又はそれらの組み合わせに改変が導入され得る。特定の実施形態では、配列番号９５２～９５５に記載される標的化ドメインを含む１つ又は複数のｇＲＮＡは、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフに改変を導入するのに使用され得、配列番号２５１～９０１、９４０～９４２に記載される標的化ドメインを含む１つ又は複数のｇＲＮＡは、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２の１３ｎｔ標的領域に改変を導入するのに使用され得る。特定の実施形態では、配列番号９５２～９５５に記載される標的化ドメインを含む１つ又は複数のｇＲＮＡは、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフに改変を導入するのに使用され得、１つ又は複数のｇＲＮＡは又は配列番号９７０、９７１、９９６、９９７に記載される標的化ドメインを含むｇＲＮＡは、ＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変を導入するのに使用され得る。特定の実施形態では、配列番号９５２～９５５に記載される標的化ドメインを含む１つ又は複数のｇＲＮＡは、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフに改変を導入するのに使用され得、配列番号１００２、１００４に記載される標的化ドメインを含む１つ又は複数のｇＲＮＡは、ＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変を導入するのに使用され得る。

【０２４８】

特定の実施形態では、複数のｇＲＮＡ及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼがゲノム編集システムで使用されて、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２のＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変（例えば、欠失、挿入）が導入され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９、修飾Ｃａｓ９（例えば、Ｄ１０Ａ）、Ｃｐｆ１又は修飾Ｃｐｆ１であり得る。

【０２４９】

ドナー鋳型設計

ドナー鋳型設計は、例えば、Cotta-Ramusinoなどの文献に詳細に記載される。一本鎖（ｓｓＯＤＮ）又は二本鎖（ｄｓＯＤＮ）であり得るＤＮＡオリゴマードナー鋳型（オリ

ゴデオキシヌクレオチド又はＯＤＮ）は、ＤＳＢのＨＤＲに基づく修復を容易にするか、又は全体的な編集率を向上させるために使用され得、それは、標的ＤＮＡ配列に改変を導入し、新しい配列を標的配列に挿入するか、又は標的配列を完全に置換するのに特に有用である。

【０２５０】

一本鎖であるか又は二本鎖であるかにかかわらず、ドナー鋳型は、切断される標的配列中の又はその付近の（例えば、側方の又は隣接している）ＤＮＡ領域と相同的な領域を一般に含む。これらの相同領域は、本明細書「相同性アーム」と称され、下に概略的に示される。

［５’相同性アーム］－－［置換配列］－－［３’相同性アーム］

【０２５１】

相同性アームは、任意の適切な長さ（１つの相同性アームのみが使用される場合には皆無のヌクレオチドを含む）を有し得、３’及び５’相同性アームは、同じ長さを有し得るか又は長さが異なり得る。適切な相同性アーム長の選択は、Ａｌｕ反復配列又は他の非常に一般的な要素などの特定の配列との相同性又はミクロ相同性を回避したいという願望などの様々な要因によって影響を受け得る。例えば、５’相同性アームが短縮されて配列反復要素が回避され得る。他の実施形態では、３’相同性アームが短縮されて配列反復要素が回避され得る。一部の実施形態では、５’及び３’相同性アームの両方が短縮されて、特定の配列反復要素の包含が回避され得る。さらに、いくつかの相同性アーム設計は、編集効率を改善するか又は所望の修復結果の頻度を増加させ得る。例えば、参照により本明細書に援用されるRichardson 2016は、一本鎖ドナー鋳型の３’及び５’相同性アームの相対的非対称性が修復率及び／又は結果に影響を及ぼすことを見出した。

【０２５２】

ドナー鋳型中の置換配列は、Cotta-Ramusinoをはじめとする他の箇所に記載されている。置換配列は、任意の適切な長さ（所望の修復結果が欠失である場合には皆無のヌクレオチドを含む）であり得、典型的には、編集が所望される細胞内の天然配列に対して１、２、３個又はそれを超える配列修飾を含む。１つの一般的な配列修飾は、処置が所望される疾患又は病状に関連する変異を修復するための天然配列の改変を伴う。別の一般的な配列修飾は、ＳＳＢ若しくはＤＳＢを生成するために使用される、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼのＰＡＭ配列若しくはｇＲＮＡの標的化ドメインに相補的である１つ若しくは複数の配列又はしたがってＰＡＭ配列若しくは標的化ドメインを改変し、置換配列が標的部位に組み込まれた後に標的部位の反復切断を低減又は排除することを伴う。

【０２５３】

直鎖ｓｓＯＤＮが使用される場合、それは、（ｉ）標的核酸のニックの入った鎖にアニールされ、（ｉｉ）無傷の標的核酸鎖にアニールされ、（ｉｉｉ）標的核酸のプラス鎖にアニールされ、及び／又は（ｉｖ）標的核酸のマイナス鎖にアニールされるように構成され得る。ｓｓＯＤＮは、例えば、約若しくは少なくとも８０～２００ヌクレオチド又はそれを下回るもの（例えば、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０又は２００ヌクレオチド）などの任意の適切な長さを有し得る。

【０２５４】

鋳型核酸は、ウイルスゲノムなどの核酸ベクター又は例えばプラスミドなどの環状二本鎖ＤＮＡでもあり得ることに留意すべきである。ドナー鋳型を含む核酸ベクターは、他のコーディング又は非コード要素を含み得る。例えば、鋳型核酸は、特定のゲノム骨格要素（例えば、ＡＡＶゲノムの場合には逆方向末端反復）を含み、任意選択的にｇＲＮＡ及び／又はＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする追加の配列を含むウイルスゲノムの一部として（例えばＡＡＶ又はレンチウイルスゲノム中で）送達され得る。特定の実施形態では、ドナー鋳型は、１つ又は複数のｇＲＮＡによって認識される標的部位に隣接するか又はそれに挟まれ、ドナー鋳型の一端又は両端における遊離ＤＳＢの形成を容易にし得、それは、同一ｇＲＮＡを使用して細胞ＤＮＡ中に形成された対応するＳＳＢ又はＤＳＢの修復に

関与し得る。ドナー鋳型として使用するのに適した例示的な核酸ベクターは、参照により援用されるCotta-Ramusinoに記載される。

【０２５５】

どのような形態が使用されても、鋳型核酸は、望ましくない配列を回避するように設計され得る。特定の実施形態では、一方又は両方の相同性アームが短縮され、例えばＡｌｕ反復、ＬＩＮＥ要素などの特定の配列反復要素との重なりが回避され得る。

【０２５６】

特定の実施形態では、サイレントの非病原性ＳＮＰがｓｓＯＤＮドナー鋳型に含まれて、遺伝子編集事象を同定できるようにし得る。

【０２５７】

特定の実施形態では、ドナー鋳型は、切断されるべき標的配列内又はその近傍のＤＮＡの領域と非相同的な非特異的鋳型であり得る。特定の実施形態では、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ標的化で使用するためのドナー鋳型としては、限定することなく、ＢＣＬ１１Ａｅ中のＧＡＴＡ１結合モチーフ内又はその近傍のＤＮＡの領域と非相同的な非標的特異的鋳型が挙げられ得る。特定の実施形態では、１３ｎｔ標的領域の標的化で使用するためのドナー鋳型としては、限定することなく、１３ｎｔ標的領域内又はその近傍のＤＮＡの領域と非相同的な非標的特異的鋳型が挙げられ得る。

【０２５８】

ドナー鋳型又は鋳型核酸は、本明細書での用法では、ＲＮＡヌクレアーゼ分子及び１つ又は複数のｇＲＮＡ分子と併用されて、標的ＤＮＡ配列を改変（例えば、欠失、妨害又は修飾）し得る核酸配列を指す。特定の実施形態では、鋳型核酸は、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２のＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変（例えば、欠失）をもたらす。特定の実施形態では、改変は、非自然発生の改変である。特定の実施形態では、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２のＣＣＡＡＴボックス標的領域における非自然発生の改変は、１８ｎｔ標的領域、１１ｎｔ標的領域、４ｎｔ標的領域若しくは１ｎｔ標的領域又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、改変は、自然発生の改変である。特定の実施形態では、ＨＢＧ１及び／又はＨＢＧ２のＣＣＡＡＴボックス標的領域における自然発生の改変は、１３ｎｔ標的領域、ｃ．－１１７Ｇ＞Ａ標的領域又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、鋳型核酸は、ｓｓＯＤＮである。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、プラス鎖又はマイナス鎖である。

【０２５９】

例えば、１８ｎｔ標的領域（ＨＢＧ１　ｃ．－１０４～－１２１、ＨＢＧ２　ｃ．－１０４～－１２１又はそれらの組み合わせ）に１８ｎｔ欠失を導入するための鋳型核酸は、５’相同性アーム、置換配列及び３’相同性アームを含み得、置換配列は、０ヌクレオチド又は０ｂｐである。特定の実施形態では、５’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチド以上であり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１８ｎｔの標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、３’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチド以上であり得る。特定の実施形態では、３’相同性アームは、１８ｎｔの標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが対称的である。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが非対称的である。特定の実施形態では、鋳型核酸は、ｓｓＯＤＮである。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、プラス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、マイナス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９７４（ＯＬＩ１６４０９）又は配列番号９７５（ＯＬＩ１６４１０）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【０２６０】

特定の実施形態では、１１ｎｔ標的領域（ＨＢＧ１　ｃ．－１０５～－１１５、ＨＢＧ２　ｃ．－１０５～－１１５又はそれらの組み合わせ）に１１ｎｔ欠失を導入するための鋳型核酸は、５’相同性アーム、置換配列及び３’相同性アームを含み得、置換配列は、０ヌクレオチド又は０ｂｐである。特定の実施形態では、５’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１１ｎｔの標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、３’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、３’相同性アームは、１１ｎｔの標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが対称的である。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが非対称的である。特定の実施形態では、鋳型核酸は、ｓｓＯＤＮである。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、プラス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、マイナス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９７６（ＯＬＩ１６４１１）又は配列番号９７８（ＯＬＩ１６４１３）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【０２６１】

特定の実施形態では、４ｎｔ標的領域（ＨＢＧ１　ｃ．－１１２～－１１５、ＨＢＧ２　ｃ．－１１２～－１１５又はそれらの組み合わせ）に４ｎｔ欠失を導入するための鋳型核酸は、５’相同性アーム、置換配列及び３’相同性アームを含み得、置換配列は、０ヌクレオチド又は０ｂｐである。特定の実施形態では、５’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、４ｎｔの標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、３’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、３’相同性アームは、４ｎｔの標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが対称的である。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが非対称的である。特定の実施形態では、鋳型核酸は、ｓｓＯＤＮである。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、プラス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、マイナス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９８４（ＯＬＩ１６４１９）、配列番号９８５（ＯＬＩ１６４２０）、配列番号９８６（ＯＬＩ１６４２１）、配列番号９８７（ＯＬＩ１６４２２）、配列番号９８８（ＯＬＩ１６４２３）、配列番号９８９（ＯＬＩ１６４２４）、配列番号９９０（ＯＬＩ１６４２５）、配列番号９９１（ＯＬＩ１６４２６）、配列番号９９２（ＯＬＩ１６４２７）、配列番号９９３（ＯＬＩ１６４２８）、配列番号９９４（ＯＬＩ１６４２９）又は配列番号９９５（ＯＬＩ１６４３０）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【０２６２】

特定の実施形態では、１ｎｔ標的領域（ＨＢＧ１　ｃ．－１１６、ＨＢＧ２　ｃ．－１１６又はそれらの組み合わせ）に１ｎｔ欠失を導入するための鋳型核酸は、５’相同性アーム、置換配列及び３’相同性アームを含み得、置換配列は、０ヌクレオチド又は０ｂｐである。特定の実施形態では、５’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１ｎｔの標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、３’相同性アームは、例えば、長さが少なく

とも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、３’相同性アームは、１ｎｔの標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが対称的である。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが非対称的である。特定の実施形態では、鋳型核酸は、ｓｓＯＤＮである。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、プラス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、マイナス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９８２（ＯＬＩ１６４１７）又は配列番号９８３（ＯＬＩ１６４１８）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【０２６３】

特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域における改変は、１３ｎｔ欠失などの自然発生の改変を再現するか又はそれに類似している。特定の実施形態では、１３ｎｔ標的領域（ＨＢＧ１　ｃ．－１１６、ＨＢＧ２　ｃ．－１１６又はそれらの組み合わせ）に１３ｎｔ欠失を導入するための鋳型核酸は、５’相同性アーム、置換配列及び３’相同性アームを含み得、置換配列は、０ヌクレオチド又は０ｂｐである。特定の実施形態では、５’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１３ｎｔの標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、３’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、３’相同性アームは、１３ｎｔの標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが対称的である。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが非対称的である。特定の実施形態では、鋳型核酸は、ｓｓＯＤＮである。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、プラス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、マイナス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９７９（ＯＬＩ１６４１４）又は配列番号９７７（ＯＬＩ１６４１２）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【０２６４】

特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域における改変は、－１１７Ｇ＞Ａ標的領域におけるＧからＡへの置換などの自然発生の改変を再現するか又はそれに類似する。特定の実施形態では、－１１７Ｇ＞Ａ置換を－１１７Ｇ＞Ａ標的領域（ＨＢＧ１　ｃ．－１１７Ｇ＞Ａ、ＨＢＧ２　ｃ．－１１７Ｇ＞Ａ又はそれらの組み合わせ）に導入するための鋳型核酸は、５’相同性アーム、置換配列及び３’相同性アームを含み得、置換配列は、０ヌクレオチド又は０ｂｐである。特定の実施形態では、５’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約１００～約２００ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、５’相同性アームは、１１７Ｇ＞Ａの標的領域の５’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、３’相同性アームは、例えば、長さが少なくとも約２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５又は２００ヌクレオチドなどの約２５～約２００ヌクレオチドであり得る。特定の実施形態では、３’相同性アームは、１１７Ｇ＞Ａの標的領域の３’側の例えば５５～９５、６０～９０、７０～９０又は８０～９０ｂｐなどの約５０～１００ｂｐの相同性を含む。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが対称的である。特定の実施形態では、５’及び３’相同性アームは、長さが非対称的である。特定の実施形態では、鋳型核酸は、ｓｓＯＤＮである。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、プラス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、マイナス鎖である。特定の実施形態では、ｓｓＯＤＮは、配列番号９８０（ＯＬＩ１６４１５）又は配列番号９８１（ＯＬＩ１６４１６）を含むか、それから

本質的になるか、又はそれからなる。

【０２６５】

特定の実施形態では、５’相同性アームは、５’ホスホロチオエート（ＰｈＴｘ）修飾を含む。特定の実施形態では、３’相同性アームは、３’ＰｈＴｘ修飾を含む。特定の実施形態では、鋳型核酸は、５’及び３’ＰｈＴｘ修飾を含む。

【０２６６】

特定の実施形態では、ＣＣＡＡＴボックス標的領域に改変（例えば、欠失）を導入するためのｓｓＯＤＮは、ＲＮＡヌクレアーゼと、例えば表７、表１０、表１２、表１３、表１８、表１９に開示されるｇＲＮＡなどのＣＣＡＡＴ標的領域を標的化する１つ又は複数のｇＲＮＡとの組み合わせで使用され得る。

【０２６７】

標的細胞

本開示によるゲノム編集システムを使用して、細胞が操作又は改変され、例えば標的核酸が編集又は改変され得る。操作は、様々な実施形態において、インビボ又はエクスビボで行われ得る。

【０２６８】

本開示の実施形態に従って様々な細胞型が操作又は改変され得、インビボ用途などの場合、例えば本開示によるゲノム編集システムを複数の細胞型に送達することにより、複数の細胞型が改変又は操作され得る。しかし、他の場合、操作又は改変を特定の細胞型に限定することが望ましいことがあり得る。例えば、いくつかの例では、遺伝子型の修飾が細胞表現型の変化をもたらすと予想される、Maederの例における光受容細胞など、限定された分化能を有する細胞又は最終分化細胞を編集することが望ましくあり得る。しかし、他の場合、低分化型、多分化能（multipotent）又は多能性（pluripotent）、幹細胞又は前駆細胞を編集することが望ましいことがある。例として、細胞は、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）又は所与の用途又は適応症に関連する細胞型に分化する他の幹細胞又は前駆細胞型であり得る。

【０２６９】

当然ながら、改変又は操作される細胞は、標的化される細胞型及び／又は所望の編集結果に応じて、様々に分裂細胞又は非分裂細胞である。

【０２７０】

細胞がエクスビボで操作又は改変される場合、細胞は、直ちに使用され得る（例えば、対照に投与され得る）か、又はそれらは、後に使用するために維持又は保存され得る。当業者は、当技術分野において公知の任意の適切な方法を使用して、細胞が培養物中で維持又は保存され得る（例えば、液体窒素中で凍結される）ことを理解するであろう。

【０２７１】

ゲノム編集システムの実装：送達、配合及び投与経路

上で考察されるように、本開示のゲノム編集システムは、任意の適切な方法で実装され得、これは、限定されるものではないが、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、ｇＲＮＡ、任意のドナー鋳型核酸をはじめとするシステムの構成要素が、ゲノム編集システムの形質導入、発現又は導入をもたらすような且つ／又は細胞、組織又は対象において所望の修復結果を引き起こすような任意の適切な形態又は形態の組み合わせで送達、配合又は投与され得ることを意味する。ゲノム編集システム実装のいくつかの非限定的例が表３及び４に記載される。しかし、当業者は、これらの一覧が包括的でなく、他の実装形態が可能であることを理解するであろう。特に表３を参照すると、この表は、単一のｇＲＮＡ及び任意のドナー鋳型を含むゲノム編集システムのいくつかの例示的実装形態を列挙する。しかし、本開示によるゲノム編集システムには、複数のｇＲＮＡ、複数のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びタンパク質などの他の構成要素が組み込まれ得、表に示された原理に基づいて様々な実装形態が当業者に明らかになるであろう。表中、［Ｎ／Ａ］は、ゲノム編集システムが、示された構成要素を含まないことを示す。

【０２７２】

【表３】

表 3

ゲノム編集システム構成成分			
RNA 誘導ヌクレアーゼ	gRNA	ドナー鋳型	コメント
タンパク質	RNA	[N/A]	gRNA 分子と複合体化した RNA 誘導ヌクレアーゼタンパク質(RNP 複合体)
タンパク質	RNA	DNA	上記の RNP 複合体に、一本鎖又は二本鎖ドナー鋳型を加えたもの。
タンパク質	DNA	[N/A]	RNA 誘導ヌクレアーゼタンパク質に、DNA から転写された gRNA を加えたもの。
タンパク質	DNA	DNA	RNA 誘導ヌクレアーゼタンパク質に、gRNA をコードする DNA 及び別個の DNA ドナー鋳型を加えたもの。
タンパク質	DNA		RNA 誘導ヌクレアーゼタンパク質、及び gRNA とドナー鋳型との双方をコードする単一 DNA。
DNA			RNA 誘導ヌクレアーゼと gRNA とドナー鋳型とをコードする、DNA 又は DNA ベクター。
DNA	DNA	[N/A]	RNA 誘導ヌクレアーゼ及び gRNA をそれぞれコードする、2 つの別個の DNA 又は 2 つの別個の DNA ベクター。
DNA	DNA	DNA	RNA 誘導ヌクレアーゼ、gRNA、及びドナー鋳型をそれぞれコードする、3 つの別個の DNA、又は 3 つの別個の DNA ベクター。
DNA		[N/A]	RNA 誘導ヌクレアーゼと gRNA とをコードする、DNA 又は DNA ベクター
DNA		DNA	RNA 誘導ヌクレアーゼと gRNA とをコードする第 1 の DNA 又は DNA ベクター、及びドナー鋳型と gRNA とをコードする第 2 の DNA 又は DNA ベクター。
DNA	DNA		RNA 誘導ヌクレアーゼをコードする第 1 の DNA 又は DNA ベクター、及び gRNA ゼとドナー鋳型とをコードする第 2 の DNA 又は DNA ベクター。
DNA			RNA 誘導ヌクレアーゼとドナー鋳型とをコードする第 1 の DNA 又は DNA ベクター、及び gRNA をコードする第 2 の DNA 又は DNA ベクター
	DNA		
DNA			RNA 誘導ヌクレアーゼとドナー鋳型とをコードする DNA 又は DNA ベクター、及び gRNA
	RNA		
RNA		[N/A]	RNA 誘導ヌクレアーゼ をコードし gRNA を含む RNA 又は RNA ベクター
RNA		DNA	RNA 誘導ヌクレアーゼ をコードし gRNA を含む RNA 又は RNA ベクター、及びドナー鋳型をコードする DNA 又は DNA ベクター。

【０２７３】

表４は、本明細書に記載されるようなゲノム編集システムの構成要素のための様々な送達方法を要約する。この場合も、一覧は、限定的ではなく、むしろ例示的であることが意図される。

【０２７４】

【表４】

表４

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

【０２７５】

ゲノム編集システムの核酸ベースの送達

本開示によるゲノム編集システムの様々な要素をコードする核酸は、当技術分野で公知の方法によって又は本明細書に記載されるようにして、対象に投与されるか又は細胞内に送達され得る。例えば、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードするＤＮＡ及び／又はｇＲＮＡをコードするＤＮＡ並びにドナー鋳型核酸は、例えば、ベクター（例えば、ウイルスベクター又は非ウイルスベクター）、非ベクターベースの方法（例えば、裸のＤＮＡ又はＤＮＡ複合体を使用する）又はそれらの組み合わせによって送達され得る。

【０２７６】

ゲノム編集システムをコードする核酸又はその構成要素は、例えば、形質移入若しくは電気穿孔によって裸のＤＮＡ若しくはＲＮＡとして細胞に直接送達され得るか、又は標的細胞（例えば、赤血球、ＨＳＣ）による取り込みを促進する分子（例えば、Ｎ－アセチルガラクトサミン）にコンジュゲートされ得る。表４に要約されるベクターなどの核酸ベクターも使用され得る。

【０２７７】

核酸ベクターは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、ｇＲＮＡ及び／又はドナー鋳型などのゲノム編集システム構成要素をコードする１つ又は複数の配列を含み得る。ベクターは、タンパク質をコードする配列と結合する（例えば、その中に挿入されるか又はそれに融合する）シグナルペプチド（例えば、核局在化、核小体局在化又はミトコンドリア局在化のための）をコードする配列も含み得る。一例として、核酸ベクターは、１つ又は複数の核局在化配列（例えば、ＳＶ４０由来の核局在化配列）を含むＣａｓ９コード配列を含み得る。

【０２７８】

核酸ベクターは、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、ポリアデニル化シグナル、コザックコンセンサス配列又は内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）などの任意の適切な数の調節／制御要素も含み得る。これらの要素は、当技術分野で周知であり、Cotta-Ramusinoに記載される。

【０２７９】

本開示による核酸ベクターは、組換えウイルスベクターを含む。例示的なウイルスベクターは、表４に記載され、追加的な適切なウイルスベクター及びそれらの使用及び製造は、Cotta-Ramusinoに記載される。当技術分野で公知の他のウイルスベクターも使用され得る。さらに、ウイルス粒子を使用して、ゲノム編集システムの構成要素が核酸及び／又はペプチドの形態で送達され得る。例えば、「空の」ウイルス粒子は、任意の適切な積荷を含有するように組み立てられ得る。ウイルスベクター及びウイルス粒子は、標的化リガンドを組み込んで、標的組織特異性が改変されるようにも操作され得る。

【０２８０】

ウイルスベクターに加えて、非ウイルスベクターは、本開示によるゲノム編集システムをコードする核酸を送達するために使用され得る。非ウイルス核酸ベクターの１つの重要なカテゴリーは、ナノ粒子であり、これは、有機又は無機であり得る。ナノ粒子は、当技術分野で周知であり、Cotta-Ramusinoに要約される。任意の適切なナノ粒子設計を用いて、ゲノム編集システム構成要素又はこのような構成要素をコードする核酸を送達し得る。例えば、有機（例えば、脂質及び／又はポリマー）ナノ粒子は、本開示の特定の実施形において送達ビヒクルとして使用するのに適し得る。ナノ粒子製剤及び／又は遺伝子移入で使用するための例示的な脂質が表５に示され、表６は、遺伝子移入及び／又はナノ粒子製剤で使用するための例示的ポリマーを列挙する。

【０２８１】

【表５－１】

表 5:遺伝子移入のために使用される脂質

脂質	略称	特徴
1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	DOPC	ヘルパー
1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン	DOPE	ヘルパー
コレステロール		ヘルパー
N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]*N,N,N*-トリメチルアンモニウムクロリド	DOTMA	カチオン性
1,2-ジオレオイルオキシ-3-トリメチルアンモニウム-プロパン	DOTAP	カチオン性
ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン	DOGS	カチオン性
N-(3-アミノプロピル)-*N,N*-ジメチル-2,3-ビス(ドデシルオキシ)-1-プロパンアミニウムブロミド	GAP-DLRIE	カチオン性
セチルトリメチルアンモニウムブロミド	CTAB	カチオン性
6-ラウロキシヘキシルオルニチネート	LHON	カチオン性
1-(2,3-ジオレオイルオキシプロピル)-2,4,6-トリメチルピリジニウム	2Oc	カチオン性
2,3-ジオレイルオキシ-*N*-[2(スペルミンカルボキサミド-エチル]-*N,N*-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート	DOSPA	カチオン性
1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン	DOPA	カチオン性
N-(2-ヒドロキシエチル)-*N,N*-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)-1-プロパンアミニウムブロミド	MDRIE	カチオン性
ジミリストオキシプロピルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド	DMRI	カチオン性
3β-[*N*-(*N',N'*-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール	DC-Chol	カチオン性
ビス-グアニジウム-tren-コレステロール	BGTC	カチオン性
1,3-ジオデオキシ-2-(6-カルボキシ-スペルミル)-プロピルアミド	DOSPER	カチオン性
ジメチルオクタデシルアンモニウムブロミド	DDAB	カチオン性
ジオクタデシルアミドグリシルスペルミジン	DSL	カチオン性
rac-[(2,3-ジオクタデシルオキシプロピル)(2-ヒドロキシエチル)]-ジメチルアンモニウムクロリド	CLIP-1	カチオン性
rac-[2(2,3-ジヘキサデシルオキシプロピル-オキシメチルオキシ)エチル]トリメチルアンモニウムブロミド	CLIP-6	カチオン性
エチルジミリストイルホスファチジルコリン	EDMPC	カチオン性
1,2-ジステアリルオキシ-*N,N*-ジメチル-3-アミノプロパン	DSDMA	カチオン性
1,2-ジミリストイル-トリメチルアンモニウムプロパン	DMTAP	カチオン性

【０２８２】

【表５－２】

O,O'-ジミリスチル-N-リシルアスパラギン酸	DMKE	カチオン性
1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン	DSEPC	カチオン性
N-パルミトイル D-エリスロ-スフィンゴシルカルバモイル-スペルミン	CCS	カチオン性
N-*t*-ブチル-*N*0-テトラデシル-3-テトラデシルアミノプロピオンアミジン	ジ C14-アミジン	カチオン性
オクタデセノリオキシ[エチル-2-ヘプタデセニル-3 ヒドロキシエチル]イミダゾリニウムクロリド	DOTIM	カチオン性
*N*1-コレステリルオキシカルボニル-3,7-ジアザノナン-1,9-ジアミン	CDAN	カチオン性
2-(3-[ビス(3-アミノ-プロピル)-アミノ]プロピルアミノ)-*N*-ジテトラデシルカルバモイルメチル-アセトアミド	RPR209120	カチオン性
1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン	DLinDMA	カチオン性
2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン	DLin-KC2-DMA	カチオン性
ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミノ酪酸	DLin-MC3-DMA	カチオン性

【０２８３】

【表６】

表 6:遺伝子移入のために使用されたポリマー

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

【０２８４】

非ウイルスベクターは、標的化修飾を任意選択的に含み、取り込みを改善し、且つ／又は特定の細胞型を選択的に標的化する。これらの標的化修飾としては、例えば、細胞特異的抗原、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、アプタマー、ポリマー、糖（例えば、Ｎ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ））及び細胞透過性ペプチドが挙げられる。このようなベクターはまた、任意選択的に、融合誘導性及びエンドソーム不安定化ペプチド／ポリマーを使用し、（例えば、積荷のエンドソーム漏出を促進するための）酸誘発立体構造変化を受け、且つ／又は例えば細胞区画への放出のための刺激切断可能ポリマーを組み込む。例えば、還元性細胞環境内で切断されるジスルフィドベースのカチオン性ポリマーが

使用され得る。

【０２８５】

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

【０２８６】

ＲＮＰ及び／又はＲＮＡをコードするゲノム編集システム構成要素の送達

ＲＮＰ（ｇＲＮＡ及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの複合体）及び／又はＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び／又はｇＲＮＡをコードするＲＮＡは、そのいくつかがCotta-Ramusinoに記載される当技術分野で公知の方法により、細胞に送達されるか又は対象に投与され得る。インビトロでは、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードし、且つ／又はｇＲＮＡをコードするＲＮＡは、例えば、マイクロインジェクション、電気穿孔、一過性細胞圧縮又は圧搾によって送達され得る（例えば、Lee 2012を参照されたい）。脂質媒介トランスフェクション、ペプチド媒介送達、ＧａｌＮＡｃ又は他のコンジュゲート媒介送達及びそれらの組み合わせもインビトロ及びインビボ送達のために使用され得る。保護的でインタラクティブな非凝縮（ＰＩＮＣ）システムが送達に使用され得る。

【０２８７】

電気穿孔を通じたインビトロ送達は、カートリッジ、チャンバー又はキュベット内において、ドナー鋳型核酸分子の存在下又は非存在下で細胞をＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び／又はｇＲＮＡをコードするＲＮＡと混合するステップと、１回又は複数回の規定の長さ及び振幅の電気インパルスを適用するステップとを含む。電気穿孔のシステム及びプロトコルは、当技術分野で公知であり、本開示の様々な実施形態に関連して、任意の適切な電気穿孔ツール及び／又はプロトコルが使用され得る。

【０２８８】

投与経路

ゲノム編集システム又はそのようなシステムを用いて改変又は操作された細胞は、局所的又は全身的を問わず、任意の適切な様式又は経路によって対象に投与され得る。全身性の投与法としては、経口及び非経口経路が挙げられる。非経口経路としては、例として、静脈内、骨髄内、動脈内、筋肉内、皮内、皮下、鼻腔内及び腹腔内経路が挙げられる。全身投与される構成要素は、例えば、ＨＳＣ、造血幹／前駆細胞又は赤血球前駆体若しくは前駆細胞を標的化するように修飾又は配合され得る。

【０２８９】

局所投与様式としては、例として、骨梁への骨髄内注射又は骨髄腔への大腿内注射及び門脈への注入が挙げられる。特定の実施形態では、全身投与（例えば、静脈内）と比較して局所的に（例えば、骨髄内に直接）投与された場合、（全身的アプローチと比較して）有意により少量の構成要素が効果を発揮し得る。局所投与法は、治療有効量の構成要素が全身投与された場合に起こることもある、潜在的に毒性の副作用の発生を低減又は排除し

得る。

【０２９０】

投与は、周期的ボーラス（例えば、静脈内）として又は内部リザーバー若しくは外部リザーバーからの持続注入（例えば、静注バッグ又は植込み型ポンプから）として提供され得る。構成要素は、例えば、持続放出薬物送達デバイスからの連続放出により、局所的に投与され得る。

【０２９１】

加えて、構成要素は、長時間にわたって放出されるように調合され得る。放出系は、生分解性材料又は拡散によって組み込まれた構成要素を放出する材料のマトリックスを含み得る。構成要素は、放出系内で均一又は不均一に分布し得る。多様な放出系が有用であり得るが、適切なシステムの選択は、特定の用途によって要求される放出速度に左右される。非分解性及び分解性放出系の両方が使用され得る。適切な放出系としては、ポリマー及びポリマーマトリックス、非ポリマーマトリックス又は炭酸カルシウム及び糖（例えば、トレハロース）などであるが、これに限定されるものではない無機及び有機賦形剤及び希釈剤が挙げられる。放出系は、天然又は合成であり得る。しかし、通常、より信頼でき、より再現可であり、より画定された放出プロファイルを生じることから、合成放出系が好ましい。放出系材料は、異なる分子量を有する構成要素は、材料を通じた又は材料の分解による、拡散によって放出されるように選択され得る。

【０２９２】

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

【０２９３】

ポリ（ラクチド－コ－グリコリド）微小球も使用され得る。典型的に、微小球は、中空球を形成するように構造化された乳酸及びグリコール酸ポリマーから構成される。球は、直径がおよそ１５～３０ミクロンであり得、本明細書に記載される構成要素が負荷され得る。いくつかの実施形態では、ゲノム編集システム、システム構成要素及び／又はシステム構成要素をコード化する核酸は、ポロキサマー又はポロキサミンなどのブロック共重合体と共に送達される。

【０２９４】

<u>構成要素の多峰性又は差動送達</u>

当業者は、本開示に鑑みて、本明細書で開示されるゲノム編集システムの異なる構成要素が一緒に又は別々に且つ同時に又は非同時に送達され得ることを理解するであろう。ゲノム編集システム構成要素の別々の及び／又は非同期の送達は、ゲノム編集システムの機能に対する時間的又は空間的制御を提供し、それらの活性によって引き起こされる特定の効果を制限するために特に望ましくあり得る。

【０２９５】

異なる又は差動様式は、本明細書の用法では、例えば、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ分子、

ｇＲＮＡ、鋳型核酸又はペイロードなどの対象構成要素分子に異なる薬力学的又は薬物動態特性を付与する送達様式を指す。例えば、送達様式は、例えば、選択された区画、組織又は臓器に異なる組織分布、異なる半減期又は異なる時間的分布をもたらし得る。

【０２９６】

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

【０２９７】

例として、例えば、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びｇＲＮＡなどのゲノム編集システムの構成要素は、その結果生じる、体内、特定の区画、組織又は臓器に送達された構成要素の半減期又は持続性に関して異なる様式によって送達され得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡはこのような様式によって送達され得る。ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ分子構成要素は、身体又は特定の区画、若しくは組織、若しくは臓器に対して、より低い持続性又はより少ない曝露をもたらす様式によって送達され得る。

【０２９８】

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

【０２９９】

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

【０３００】

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

【０３０１】

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

【０３０２】

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

【０３０３】

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

【０３０４】

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

【０３０５】

さらに、構成要素は、互いに補完して安全性及び組織特異性を高める異なる分子形態又

は異なる送達ベクターで送達され得る。

【０３０６】

差動送達様式の使用は、性能、安全性及び／又は有効性を高め得、例えば最終的なオフターゲット修飾の可能性を低減し得る。細菌由来Ｃａｓ酵素からのペプチドは、ＭＨＣ分子によって細胞表面に提示されるため、例えば、Ｃａｓ９分子などの免疫原性構成要素のより低持続性様式による送達は、免疫原性を低下させ得る。二部送達系は、これらの欠点を軽減し得る。

【０３０７】

差動送達様式を使用して、異なるが重複する標的領域に構成要素が送達され得る。形成活性複合体は、標的領域の重なりの外で最小化される。したがって、特定の実施形態では、例えば、ｇＲＮＡなどの第１の構成要素は、第１の送達様式によって送達され、例えば組織分布などの第１の空間的分布がもたらされる。例えば、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ分子などの第２の構成要素は、第２の送達様式によって送達され、例えば組織分布などの第２の空間的分布がもたらされる。特定の実施形態では、第１の様式は、リポソーム、例えばポリマーナノ粒子などのナノ粒子及び例えばウイルスベクターなどの核酸から選択された第１の要素を含む。第２の様式は、群から選択された第２の要素を含む。特定の実施形態では、第１の送達様式は、例えば、細胞特異的受容体又は抗体などの第１の標的化要素を含み、第２の送達様式はその要素を含まない。特定の実施形態では、第２の送達様式は、例えば、第２の細胞特異的受容体又は第２の抗体などの第２の標的化要素を含む。

【０３０８】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ分子がウイルス送達ベクター、リポソーム又はポリマーナノ粒子中で送達される場合、単一組織のみを標的化することが望ましいことがあり得る場合、複数組織への送達及びその中での治療活性の可能性がある。二部送達系は、この課題を解決し、組織特異性を高め得る。ｇＲＮＡ及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ分子が、別個であるが、重複する組織向性がある別々の送達ビヒクルにパッケージされれば、完全に機能的な複合体は、両方のベクターによって標的化される組織内のみに形成される。

【実施例】

【０３０９】

上記の原理及び実施形態は、以下の非限定的な実施例によってさらに示される：

実施例１：　ＨＢＧ１及びＨＢＧ２調節領域で１３ｎｔの欠失を引き起こすために使用される、リボ核タンパク質複合体としてＫ５６２細胞に送達されるＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）ｇＲＮＡのスクリーニング

ＨＢＧ１及びＨＢＧ２の１３ｎｔ標的領域の１３ヌクレオチドにかけて広がり且つそれを含む、２６ｎｔフラグメントを標的化するｇＲＮＡを標準的な方法で設計した。ｇＲＮＡをインシリコで設計して階層化した後、ｇＲＮＡのサブセットを選択し、ヒトＫ５６２細胞における活性及び特異性についてスクリーニングした。スクリーニングで選択されたｇＲＮＡは、表７に記載される。簡潔に述べると、ｇＲＮＡを生体外転写し、次にＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）野生型（Ｗｔ）Ｃａｓ９タンパク質に複合体化させ、リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）を形成した。Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９タンパク質に複合体化したｇＲＮＡは、修飾ｓｇＲＮＡ（（例えば、５’ＡＲＣＡキャップド及び３’ポリＡ（２０Ａ）尾部；表７）であり、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２調節領域を標的化した。Ｋ５６２細胞及びヒトＣＤ３４$^{+}$細胞におけるこれらのＲＮＰの活性を直接比較できるようにするために、ＲＮＰを最初に電気穿孔（Amaxa Nucleofector）によってＫ５６２細胞に送達した。

【０３１０】

ＲＮＰ電気穿孔の３日後、Ｋ５６２細胞からｇＤＮＡを抽出し、次にｇＤＮＡからＨＢＧ１及びＨＢＧ２遺伝子座をＰＣＲ増幅した。遺伝子編集は、ＰＣＲ産物中でＴ７Ｅ１エンドヌクレアーゼアッセイ解析によって評価した。９つのＲＮＰの８つが高い割合のＮＨＥＪをサポートした。ヒトＣＤ３４$^{+}$細胞において活性であることが示されている唯一のｇＲＮＡであるＳｐ３７ＲＮＰ（ＣＤ３４$^{+}$細胞において＜１０％編集）は、Ｋ５６２細

胞において高活性であり、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２の両方で＞６０％のインデルが検出され、プロモーター配列中のＨＢＧ１及びＨＢＧ２標的領域の両方に８つのカットがあった（図３Ａ）。

【０３１１】

【表７】

表 7:K562 細胞又は CD34$^+$細胞におけるスクリーニングのために選択された gRNA

gRNA ID	標的化ドメイン配列 (RNA)	標的化ドメイン配列 (DNA)	標的化ドメイン配列プラス PAM (NGG)(RNA)	標的化ドメイン配列プラス PAM (NGG)(DNA)	センス
Sp9	GGCUAUUGGU CAAGGCA (配列番号 277)	GGCTATTGGTC AAGGCA (配列番号 910)	GGCUAUUGGUCA AGGCAAGG (配列番号 920)	GGCTATTGGTCA AGGCAAGG (配列番号 930)	アンチセンス
Sp36	CAAGGCUAUU GGUCAAGGCA (配列番号 338)	CAAGGCTATT GGTCAAGGCA (配列番号 911)	CAAGGCUAUUGG UCAAGGCAAGG (配列番号 921)	CAAGGCTATTGG TCAAGGCAAGG (配列番号 931)	アンチセンス
Sp40	UGCCUUGUCA AGGCUAU (配列番号 327)	TGCCTTGTCAA GGCTAT (配列番号 912)	UGCCUUGUCAAG GCUAUUGG (配列番号 922)	TGCCTTGTCAAG GCTATTGG (配列番号 932)	アンチセンス
Sp42	GUUUGCCUUG UCAAGGCUAU (配列番号 299)	GTTTGCCTTGT CAAGGCTAT (配列番号 913)	GUUUGCCUUGUC AAGGCUAUUGG (配列番号 923)	GTTTGCCTTGTCA AGGCTATTGG (配列番号 933)	アンチセンス
Sp38	GACCAAUAGC CUUGACA (配列番号 276)	GACCAATAGC CTTGACA (配列番号 914)	GACCAAUAGCCU UGACAAGG (配列番号 924)	GACCAATAGCCT TGACAAGG (配列番号 934)	センス
Sp37	CUUGACCAAU AGCCUUGACA (配列番号 333)	CTTGACCAATA GCCTTGACA (配列番号 915)	CUUGACCAAUAG CCUUGACAAGG (配列番号 925)	CTTGACCAATAG CCTTGACAAGG (配列番号 935)	センス
Sp43	GUCAAGGCUA UUGGUCA ((配列番号 278)	GTCAAGGCTA TTGGTCA (配列番号 916)	GUCAAGGCUAUU GGUCAAGG (配列番号 926)	GTCAAGGCTATT GGTCAAGG (配列番号 936)	アンチセンス
Sp35	CUUGUCAAGG CUAUUGGUCA (配列番号 339)	CTTGTCAAGGC TATTGGTCA (配列番号 917)	CUUGUCAAGGCU AUUGGUCAAGG (配列番号 927)	CTTGTCAAGGCT ATTGGTCAAGG (配列番号 937)	アンチセンス
Sp41	UCAAGUUUGC CUUGUCA (配列番号 310)	TCAAGTTTGCC TTGTCA (配列番号 918)	UCAAGUUUGCCU UGUCAAGG (配列番号 928)	TCAAGTTTGCCTT GTCAAGG (配列番号 938)	アンチセンス
Sp34	UGGUCAAGUU UGCCUUGUCA (配列番号 340)	TGGTCAAGTTT GCCTTGTCA (配列番号 919)	UGGUCAAGUUUG CCUUGUCAAGG (配列番号 929)	TGGTCAAGTTTG CCTTGTCAAGG (配列番号 939)	アンチセンス
Sp85	AGUAUCCAGU GAGGCCA (配列番号 940)	AGTATCCAGT GAGGCCA (配列番号 943)	AGUAUCCAGUGA GGCCAGGG (配列番号 946)	AGTATCCAGTGA GGCCAGGG (配列番号 949)	アンチセンス
SpA	GGCAAGGCUG GCCAACCCAU (配列番号 941)	GGCAAGGCTG GCCAACCCAT (配列番号 944)	GGCAAGGCUGGC CAACCCAUGGG (配列番号 947)	GGCAAGGCTGGC CAACCCATGGG (配列番号 950)	センス
SpB	UAUUUGCAUU GAGAUAGUGU (配列番号 942)	TATTTGCATTG AGATAGTGT (配列番号 945)	UAUUUGCAUUGA GAUAGUGUGGG (配列番号 948)	TATTTGCATTGA GATAGTGTGGG (配列番号 951)	センス

【０３１２】

次に、８つの活性ｓｇＲＮＡで標的化されたＫ５６２細胞のＨＢＧ１及びＨＢＧ２ ＰＣＲ産物をＤＮＡ配列決定解析によって分析し、検出された挿入及び欠失について格付けした。標的部位における正確な１３ｎｔ欠失、１３ｎｔの標的部位の包括的且つ近位の小欠失（１８～２６ｎｔ）、１３ｎｔ標的部位の１２ｎｔ欠失（すなわち部分的欠失）、ＨＰＦＨ標的部位の一部に及ぶ＞２６ｎｔの欠失及び例えばＨＰＦＨ標的部位の近位であるが、外側の欠失などの他の欠失に欠失をさらに細分化した。８つのｓｇＲＮＡの７つは、ＨＢＧ１の１３ｎｔの欠失（ＨＰＦＨ変異誘導）を標的化した（図３Ｂ）。８つのｓｇＲＮＡの少なくとも５つは、ＨＢＧ２プロモーター領域の１３ｎｔの標的化欠失もサポートした（図３Ｃ）。ＨＢＧ Ｓｐ３４ ｓｇＲＮＡ処理細胞におけるＨＢＧ２のＤＮＡ配列の結果は、得られなかったことに留意されたい。これらのデータは、Ｃａｓ９及びｓｇＲＮＡが１３ｎｔの欠失の正確な誘導をサポートすることを示す。図３Ｂ～３Ｃは、ＨＢＧ１中

の標的配列で観察された欠失のタイプの例を示す。

【０３１３】

実施例２：　１３ｎｔ欠失変異を標的化するｇＲＮＡを含有するＣａｓ９ ＲＮＰは、ヒト造血幹／前駆細胞における遺伝子編集をサポートする

ヒト臍帯血（ＣＢ）ＣＤ３４$^+$細胞において試験された異なるｇＲＮＡを含有するＲＮＰのうち、Ｓｐ３７のみが、３人の臍帯血ドナーからの電気穿孔されたＣＢ ＣＤ３４$^+$細胞から抽出されたｇＤＮＡから増幅された、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２特異的ＰＣＲ産物中のインデルのＴ７Ｅ１解析によって判定されるように、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２プロモーター中の標的部位で検出可能な編集をもたらした（図４Ａ）。Ｓｐ３７に複合体化したＣａｓ９タンパク質で電気穿孔された細胞で検出された編集の平均レベルは、ＨＢＧ１では５±２％インデル、ＨＢＧ２では３±１％インデルであった（別々の３回の実験及び３人のＣＢドナー）。

【０３１４】

次に、その標的部位がＨＢＧプロモーター内にある３つのＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）ｇＲＮＡ（Ｓｐ３５、Ｓｐ３６、Ｓｐ３７）を野生型Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９タンパク質に複合体化させ、リボ核タンパク質複合体を形成した。これらのＨＢＧ標的化ＲＮＰをＣＢ ＣＤ３４$^+$細胞（ｎ＝３人のドナー）及び成人動員末梢血（ｍＰＢ）ＣＤ３４$^+$細胞ドナー（ｎ＝３人のドナー）に電気穿孔した。次に、Ｃａｓ９ ＲＮＰ送達のおよそ３日後にサンプルから抽出されたゲノムＤＮＡから増幅されたＨＢＧ２ ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１エンドヌクレアーゼ解析により、標的部位における挿入／欠失のレベルを解析した。これらのＲＮＰのそれぞれは、３人のドナー及び３回の別々の実験において、ＣＢ及び成人ＣＤ３４$^+$細胞の両方で低レベルの遺伝子編集のみをサポートした（図４Ｂ）。

【０３１５】

遺伝子編集と標的部位における１３ｎｔ欠失の発生とを増加させるために、標的化欠失部位の両側に８７ｎｔ及び８９ｎｔの相同性をコード化する一本鎖デオキシリボヌクレオチドドナー修復鋳型（ｓｓＯＤＮ）を生成した。ｓｓＯＤＮは、末端が未修飾であり（すなわちｓｓＯＤＮ１、表８の配列番号９０６）又は５’及び３’末端にホスホロチオエート（ＰｈＴｘ）を含有するように修飾した（すなわちＰｈＴｘ ｓｓＯＤＮ１、表８の配列番号９０９）。ｓｓＯＤＮは、１３ｎｔの欠失を「コード化」して、この存在しない配列に隣接するように操作された配列相同性アームが完全欠失を生成するように設計した。

【０３１６】

【表８】

表 8: デオキシヌクレオチドドナー修復鋳型 (ssODN)

ssODN ID	配列番号	配列
ssODN1 5'相同性アーム	904	GGGTGCTTCCTTTTATTCTTCATCCCTAGCCAGCCGCCGGCCCCTG GCCTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTT
ssODN1 3'相同性アーム	905	GTCAAGGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAGGGACC GTTTCAGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGAAGGGG
ssODN1	906	GGGTGCTTCCTTTTATTCTTCATCCCTAGCCAGCCGCCGGCCCCTG GCCTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGTCAA GGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAGGGACCGTTTCA GACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGAAGGGG
PhTx ssODN1 5'相同性アーム	907	G*GGTGCTTCCTTTTATTCTTCATCCCTAGCCAGCCGCCGGCCCCT GGCCTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTT
PhTx ssODN1 3'相同性アーム	908	GTCAAGGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAGGGACC GTTTCAGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGAAGGG*G
PhTx ssODN1	909	G*GGTGCTTCCTTTTATTCTTCATCCCTAGCCAGCCGCCGGCCCCT GGCCTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGTCA AGGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAGGGACCGTTTC AGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGAAGGG*G

欠失に隣接する相同性アームは太字の[5'相同性アーム]及び下線付きの[3' 相同性アーム]で示される)。
ssODN1 及び PhTx ssODN1 における 13 bp 配列の不在に留意されたい。
*ホスホロチオエートによる修飾を表す。

【０３１７】
ｓｓＯＤＮ１及びＰｈＴｘ ｓｓＯＤＮ１は、Ｓｐ３７ｇＲＮＡ（ＨＢＧ Ｓｐ３７ＲＮＰ）を含有するＨＢＧ又はＨＢＧ Ｓｐ３５（ＨＢＧ Ｓｐ３５ＲＮＰ）を標的化するＲＮＰと共にＣＢ ＣＤ３４$^+$細胞に同時送達した。１３ｎｔ欠失をコード化するｓｓＯＤＮドナーのＨＢＧ Ｓｐ３５ＲＮＰ又はＨＢＧ Ｓｐ３７ＲＮＰとの同時送達は、ＨＢＧ２ ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１解析によって判定されるように、それぞれ標的部位の遺伝子編集の６倍及び５倍の増加をもたらした（図４Ｃ）。ＨＢＧ２ＰＣＲ産物のＤＮＡ配列決定解析（サンガー配列決定法）は、ＨＢＧ Ｓｐ３７ＲＮＰ及びＰｈＴｘ修飾ｓｓＯＤＮ１で処理された細胞における、１５％の欠失及び５％の挿入を伴う２０％の遺伝子編集を示した（図４Ｃ、左下のパネル）。標的部位における欠失の特定の種類と大きさのさらなる解析は、検出された全欠失の７５％が１３ｎｔ欠失（近位プロモーター中のＣＡＡＴボックスのｃ．－１１０における欠失を含む）を含有し、その欠失がＨｂＦ発現の上昇と関連していたことを明らかにした（図４Ｃ、右下のパネル）。残りの１／４の欠失は、完全な１３ｎｔ欠失に及ばない部分欠失であった。これらのデータは、欠失を有するように設計された相同的なｓｓＯＤＮの同時送達がヒトＣＤ３４$^+$細胞中のＨＢＧにおける正確な遺伝子編集（欠失）をサポートしたことを示す。

【０３１８】
<u>実施例３： １３ｎｔ欠失変異を標的化するＣａｓ９ ＲＮＰは、ヒト成人動員末梢血造血幹／前駆細胞における赤芽球子孫における遺伝子編集をＨＢＧ発現の増加と共にサポートする</u>

ＨＢＧのプロモーター中のＳｐ３７ｇＲＮＡ又はＳｐ３５ｇＲＮＡ（すなわちＨＰＦＨに関連する１３ｎｔ欠失を標的化するｇＲＮＡ）に複合体化したＣａｓ９ ＲＮＰによるＨＢＧの編集が、編集されたＣＤ３４$^+$細胞の赤血球子孫におけるＨＢＧ発現の増加をサポートするかどうかを判定するために、動員末梢血（ｍＰＢ）からのヒト成人ＣＤ３４$^+$細胞をＲＮＰで電気穿孔した。簡潔に述べると、ｍＰＢ ＣＤ３４$^+$細胞をヒトサイトカイン及びＰＧＥ２と共にＳｔｅｍＳｐａｎ ＳＦＥＭ中で２日間予備刺激し、次にＳｐ３５及びＳｐ３７に予備複合体化したＣａｓ９タンパク質でそれぞれ電気穿孔した。ＨＢＧ ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１解析は、Ｓｐ３７に複合体化したＲＮＰで処理されたｍＰＢ ＣＤ３４$^+$細胞では約３％のインデルが検出された一方、Ｓｐ３５に複合体化したＲＮＰで処理された細胞では編集が検出されなかったことを示した（図５Ａ）。

【０３１９】
標的部位における遺伝子編集を増加させ、標的部位における１３ｎｔ欠失の発生を増加させるために、ＰｈＴｘ ｓｓＯＤＮ１（配列番号９０９）を、Ｓｐ３７ｇＲＮＡを含有するＨＢＧを標的化する予備複合体化ＲＮＰと共に同時送達した。１３ｎｔの欠失をコード化するｓｓＯＤＮドナーの同時送達は、標的部位の遺伝子編集にほぼ２倍の増加をもたらした（図５Ａ）。ＨＢＧの編集が、編集された成人ＣＤ３４$^+$細胞の赤血球子孫における胎児型ヘモグロビンの産生を増加させるかどうかを判定するために、ヒトサイトカイン（エリスロポエチン、ＳＣＦ、ＩＬ３）、ヒト血漿（Octoplas）及び他の補給剤（ヒドロコルチゾン、ヘパリン、トランスフェリン）の存在下で細胞を最大１８日間培養して赤芽球に分化させた。分化の時間経過にわたってｍＲＮＡを採取し、ＲＮＰ処理ｍＰＢ ＣＤ３４$^+$細胞及びドナー適合陰性（未処理）対照の赤血球子孫におけるＨＢＧ遺伝子発現を評価した。分化７日目までに、ＨＢＧ Ｓｐ３７ＲＮＰと、ｓｓＯＤＮをコード化する１３ｎｔ欠失（約５％のインデルがＴ７Ｅ１解析によりバルク細胞集団からｇＤＮＡ中に検出された）とで処理されたヒトＣＤ３４$^+$細胞の赤芽球子孫は、ＨＢＧ ｍＲＮＡ産生の２倍の増加を示した（図５Ｂ）。重要なことに、ＨＢＧ ＲＮＰで電気穿孔されたＣＤ３４$^+$細胞は、造血コロニー形成細胞（ＣＦＣ）アッセイで判定されるように、それらの生体外造血活性を維持した（すなわち未処理ドナー適合ＣＤ３４$^+$細胞陰性対照と比較して赤血球コロニー及び骨髄球コロニーの量又は多様性に差はなかった）（図６Ａ）。さらに、ＲＮＰ処理ＣＤ３４$^+$細胞から分化した赤芽球は、赤血球表現型（％グリコフォリンＡ$^+$細胞）の取得のための流動分析によって判定されるように、ドナー適合未処理対照細胞で観察され

た分化の動態を維持した（図６Ｂ）。これらのデータは、ＨＢＧ１／ＨＢＧ２近位プロモーター領域の標的化妨害が、分化能を改変することなく、ＲＮＰ処理成人造血幹／前駆細胞の赤血球子孫におけるＨＢＧ発現の増加をサポートしたことを示す。

【０３２０】

実施例４：　ＨＰＦＨ変異を標的化するＣａｓ９ ＲＮＰは、ヒト成人動員末梢血造血幹／前駆細胞における赤芽球子孫における遺伝子編集をＨＢＧ発現の増加と共にサポートする

ＨＢＧを標的化する対合ニッカーゼＲＮＰの同時送達が近位ＨＢＧプロモーターの標的化妨害を増加させるかどうかを判定するために、ｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞をヒトサイトカイン及びＰＧＥ２と共にＳｔｅｍＳｐａｎ ＳＦＥＭ中で２日間培養し、次に１３ｎｔの欠失部位に隣接する部位を標的化する２つのｇＲＮＡに予備複合体化したＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｄ１０Ａ Ｃａｓ９タンパク質で電気穿孔した。本実施例のニッカーゼ対で使用されるｇＲＮＡの標的化ドメイン配列（限定することなく、ＳｐＡ、Ｓｐ８５及びＳｐＢをはじめとする）は、表７に示される。Ｄ１０Ａニッカーゼ対は、標的のＰＡＭが外側を向き、切断部位間の距離が＜１００ｎｔであるように選択された。ｇＲＮＡをＤ１０Ａ Ｃａｓ９タンパク質に複合体化させてＲＮＰ複合体を形成し、次にヒトＣＤ３４$^{+}$細胞及び対合ニッカーゼを電気穿孔に供した。１３ｎｔの欠失をコード化するｓｓＯＤＮの同時送達が編集及び細胞への変異導入を増加させるかどうかを判定するために、いくつかの実験では、ｓｓＯＤＮ１を電気穿孔前に細胞のＲＮＰ混合物に添加した。電気穿孔のおよそ３日後、ＲＮＰ処理細胞からｇＤＮＡを抽出し、抽出されたｇＤＮＡから増幅されたＨＢＧ２ ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１エンドヌクレアーゼアッセイ及び／又はサンガーＤＮＡ配列決定によって解析した。試験された３つのＤ１０Ａニッカーゼ対のうち、Ｔ７Ｅ１エンドヌクレアーゼ解析によって検出されたインデルは、ｓｓＯＤＮ１が含まれる１つのニッカーゼ対（ｇＲＮＡ　ＳｐＡ＋Ｓｐ８５）サンプルで増加した（図７Ａ）。図７Ａに示される限定的サンプル上でＤＮＡ配列決定解析を実施した。ＤＮＡ配列決定解析は、標的部位における最大で約２７％のインデルを示し、検出された優性なインデルは、挿入であり、標的化領域（対合ニッカーゼの切断部位間の領域）の欠失がそれに続き、欠失をコード化するｓｓＯＤＮ１が同時送達された場合、１３ｎｔの欠失変異も２～３％の頻度で検出された（図７Ｂ）。サイレントの非病原性ＳＮＰは、ｓｓＯＤＮ１ドナー鋳型に含まれており、１３ｎｔ欠失を含有した配列中で検出され、ＨＦＰＨ変異の生成は、ＨＤＲ事象を通じて起こったことが示唆された。

【０３２１】

実施例５：　成人ＣＤ３４＋細胞に電気穿孔されたＤ１０Ａ対合ＲＮＰは、赤血球子孫におけるＨｂＦタンパク質の誘導をサポートする

標的部位におけるｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞の編集条件をさらに最適化し、追加的なヒト細胞ドナーにおける編集を評価するために、ＨＢＧを標的化するＤ１０Ａ Ｃａｓ９及びＷＴ Ｃａｓ９対合ＲＮＰでヒトｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞を電気穿孔した。Ｄ１０Ａ Ｃａｓ９及びＷＴ Ｃａｓ９ ＲＮＰの両方に対して最も効率的なガイド対は、Ｓｐ３７＋ＳｐＡであり、これは、ＨＢＧ２ ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１エンドヌクレアーゼ解析によって判定されるように、＞３０％のインデルをサポートした（図８Ａ）。ＨＢＧ１及びＨＢＧ２の両方における編集がＨＢＧ２及びＨＢＧ２とＨＢＧ１との間の遺伝子間領域の大規模な欠失をもたらし得ることを考慮して、Ｔ７Ｅ１エンドヌクレアーゼアッセイ及び配列決定によって局所的なインデルを捕捉し、ｄｄＰＣＲ分析によって大規模な欠失を捕捉するためにインデルをさらに特性決定した。全サンプルでＤ１０Ａ Ｃａｓ９及びＷＴ Ｃａｓ９ ＲＮＰニッカーゼ対の両方について様々な頻度で大型欠失が検出された（図８Ｂ）。インデルのIllumina配列解析は、Ｔ７Ｅ１解析によって判定されたインデルと相関した（図８Ｃ～８Ｄ）。

【０３２２】

ＨＢＧプロモーターの二重ニッカーゼで編集されたＣＤ３４$^{+}$細胞が、ＨｂＦ発現が上昇した赤血球子孫を産生するかどうかを判定するために、ドナー適合ＲＮＰ処理対照及び未処理対照を赤血球分化に向けて誘導し、次に分化中のインデルの維持及びＨｂＦ　ｍＲ

ＮＡ及びタンパク質の発現について評価した。編集のレベル（Ｔ７Ｅ１エンドヌクレアーゼアッセイによって判定された）は、ＲＮＰ処理細胞の子孫において、核除去前に赤血球分化の最初の２週間にわたって評価した。アッセイした全ての時点で赤血球子孫においてインデルが検出され、ＣＤ３４$^{+}$細胞で発生した編集が赤血球分化中に維持され、編集され、ＣＤ３４$^{+}$細胞が赤血球分化能を維持したことが示唆された。

【０３２３】

ＨＢＧ ｍＲＮＡ（分化の１０日目）及びＨｂＦタンパク質（分化の２０～２３日目）のレベルは、それぞれｄｄＰＣＲ及びＨＰＬＣ分析（Chang 2017（参照により本明細書に援用される）の１４３～１４４ページに記載されているＨＰＬＣ法による）によって定量化した（図９）。ＨＢＧ：ＨＢＡの比率（データ未掲載）について、約２倍の増加（ＨＢＧ転写物対未編集ドナー適合対照では４０％増）が観察され、ＨｂＦ／ＨｂＦ＋ＨｂＡの比率（すなわちＨＢＧ ｍＲＮＡ／ＨＧＢ＋ＨＢＢ ｍＲＮＡ）は、ドナー適合未処理対照サンプルで検出されたレベルを３０％超えるレベルまで増加した。

【０３２４】

Ｄ１０Ａ Ｃａｓ９ニッカーゼ対では、赤血球子孫においてＨｂＦ ｍＲＮＡ及びタンパク質の上方制御が検出された（図９）。ＨｂＦタンパク質分析に関して、２つの対が２つのＤ１０Ａニッカーゼ対について２０％のＨｂＦ誘導をサポートした。ＷＴ Ｃａｓ９ ＲＮＰ処理ＣＤ３４$^{+}$細胞の赤血球子孫では、ＨｂＦ上方制御は、検出されなかった（データ未掲載）。

【０３２５】

<u>実施例６： ＲＮＰの用量の増加は、ＨＢＧ遺伝子座のヒト成人ＣＤ３４$^{+}$細胞における全編集効率を増加させる</u>

ニッカーゼ対ＳｐＡ＋Ｓｐ８５に対するＤ１０Ａ Ｃａｓ９ ＲＮＰの濃度を増加させ（２．５μＭ標準濃度及び３．７μＭ）、電気穿孔によってｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞に送達した。ＲＮＰ濃度の増加は、ＣＤ３４$^{+}$細胞の電気穿孔の３日後に抽出されたｇＤＮＡついて増幅されたＨＢＧ ＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１エンドヌクレアーゼ解析によって判定されるように、ＨＢＧ標的部位におけるインデルの増加を＞３０％までサポートした（図１０Ａ）。配列解析は、ＲＮＰ濃度の増加が挿入を増加させることを示した（図１０Ｂ）。ＲＮＰ処理ＣＤ３４$^{+}$細胞の赤血球子孫もＨｂＦタンパク質産生の増加を有した（図１０Ｃ）。重要なことに、編集後に造血コロニー形成能が維持された（図１０Ｄ）。次に、これらの細胞を免疫不全マウスに移植し、移植の１か月後（図１０Ｅ）及び２か月後（図１０Ｆ）に末梢血を試料採取して、ヒトＣＤ４５$^{+}$細胞の百分率を測定することによって生着を評価した。初期の生着データは、ドナー適合未処理対照（０μＭ ＲＮＰ）のレシピエントコホートと、ＲＮＰ処理細胞を移植されたマウスとの間で生着に差がないことを示した。さらに、示された時点でコホート間にヒトＣＤ４５$^{+}$画分内のヒト血液系統の分布（骨髄、Ｂ細胞、Ｔ細胞）の違いはなかった（図１０Ｇ～Ｈ）。

【０３２６】

２つの追加的なＤ１０Ａニッカーゼ対も成人ｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞（Ｓｐ３７＋ＳｐＡ、Ｓｐ３７＋ＳｐＢ）におけるＲＮＰ用量反応試験で試験した。ここで、ｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞は、全ＲＮＰの０、２．５及び３．７５μＭで送達されたＤ１０Ａ対合ニッカーゼで電気穿孔した。ＲＮＰ処理細胞を赤血球子孫に分化させ、ＨｂＦタンパク質レベル（％ＨｂＦ／ＨｂＦ＋ＨｂＡ）をＨＰＬＣ分析によって分析した。編集とＨｂＦ誘導とを相関させるために、ＣＤ３４$^{+}$細胞で検出されたインデル頻度を赤血球子孫で検出されたＨｂＦレベルと共にプロットした（図１１Ａ）。ＲＮＰ処理及び未処理対照ｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞は、コロニーに分化させ、生体外造血活性も評価した。コロニー形成細胞（ＣＦＣ）活性は、ＲＮＰ処理細胞及びドナー適合未処理対照ＣＤ３４$^{+}$細胞の子孫で維持された（図１１Ｂ）。未処理のドナー適合対照ＣＤ３４$^{+}$細胞と比較して異なる用量で異なるＤ１０Ａ ＲＮＰ対に曝露された細胞では、移植の１ヶ月後におけるマウス末梢血中のヒトＣＤ４５$^{+}$細胞の百分率に差はなく、血液系統分布に差はなかった（図１１Ｃ～Ｄ）。

【０３２７】

実施例７：　ＢＣＬ１１Ａの赤芽球特異的エンハンサーを標的化するＲＮＰと、非特異的（Ｎ）一本鎖デオキシヌクレオチド配列又は対合ＲＮＰとの同時送達は、ヒトＣＤ３４$^{+}$細胞における遺伝子編集を増加させ、赤血球子孫における胎児型ヘモグロビン発現の誘導をサポートする

胎児型ヘモグロビンの発現は、転写リプレッサー、ＢＣＬ１１Ａの赤血球細胞特異的発現の標的化妨害を通じて誘導され得る（Canvers 2015）。遺伝子編集ストラテジーを通じてＨｂＦ発現を増加させる１つの可能なストラテジーは、ＨＢＧ近位プロモーターに関連する１３ｎｔ欠失を導入するための、且つＢＣＬ１１Ａ遺伝子のイントロン２の＋５８ＤＨＳ領域にあるＢＣＬ１１Ａの赤血球特異的エンハンサー中のＧＡＴＡ１結合モチーフを標的化妨害するための多重遺伝子編集である（図１２）。多重遺伝子編集を通じてＨｂＦ発現を増加させるこの多重ストラテジーを達成するには、ＢＣＬ１１Ａ赤血球エンハンサー（ＢＣＬ１１Ａｅ）の妨害の効果を単一編集事象として最初に判定しなくてはならない。

【０３２８】

この実験では、ＢＣＬ１１Ａ遺伝子のイントロン２の＋５８　ＤＨＳ領域内のＧＡＴＡ１モチーフを標的化する生体外転写ｓｇＲＮＡ（ｇＲＮＡ　ＳｐＫ、表９）に複合体化したＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）ＷＴ　Ｃａｓ９で、ＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞を電気穿孔した（図１３Ａ）。非標的特異的ｓｓＯＤＮの同時送達が標的配列の編集を増加させるかどうかを判定するために、ＢＣＬ１１Ａｅ　ＲＮＰをｓｓＯＤＮ（ＢＣＬ１１Ａｅ標的配列に非相同的である）と共にＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞に同時送達した。ＢＣＬ１１Ａｅ　ＲＮＰ処理ＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞から抽出されたｇＤＮＡからのＢＣＬ１１Ａ赤血球エンハンサーＰＣＲ産物のＴ７Ｅ１解析は、約５％のインデルが達成されたことを示した（図１３Ａ）。ＢＣＬ１１Ａｅ　ＲＮＰと非標的特異的ｓｓＯＤＮとの共配は、Ｔ７Ｅ１エンドヌクレアーゼ解析によって検出されるインデルを２０％に５倍増加させた。Illumina配列解析は、編集の＞９０％がＢＣＬ１１Ａ遺伝子のイントロン２の＋ＤＨＳ　５８領域エンハンサー中のＧＡＴＡ１モチーフに妨害を有したことを示した（データ未掲載）。編集を増加させるために、ヒトＣＢ　ＣＤ３４$^{+}$細胞をＷＴ　Ｃａｓ９　ＲＮＰ（ＷＴ　Ｃａｓ９に複合体化した単一ｇＲＮＡ）又はＷＴ　Ｃａｓ９対合ＲＮＰ（ＷＴ　Ｃａｓ９に複合体化した対合ｇＲＮＡ）で電気穿孔し、各対の切断部位がＧＡＴＡ１モチーフ（ｇＲＮＡ　ＳｐＣ、ＳｐＫ、ＳｐＭ、ＳｐＮ）の切除のために標的部位を挟むようにした（表９）。２つの単一ｇＲＮＡ及び２つの対は、Ｔ７Ｅ１エンドヌクレアーゼ解析によって判定されるように、＞５０％のインデルを有した（図１３Ｂ）。

【０３２９】

【表９】

表9:CD34+細胞におけるスクリーニングのための*BCL11A* 赤血球エンハンサーを標的とするgRNA 配列の選択

gRNA ID	標的化ドメイン配列 (RNA)	標的化ドメイン配列 (DNA)	標的化ドメイン配列プラス PAM (NGG)(RNA)	標的化ドメイン配列プラス PAM (NGG)(DNA)	センス
SpK	CUAACAGUUG CUUUUAUCAC (配列番号 952)	CTAACAGTTG CTTTTATCAC (配列番号 956)	CUAACAGUUGC UUUUAUCACAG G (配列番号 960)	CTAACAGTTGC TTTTATCACAGG (配列番号 964)	アンチセンス
SpM	GGGCGUGGGU GGGGUAGAAG (配列番号 953)	GGGCGTGGG TGGGGTAGA AG (配列番号 957)	GGGCGUGGGUG GGGUAGAAGAG G (配列番号 961)	GGGCGTGGGTG GGGTAGAAGAG G (配列番号 965)	アンチセンス
SpN	CUCUUAGACA UAACACACCA (配列番号 954)	CTCTTAGACA TAACACACCA (配列番号 958)	CUCUUAGACAU AACACACCAGG G (配列番号 962)	CTCTTAGACAT AACACACCAGG G (配列番号 966)	アンチセンス
SpC	AUCAGAGGCC AAACCCUUCC (配列番号 955)	ATCAGAGGC CAAACCCTTC C (配列番号 959)	AUCAGAGGCCA AACCCUUCCUG G (配列番号 963)	ATCAGAGGCCA AACCCTTCCTG G (配列番号 967)	センス

【０３３０】

次に、ヒト成人骨髄ＣＤ３４$^+$細胞をＢＣＬ１１Ａｅ ＲＮＰで電気穿孔した。骨髄ＣＤ３４$^+$細胞から抽出されたｇＤＮＡから増幅されたＢＣＬ１１Ａ ＰＣＲ産物のＤＮＡ配列解析から、挿入及び欠失を含む１５％の遺伝子編集が示された（図１４Ａ）。重要なことに、全ての欠失はＧＡＴＡ１モチーフの欠失をもたらし、全ての挿入はモチーフ中の少数のｂｐの付加を通じてＧＡＴＡ１モチーフを妨害した。ＣＤ３４$^+$細胞をコロニー形成アッセイに播種し、ＣＤ３４$^+$細胞クローンに相当する混合造血コロニー（ＧＥＭＭ）を採取した。ｇＤＮＡを単離し、Illumina配列決定によって解析し、標的部位の単一対立遺伝子及び二対立遺伝子の妨害を定量化した。ＣＤ３４$^+$細胞クローンから分化したＧＥＭＭのほとんどは、単一対立遺伝子妨害を有して二対立遺伝子の妨害も検出され、バルクＣＤ３４＋細胞集団で検出されたものと比較して全体的なインデル率が約２／３高くなっていた（図１４Ｂ）。これは、存在する他の系統と対比して不均一なＣＤ３４$^+$細胞のより大きい割合を占めるＧＥＭＭを生じるが、短期のＣＦＣアッセイでは捕捉／区別されない一般的な骨髄前駆細胞（ＣＭＰ）の百分率の反映であると思われた。ＲＮＰ処理骨髄ＣＤ３４$^+$細胞は、ドナー適合未処理対照細胞と比較して赤血球成熟（核除去、図１４Ｃ）及び分化（表現型獲得、図１４Ｄ）の類似した動態も維持した。編集された骨髄ＣＤ３４$^+$細胞の赤血球子孫は、フローサイトメトリー分析によって判定されるように、ＨｂＦ誘導の約５倍の増加を示した（図１４Ｅ）。

【０３３１】

遺伝子編集及び胎児型ヘモグロビンの誘導は、ヒト成人ｍＰＢ ＣＤ３４$^+$細胞でも評価した。ＢＣＬ１１Ａｅ ＲＮＰ及び非特異的ｓｓＯＤＮの同時送達は、標的部位において約２０％のインデルをサポートした（図１５Ａ）。編集された細胞の赤血球子孫における胎児型ヘモグロビンの早期誘導を評価するために、ｍＰＢ ＣＤ３４$^+$細胞を赤芽球に分化させ、胎児型ヘモグロビン転写（ＨＢＧ ｍＲＮＡ）の誘導をｑＲＴ－ＰＣＲ解析によって評価した。ＢＣＬ１１Ａｅ ＲＮＰ処理ＣＤ３４$^+$細胞の赤血球子孫は、未処理対照と比較してＨＢＧ ｍＲＮＡの２倍の誘導を示し、胎児型ヘモグロビン発現の誘導が示唆された（図１５Ｂ）。ＲＮＰ処理骨髄ＣＤ３４$^+$細胞も、ドナー適合未処理対照細胞と比較して同様の分化の動態（表現型獲得、図１５Ｃ）を維持した。

【０３３２】

実施例８：　ヒト造血幹／前駆細胞中のＨＢＧプロモーターにおける遠位ＣＣＡＡＴボックスを標的化するＣａｓ９　ＲＮＰの電気穿孔は、赤血球分化後のＨＢＧ発現を促進するいくつかの欠失を生成する

胎児型ヘモグロビン（ＨＰＦＨ表現型）の遺伝性持続性は、ＨＢＧ遠位ＣＣＡＡＴボックスと重なる１３ｎｔの欠失を有する患者で観察される。ＨＢＧ遠位ＣＣＡＡＴボックスを標的化するＣａｓ９－ＲＮＰは、おそらくＨＢＧ発現を抑制する転写因子の結合部位を妨害することにより、ＨＰＦＨ表現型を再現するために造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）で使用され得る。Ｃａｓ９　ＲＮＰによって生成されるＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）は、ＲＮＰ切断部位の近位の挿入及び欠失などの様々な修復結果をもたらし得る。導入されたインデルのいくつかは、抑制因子の結合をより非効率的に阻害し得る。ｓｓＯＤＮドナー鋳型を使用して、ＨＢＧ遺伝子の発現をもたらす特定の欠失に向かう修復を指示することにより、ＨＰＦＨ表現型を再現するインデルの頻度を改善し得ることが想定された。

【０３３３】

ＨＢＧプロモーターにおいて遠位ＣＣＡＡＴボックスを標的化するＣａｓ９－ＲＮＰの修復結果を評価するために、Ｃａｓ９を化学的に合成されたガイドＲＮＡ　ＯＬＩ７０６６（表１０の配列番号９７０）に複合体化させ（「ＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ」）、１６μＭのＲＮＰをＨＳＰＣに電気穿孔した。電気穿孔の２日後に実施された配列解析（次世代配列決定法）は、２３．７％の対立遺伝子が自然発生のＨＰＦＨ変異と同一の１３ｎｔ欠失を保有することを示した（図１６、１３ｎｔ欠失は「Δ－１０２：－１１４」で示される）。また、ＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ切断部位の周辺では、いくつかの他の頻繁な欠失が観察された（図１６）。

【０３３４】

【表１０】

表 10:末端修飾含有又は非含有の、CCAAT ボックスを標的とする化学的に合成された gRNA の配列。

名称	Oli-ID	gRNA 配列 (RNA)	gRNA 配列 (DNA)
Sp35 未修飾	OLI7066	CUUGUCAAGGCUAUUGGUCAG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号 970)	CTTGTCAAGGCTATTGGTCA GTTTTAGAGCTAGAAATAGC AAGTTAAAATAAGGCTAGTC CGTTATCAACTTGAAAAAGT GGCACCGAGTCGGTGCTTTT (配列番号 972)
Sp35 5'-3' PSOMe	OLI8394	mC*mU*mU*GUCAAGGCUAUUGG UCAGUUUUAGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCmU*mU* mU*U (配列番号 971)	mC*mT*mT*GTCAAGGCTATT GGTCAGTTTTAGAGCTAGAA ATAGCAAGTTAAAATAAGGC TAGTCCGTTATCAACTTGAA AAAGTGGCACCGAGTCGGTG CmT*mT*mT*T (配列番号 973)

*:ホスホロチオエート修飾を表す
m:2-o-メチル修飾を表す

【０３３５】

単細胞実験を実施して、遠位ＣＣＡＡＴボックスを標的化するＲＮＰ（ｇＲＮＡ　ＯＬＩ７０６６（配列番号９７０）に複合体化したＣａｓ９（「ＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ」））の送達によって生成された最も頻度の高い欠失によって誘導されるＨｂＦ発現のレベルを評価した。簡潔に述べると、遠位ＣＣＡＡＴボックスを標的化するＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ複合体で電気穿孔された単一ＨＳＰＣを単一ウェルに播種して、ヒトサイトカイン（エリスロポエチン、ＳＣＦ、ＩＬ３）、ヒト血漿（Octoplas）及び他の補給剤（ヒドロコルチゾン、ヘパリン、トランスフェリン、インスリン）の存在下で１８日間培養することによって赤血球細胞に分化させた。各単一細胞からの赤血球子孫の一部は、ｇＤＮＡ抽出のために１４日後に分割した。ＨＢＧ１及びＨＢＧ２からのＰＣＲ産物の配列解析を実施して、各クローン集団の遺伝子型を同定した。各クローン集団のゲノムＤＮＡ上でｄｄＰＣＲ解析も実施して、ＨＢＧ１及びＨＢＧ２のガイドＲＮＡ標的部位間の４．９ｋｂ断片

の欠失を検出した。１８日目に各クローンに由来する赤血球細胞を溶解し、グロビン鎖の相対発現を超高性能液体クロマトグラフィー（ＵＰＬＣ）によって測定した。最後に、それぞれＨＢＧ１及びＨＢＧ２に保有されるインデルと、［γ鎖］／［全γ鎖＋β鎖］によって決定されるＧγ-グロビン、Ａγ-グロビン鎖発現（又は４．９ｋｂ欠失に起因するＡＧγ-グロビン）とのレベルを相対的に比較した。ＨＰＦＨ遺伝子型を再現する１３ｎｔ欠失は、ＨＢＧ発現を誘導することが示された。さらに、同等のレベルでＨＢＧ発現を誘導する、いくつかの固有の非自然発生の欠失が同定された。これらとしては、ＨＢＧΔ－１１２：－１１５（「４ｎｔ欠失」）、ＨＢＧΔ－１０４：－１２１（「１８ｎｔ欠失」）、ＨＢＧΔ－１１６（「１ｎｔ欠失」）が挙げられる（図１７Ａ～Ｄ）。

【０３３６】

実施例９： 遠位ＣＣＡＡＴボックスの領域又はその近傍の領域を標的化するＣａｓ９ ＲＮＰと、ｓｓＯＤＮドナーとの同時送達は、ヒト造血幹／前駆細胞における正確な遺伝子編集及び赤血球子孫におけるγ-グロビン発現の増加をサポートする

ＨＳＰＣにおけるＨｂＦ誘導インデルの頻度を改善するために、同定されたＨｂＦ誘導欠失（例えば、「１ｎｔ」（ＨＢＧΔ－１１６）及び「４ｎｔ」（ＨＢＧΔ－１１２：－１１５）欠失）を「コード化する」一本鎖デオキシヌクレオチドドナー修復鋳型（ｓｓＯＤＮ）を設計した（図１８）。これらの欠失を誘導するために使用されたｓｓＯＤＮは、以下のとおりであった：「１ｎｔ」ｓｓＯＤＮ：ＯＬＩ１６４１７～１８；「４ｎｔ」ｓｓＯＤＮ：ＯＬＩ１６４２４、ＯＬＩ１６４３０、表１１）。ｓｓＯＤＮをこの欠失配列に隣接する９０ｎｔ相同性アームと共に設計し、完全欠失を生成した。ｓｓＯＤＮを修飾し、５’末端及び３’末端にホスホロチオエート（ＰｈＴｘ）を含有させた。追加的なｓｓＯＤＮは、ＨＰＦＨを有する患者において観察される自然発生の変異（例えば、ＨＢＧΔ－１０２：－１１４（「１３ｎｔ」欠失、図１８）及びＨＢＧ－１１７Ｇ＞Ａ変異（「ＨＢＧ－１１７Ｇ＞Ａ」）をコード化するように設計した。これらの欠失を誘導するために使用されたｓｓＯＤＮは、以下のとおりであった：「１３ｎｔ」ｓｓＯＤＮ：ＯＬＩ１６４１２、ＯＬＩ１６４１４及び「－１１７Ｇ＞Ａ」ｓｓＯＤＮ：ＯＬＩ１６４１５－１６、表１１）。最後に、遺伝子修正の評価を容易にするために、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ単独の電気穿孔後に低頻度で発生する遠位ＣＣＡＡＴボックスと重なる１１ｎｔの欠失をコード化するように、ｓｓＯＤＮ（ＯＬＩ１６４１１、ＯＬＩ１６４１３、表１１）を設計した（０．１％、図１９Ｂ、図１８を参照されたい）。

【０３３７】

【表１１－１】

表 11:一本鎖デオキシヌクレオチドドナー修復鋳型は CCAAT ボックス又はその近傍の欠失又は変異を「コード化する」

ssODN ID	OLI-ID	配列
Ptx ssODN - プラス鎖 -18nt (180)	OLI16409	G*GTGCTTCCTTTTATTCTTCATCCCTAGCCAGCCGCCGGCCCCT GGCCTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT CAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAGGGACCGTT TCAGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGAAGGGGCCCC CAAGA*G (配列番号 974)
Ptx ssODN - マイナス鎖 -18nt (180)	OLI16410	C*TCTTGGGGGCCCCTTCCCCACACTATCTCAATGCAAATATCT GTCTGAAACGGTCCCTGGCTAAACTCCACCCATGGGTTGGCCA GCCTTGACAAGGCAAACTTGACCAATAGTCTTAGAGTATCCAG TGAGGCCAGGGGCCGGCGGCTGGCTAGGGATGAAGAATAAAA GGAAGCAC*C(配列番号 975)
Ptx ssODN - マイナス鎖 -11nt (180)	OLI16411	G*GCCCCTTCCCCACACTATCTCAATGCAAATATCTGTCTGAAA CGGTCCCTGGCTAAACTCCACCCATGGGTTGGCCAGCCTTGCCT TGAGACAAGGCAAACTTGACCAATAGTCTTAGAGTATCCAGTG AGGCCAGGGGCCGGCGGCTGGCTAGGGATGAAGAATAAAAGG AAGCACC*C(配列番号 976)
Ptx ssODN - マイナス鎖 -13nt (180)	OLI16412	G*GCCCCTTCCCCACACTATCTCAATGCAAATATCTGTCTGAAA CGGTCCCTGGCTAAACTCCACCCATGGGTTGGCCAGCCTTGCCT TGACAAGGCAAACTTGACCAATAGTCTTAGAGTATCCAGTGAG GCCAGGGGCCGGCGGCTGGCTAGGGATGAAGAATAAAAGGAA GCACCCT*T(配列番号 977)
Ptx ssODN - プラス鎖 -11nt (180)	OLI16413	G*GGTGCTTCCTTTTATTCTTCATCCCTAGCCAGCCGCCGGCCCC TGGCCTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTG TCTCAAGGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAG GGACCGTTTCAGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGAA GGGGC*C(配列番号 978)
Ptx ssODN - プラス鎖 -13nt (180)	OLI16414	A*AGGGTGCTTCCTTTTATTCTTCATCCCTAGCCAGCCGCCGGC CCCTGGCCTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCC TTGTCAAGGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA GGGACCGTTTCAGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGA AGGGGC*C(配列番号 979)
Ptx ssODN - マイナス鎖 117:G>A (180)	OLI16415	G*GCCCCTTCCCCACACTATCTCAATGCAAATATCTGTCTGAAA CGGTCCCTGGCTAAACTCCACCCATGGGTTGGCCAGCCTTGCCT TAACCAATAGCCTTGACAAGGCAAACTTGACCAATAGTCTTAG AGTATCCAGTGAGGCCAGGGGCCGGCGGCTGGCTAGGGATGA AGAATAA*A(配列番号 980)
Ptx ssODN - プラス鎖 117:G>A (180)	OLI16416	T*TTATTCTTCATCCCTAGCCAGCCGCCGGCCCCTGGCCTCACTG GATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGTCAAGGCTATT GGTTAAGGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAG GGACCGTTTCAGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGAA GGGGC*C(配列番号 981)
Ptx ssODN - マイナス鎖 -1nt (180)	OLI16417	G*GCCCCTTCCCCACACTATCTCAATGCAAATATCTGTCTGAAA CGGTCCCTGGCTAAACTCCACCCATGGGTTGGCCAGCCTTGCCT TGCCAATAGCCTTGACAAGGCAAACTTGACCAATAGTCTTAGA GTATCCAGTGAGGCCAGGGGCCGGCGGCTGGCTAGGGATGAA GAATAAA*A(配列番号 982)
Ptx ssODN - プラス鎖 -1nt (180)	OLI16418	T*TTATTCTTCATCCCTAGCCAGCCGCCGGCCCCTGGCCTCACT GGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGTCAAGGCTAT TGGCAAGGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAG GGACCGTTTCAGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGAA GGGGC*C(配列番号 983)

【０３３８】

【表１１－２】

Ptx ssODN - マイナス鎖 -4nt 40/80(120)	OLI16419	T*GGCTAAACTCCACCCATGGGTTGGCCAGCCTTGCCTTGATAG CCTTGACAAGGCAAACTTGACCAATAGTCTTAGAGTATCCAGT GAGGCCAGGGGCCGGCGGCTGGCTAGGGATGAA*G (配列番号 984)
Ptx ssODN - マイナス鎖 -4nt 30/70(100)	OLI16420	C*CACCCATGGGTTGGCCAGCCTTGCCTTGATAGCCTTGACAAG GCAAACTTGACCAATAGTCTTAGAGTATCCAGTGAGGCCAGGG GCCGGCGGCTGGC*T (配列番号 985)
Ptx ssODN - マイナス鎖 -4nt (100)	OLI16421	A*AACGGTCCCTGGCTAAACTCCACCCATGGGTTGGCCAGCCTT GCCTTGATAGCCTTGACAAGGCAAACTTGACCAATAGTCTTAG AGTATCCAGTGAG*G(配列番号 986)
Ptx ssODN - マイナス鎖 -4nt (120)	OLI16422	T*ATCTGTCTGAAACGGTCCCTGGCTAAACTCCACCCATGGGTT GGCCAGCCTTGCCTTGATAGCCTTGACAAGGCAAACTTGACCA ATAGTCTTAGAGTATCCAGTGAGGCCAGGGGCC*G(配列番号 987)
Ptx ssODN - マイナス鎖 -4nt (140)	OLI16423	T*CAATGCAAATATCTGTCTGAAACGGTCCCTGGCTAAACTCCA CCCATGGGTTGGCCAGCCTTGCCTTGATAGCCTTGACAAGGCA AACTTGACCAATAGTCTTAGAGTATCCAGTGAGGCCAGGGGCC GGCGGCTGGC*T (配列番号 988)
Ptx ssODN - マイナス鎖 -4nt (180)	OLI16424	G*GCCCCTTCCCCACACTATCTCAATGCAAATATCTGTCTGAAA CGGTCCCTGGCTAAACTCCACCCATGGGTTGGCCAGCCTTGCCT TGATAGCCTTGACAAGGCAAACTTGACCAATAGTCTTAGAGTA TCCAGTGAGGCCAGGGGCCGGCGGCTGGCTAGGGATGAAGAA TAAAAGG*A (配列番号 989)
Ptx ssODN - プラス鎖 -4nt 40/80(120)	OLI16425	T*ACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGTCAAGGCTATCA AGGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAGGGAC CGTTTCAGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTG*G (配列番号 990)
Ptx ssODN - プラス鎖 -4nt 30/70(100)	OLI16426	C*TATTGGTCAAGTTTGCCTTGTCAAGGCTATCAAGGCAAGGCT GGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAGGGACCGTTTCAGACA GATATTTGCATTG*A(配列番号 991)
Ptx ssODN - プラス鎖 -4nt (100)	OLI16427	C*CTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGTC AAGGCTATCAAGGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTA GCCAGGGACCGTT*T (配列番号 992)
Ptx ssODN - プラス鎖 -4nt (120)	OLI16428	C*GGCCCCTGGCCTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGT TTGCCTTGTCAAGGCTATCAAGGCAAGGCTGGCCAACCCATGG GTGGAGTTTAGCCAGGGACCGTTTCAGACAGAT*A (配列番号 993)
Ptx ssODN - プラス鎖 -4nt (140)	OLI16429	A*GCCAGCCGCCGGCCCCTGGCCTCACTGGATACTCTAAGACTA TTGGTCAAGTTTGCCTTGTCAAGGCTATCAAGGCAAGGCTGGC CAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAGGGACCGTTTCAGACAGAT ATTTGCATTG*A(配列番号 994)
Ptx ssODN - プラス鎖 -4nt (180)	OLI16430	T*CCTTTTATTCTTCATCCCTAGCCAGCCGCCGGCCCCTGGCCTC ACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGTCAAGGC TATCAAGGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAG GGACCGTTTCAGACAGATATTTGCATTGAGATAGTGTGGGGAA GGGGC*C(配列番号 995)
Ptx ssODN - プラス鎖 -18nt (100)	OLI16431	C*CCTGGCCTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGC CTTGTCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCAGGGA CCGTTTCAGACAG*A (配列番号 1040)
*:ホスホロチオエート修飾を表す		

【０３３９】

ｓｓＯＤＮドナー、ＯＬＩ１６４０９－ＯＬＩ１６４１８、ＯＬＩ１６４２４及びＯＬＩ１６４３０（表１１）は、ＯＬＩ８３９４と予備複合体化したＣａｓ９タンパク質（「ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ」）又はＨＢＧ遠位ＣＣＡＡＴボックス（表１０）を標的化するＯＬＩ７０６６と予備複合体化したＣａｓ９タンパク質（「ＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ」）と共に成人ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞に同時送達した。簡潔に述べると、Ｘ－Ｖｉｖｏ－１０中のヒトサイトカインで、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を２日間にわたり予備刺激し、次に２．５μＭのｓｓＯＤＮドナーと、２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰとからなる混合物で電気穿孔した。電気穿孔の３日後にゲノムＤＮＡを抽出し、ＨＢＧ ＰＣＲ産物上で次世代配列決定を実施した。編集のレベルは、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰの単独使用時における６２．１％から、「－１１」ｓｓＯＤＮ（すなわちＯＬＩ１６４１

１又はＯＬＩ１６４１３）の同時送達時における７８．７３％まで増加した（図１９Ａ）。ｓｓＯＤＮ鋳型のヒトＨＳＰＣへの同時送達によって媒介される遺伝子修正のレベルは、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ＋「１１」ｓｓＯＤＮを電気穿孔されたＨＳＰＣからのＨＢＧＰＣＲ産物の配列決定によって検出される全インデル内の「－１１」欠失の頻度によって測定されるように、全インデルの最大４２．４％に寄与することが示された（図１９Ｂ）。効率的な遺伝子修正は、他のｓｓＯＤＮ鋳型及びＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ（図１９Ｃ～Ｅ、Ｇ）又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰ（図１９Ｆ）にわたり観察された。

【０３４０】

ｓｓＯＤＮ鋳型と共に同時送達された、ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ又はＯＬＩ７０６６－ＲＮＰで電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を赤血球細胞に分化させ、遺伝子編集から得られるγ-グロビン発現のレベルを評価した。ＲＮＰとｓｓＯＤＮの同時送達が、編集された成人ＣＤ３４＋細胞の赤血球子孫における胎児型ヘモグロビン産生を増加させるかどうかを判定するために、ヒトサイトカイン（エリスロポエチン、ＳＣＦ、ＩＬ３）、ヒト血漿（Octoplas）及び他の補給剤（ヒドロコルチゾン、ヘパリン、トランスフェリン、インスリン）の存在下で１８日間培養することにより、細胞を赤血球細胞に分化させた。１８日目に全β様グロビン鎖（γ鎖／［γ鎖＋β鎖］）に対するγ-グロビン鎖の相対発現レベルをＵＰＬＣによって測定した。ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰを単独で使用した場合の２９％に代えて、ｓｓＯＤＮの同時送達後に最大３９．１％のγ-グロビンが検出された（図２０Ａ～Ｂ）。

【０３４１】

ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４２４を使用して、用量の効果を評価した。Ｘ－Ｖｉｖｏ－１０中のヒトサイトカインでｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を２日間にわたり予備刺激し、次に０．６２５μＭ～１０μＭの範囲の用量のＯＬＩ１６４２４－ｓｓＯＤＮと２μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰからなる混合物で電気穿孔した。電気穿孔の３日後にゲノムＤＮＡを抽出し、ＨＢＧ ＰＣＲ産物上で次世代配列決定を実施した。ｓｓＯＤＮの用量の５μＭまでの増加は、遺伝子修正の増加及びＨＢＧ１とＨＢＧ２との間の４．９ｋｂ欠失の頻度の減少をもたらした（ｄｄＰＣＲによって測定される）が、全体的な編集レベルを維持しながら、細胞生存率に影響を及ぼさなかった（図２１Ａ～Ｃ）。γ-グロビンのレベルは、赤血球培養の１８日後における細胞溶解産物のＵＰＬＣ解析によって測定されるように、５μＭ用量のｓｓＯＤＮで全β様鎖の３９．５％まで増加した（図２１Ｄ）。

【０３４２】

ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰとＯＬＩ１６４２４ｓｓＯＤＮの同時送達は、ｓｓＯＤＮとＲＮＰとの相対的用量を変化させることによってさらに最適化された。Ｘ－Ｖｉｖｏ－１０中のヒトサイトカインでｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を２日間にわたり予備刺激し、次に１．２５μＭ～５μＭの範囲の用量のＯＬＩ１６４２４－ｓｓＯＤＮ及び２μＭ～８μＭのＯＬＩ８３９４－ＲＮＰからなる混合物で電気穿孔した。電気穿孔の３日後にゲノムＤＮＡを抽出し、ＨＢＧ ＰＣＲ産物上で次世代配列決定を実施した。改善された遺伝子編集結果、すなわちＨＢＧ１遺伝子とＨＢＧ２遺伝子との間の４．９ｋｂの欠失の頻度の低下及びより高いレベルの遺伝子修正は、より高いｓｓＯＤＮ用量と組み合わされたより低いＲＮＰ用量で達成された（図２２Ａ～Ｃ）。これは、赤血球分化後、最高レベルのγ-グロビン発現をもたらした（図２２Ｄ）。

【０３４３】

<u>実施例１０： ヒト造血幹／前駆細胞における遺伝子修正は、対称的及び非対称的相同性アームを有する短いｓｓＯＤＮ鋳型で達成され得る</u>

遺伝子修正が、実施例９で使用された以前に試験された１８０ｎｔの長さよりも短い鋳型を使用して達成され得るかどうかを判定するために、「４ｎｔ」欠失（ＨＢＧΔ－１１２：－１１５）をコード化するｓｓＯＤＮを設計し、欠失配列に対して対称的な又は非対称的のいずれかのより短い相同性アームを有するように合成した（ＯＬＩ１６４１９－ＯＬＩ１６４２３及びＯＬＩ１６４２５－ＯＬＩ１６４２９、表１１、図２３Ａ）。簡潔に述べると、Ｘ－Ｖｉｖｏ－１０中のヒトサイトカインでｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を２日間に

わたり予備刺激し、次に２．５μＭのｓｓＯＤＮドナー（ＯＬＩ１６４２４、ＯＬＩ１６４１９又はＯＬＩ１６４２１）と、２μＭのＯＬＩ８３９４（ＯＬＩ８３９４－ＲＮＰ）に複合体化したＣａｓ９タンパク質とからなる混合物で電気穿孔した。電気穿孔の３日後にゲノムＤＮＡを抽出し、ＨＢＧ ＰＣＲ産物上で次世代配列決定を実施した。全編集及び遺伝子補正レベルは、対称的な９０ｎｔの相同性アーム、対称的な５０ｎｔの相同性アーム又は４０／８０の非対称的アームを有する、ｓｓＯＤＮ間で類似していた（図２３Ｂ）。

【０３４４】

実施例１１： ｓｓＯＤＮドナーの対合Ｄ１０Ａ－Ｃａｓ９ ＲＮＰとの成体ＣＤ３４＋細胞への同時送達は、ＨＢＧ遠位ＣＣＡＡＴボックスにおける遺伝子修正をサポートする

ｍＰＢ ＣＤ３４$^{+}$細胞にＣＣＡＡＴボックスを妨害する欠失（「４ｎｔ」欠失など）を導入するためのｓｓＯＤＮ媒介遺伝子修正が、Ｄ１０Ａニッカーゼ対によってサポートされ得るかどうかを判定するために、ｓｓＯＤＮ（ＯＬＩ１６４２４）存在下又は非存在下において、ＨＢＧを標的化するＤ１０Ａ Ｃａｓ９ ＲＮＰでＣＤ３４＋細胞を電気穿孔した（表１１）。簡潔に述べると、Ｓｐ３７及びＳｐＡ ｇＲＮＡを化学的に合成し（それぞれＯＬＩ７０７５及びＯＬＩ７０７４、表１２）、Ｄ１０Ａ－Ｃａｓ９ニッカーゼ変異タンパク質に複合体化させた。ヒトサイトカインを補充した培地中でヒト成人ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を４８時間にわたり予備刺激した。次に、Ｓｐ３７＋ＳｐＡ（２μＭ＋２μＭ）を含むＤ１０Ａ－Ｃａｓ９ ＲＮＰ対を単独で又はＯＬＩ１６４２４と組み合わせてＣＤ３４＋細胞に送達し、Illumina配列解析のために電気穿孔の３日後にゲノムＤＮＡを抽出した。

【０３４５】

【表１２】

表 12:D10A Cas9 を有する CD34^{+}細胞中の CCAAT ボックスを標的とする gRNA 配列

gRNA ID	OLI-ID	gRNA 配列 (RNA)	gRNA 配列 (DNA)
Sp37	OLI17075	CUUGACCAAUAGCCUUGACA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号 996)	CTTGACCAATAGCCTTGACAGT TTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGCTTTT(配列番号 998)
SpA	OLI17074	GGCAAGGCUGGCCAACCCAU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号 997)	GGCAAGGCTGGCCAACCCATGT TTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGCTTTT(配列番号 999)

【０３４６】

ゲノムＤＮＡからのＨＢＧ ＰＣＲ産物の配列決定によって判定されるように、Ｄ１０Ａ－Ｃａｓ９ ＲＮＰ対を単独で送達した場合の約５１％に代えて、ｓｓＯＤＮの同時送達は、約６５％のインデルをサポートした（図２４）。詳細な配列解析は、ＯＬＩ１６４２４ｓｓＯＤＮドナーを同時送達した場合、対立遺伝子の１６％が正確な４ｎｔ欠失（ＨＢＧ：Δ－１１２：－１１５）を有することも実証した一方、この欠失は、ＲＮＰペアを単独で送達した場合に検出されなかった。これは、インデルの約２５％がｓｓＯＤＮの存在下で正確な遺伝子修正によって発生したことを示した。

【０３４７】

実施例１２： ＣＣＡＡＴボックスを標的化するｇＲＮＡを含有するＣｐｆ１ ＲＮＰは、ヒト造血幹／前駆細胞における遺伝子編集をサポートする

Ｃｐｆ１ガイドＲＮＡ、ＨＢＧ１－１（すなわちＯＬＩ１３６２０（表１３））は、ＣＣＡＡＴボックスを標的化するように設計した。ＣＤ３４＋細胞におけるアシダミノコッカス属（Acidaminococcus）種Ｃｐｆ１（「ＡｓＣｐｆ１」）送達のための最適な核局

在化シグナル構成を決定するために、ＨＢＧ１－１ ｇＲＮＡをＡｓＣｐｆ１の２つの核局在化シグナル（ＮＬＳ）の変異型、すなわちＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｎＮＬＳ（配列番号１０００）及びＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ（配列番号１００１）に複合体化させた。「Ｈｉｓ」は、6-ヒスチジン精製配列を指し、「ＡｓＣｐｆ１」は、アシダミノコッカス属（Acidaminococcus）種Ｃｐｆ１タンパク質配列を指し、「ｎＮＬＳ」は、ヌクレオプラスミンＮＬＳを指し、「ｓＮＬＳ」は、ＳＶ４０ ＮＬＳを指す。

【０３４８】

簡潔に述べると、Ｘ－Ｖｉｖｏ－１０中のヒトサイトカインでｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を２日間にわたり予備刺激し、次に５μＭ又は２０μＭのＲＮＰで電気穿孔した。電気穿孔の３日後にゲノムＤＮＡを抽出し、ＨＢＧ ＰＣＲ産物上で次世代配列決定を実施した。試験されたＣｐｆ１ ＮＬＳ変異型（「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ＲＮＰ」又は「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｎＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ＲＮＰ」）のいずれかに複合体化したＨＢＧ１－１ ｇＲＮＡは、１３ｎｔ標的部位におけるＣＤ３４＋細胞の編集をサポートした。試験された最高用量において、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰは６０．６％の編集対立遺伝子を生成し、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｎＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰは、５１．１％の編集対立遺伝子を生成した（図２５Ａ）。

【０３４９】

【表１３】

表 13:CD34⁺細胞中の CCAAT ボックスを標的とする HBG1-1 gRNA 配列

gRNA ID	OLI-ID	標的化ドメイン配列 (RNA)	標的化ドメイン配列 (DNA)	標的化ドメイン配列プラス PAM (UUUG)(RNA)	標的化ドメイン配列プラス PAM (TTTG)(DNA)	センス
HBG1-1	OLI13620	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号 1002)	CCTTGTCAAGGCTATTGGTC (配列番号 1003)	UUUGCCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号 1004)	TTTGCCTTGTCAAGGCTATTGGTC (配列番号 1005)	アンチセンス

【０３５０】

<u>実施例１３： ＣＣＡＡＴボックスを標的化するＣｐｆ１ ＲＮＰとｓｓＯＤＮドナーとの同時送達は、ヒト造血幹／前駆細胞における遺伝子編集をサポートする</u>

電気穿孔により、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドドナー修復鋳型（ｓｓＯＤＮ）と共に、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ変異型に複合体化したＨＢＧ１－１ ｇＲＮＡを含むＲＮＰ（「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ」）をｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞に同時送達した。上の実施例で論じられるように、４ヌクレオチド欠失を「コード化する」ようにＯＬＩ１６４３０及びＯＬＩ１６４２４ ｓｓＯＤＮを設計し、１８ヌクレオチド欠失を「コード化する」ようにＯＬＩ１６４０９及びＯＬＩ１６４１０ ｓｓＯＤＮを設計した（表１１）。４ｎｔ欠失及び１８ｎｔ欠失は、いずれもＨＢＧ遠位ＣＣＡＡＴボックスを妨害し、ＨＢＧ発現の誘導に関連する。ｓｓＯＤＮは、コード化された欠失配列に隣接する９０ヌクレオチド長の相同性アームを含み、完全な欠失を生成する。ｓｓＯＤＮを修飾し、５’末端及び３’末端にホスホロチオエート（ＰｈＴｘ）を含有させた（ＯＬＩ１６４３０、ＯＬＩ１６４２４、ＯＬＩ１６４０９及びＯＬＩ１６４１０、表１１）。簡潔に述べると、ヒトサイトカインを補充した培地中でヒト成人ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を２日間にわたり予備刺激し、ＨＢＧ１－１ ｇＲＮＡに複合体化したＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳタンパク質（「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰ」）を含む５μＭのＲＮＰ単独で又は２．５μＭのｓｓＯＤＮドナー（ＯＬＩ１６４３０、ＯＬＩ１６４３２４、ＯＬＩ１６４０９又はＯＬＩ１６４１０）の１つとの組み合わせで電気穿孔した。ＲＮＰと、プラス鎖相同性アームを有する１８ｎｔ欠失をコード化するｓｓＯＤＮドナー（ＯＬＩ１６４０９）との

同時送達は、電気穿孔の７２時間後に抽出されたゲノムＤＮＡからのＨＢＧ ＰＣＲ産物の配列解析によって判定されるように、ドナーなしでは３９．５％であった編集頻度を７３．３％に高めた（図２６Ａ）。

【０３５１】

標的部位における欠失の特定の種類及び大きさのさらなる解析は、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰが単独で送達された場合の対立遺伝子の７．５％と比較して、１８ｎｔプラス鎖ドナー（ＯＬＩ１６４０９）の存在下では、対立遺伝子の５７．３％が１８ｎｔ欠失を保有したことを明らかにした（図２６Ｂ）。１８ｎｔ欠失は、ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４０９とＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰとの同時送達で生成された全インデルの７１．２％に相当した一方、１８ｎｔ欠失は、Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ＿ＨＢＧ１－１ ＲＮＰを単独で送達した場合に生成された全インデルの１９．０％のみに相当したことから、ｓｓＯＤＮの同時送達は、ＤＮＡ ＤＳＢの正確な修復を媒介した（図２６Ｃ）。

【０３５２】

図２６Ａ～２６Ｃのデータは、元々、ｓｓＯＤＮドナーによるＣｐｆ１ ＲＮＰの同時送達が、１８ｎｔ欠失をもたらすゲノムＤＮＡの正確な遺伝子編集を増加させたことを示唆したが、実施例１３の実験を繰り返す後続の試験は、これらのデータが実験のアーチファクトであったことを確認した。それにもかかわらず、ガイドＲＮＡ ＨＢＧ１－１及びｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４０９を使用してＡｓＣｐｆ１ ＲＮＰを試験するその後の反復実験から得られたデータは、ｓｓＯＤＮドナーの同時送達が、「－１８ｎｔ欠失」に向けたＤＮＡ ＤＳＢの正確な修復と関連していないが、ヒトｍＰＢ－ＣＤ３４＋細胞における全編集の増加をサポートすることを示した（実施例２１を参照されたい）。

【０３５３】

<u>実施例１４： ＨＢＧプロモーターの遠位ＣＣＡＡＴボックス領域を標的化するｇＲＮＡを含有するＣｐｆ１ ＲＮＰは、赤血球子孫におけるＨｂＦタンパク質発現の誘導を促進するヒト造血幹／前駆体細胞における遺伝子編集をサポートする</u>

配列番号１００２（表１５）を含む標的化ドメインを有するガイドＲＮＡ ＨＢＧ１－１（表１４）は、ＨＢＧプロモーター内の部位を標的化する（図２７Ａ）。ＨＢＧ１－１ｇＲＮＡ（配列番号１０２２）を野生型ＡｓＣｐｆ１（ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ、配列番号１００１）に複合体化させ、ＲＮＰ（「ＡｓＣｐｆ１－ＨＢＧ１－１－ＲＮＰ」、表１４）を形成した。Amaxa nucleofector（Lonza）又はMaxCyte GT（MaxCyte、Inc.）電気穿孔装置のいずれかを使用して、この複合体（５μＭ又は２０μＭ）を動員末梢血（ｍＰＢ）由来のＣＤ３４＋細胞に電気穿孔した。電気穿孔の３日後、ＰＣＲ増幅された標的部位のIllumina配列決定（ＮＧＳ）により、標的部位の挿入／欠失のレベルを解析した。ＡｓＣｐｆ１－ＨＢＧ１－１－ＲＮＰは、Amaxa及びMaxCyte電気穿孔システム上で、それぞれ４３％及び１７％のオンターゲット編集をサポートした（図２８Ａ（Amaxa）及び２８Ｂ（MaxCyte））。ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の編集に続いて、赤血球系統への生体外分化が１８日間にわたり実施された（Giarratana 2011）。次に、γ-グロビン鎖の相対発現レベル（全β様グロビン鎖に対する）をＵＰＬＣによって測定した（図２８Ａ（Amaxa）及び２８Ｂ（MaxCyte））。ＡｓＣｐｆ１－ＨＢＧ１－１－ＲＮＰは、模擬電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞に由来する細胞において検出されたレベルを最大２１％上回るγ-グロビン発現の増加をもたらした（図２８Ａ）。

【０３５４】

【表１４－１】

表 14:RNP 構成成分

gRNA ID	タンパク質変種	RNP 構成成分	RNP ID	gRNA 修飾	gRNA 配列 (RNA)
HBG1-1 gRNA	AsCpf1-sNLSsNLS (配列番号 1001)	gRNA + AsCpf1 WT	HBG1-1-AsCpf1-RNP	合成未修飾	UAAUUUCUACUCU UGUAGAUCCUUGU CAAGGCUAUUGGU C(配列番号 1022)
HBG1-1 gRNA	His-AsCpf1-sNLS-sNLS H800A (配列番号 1032)	gRNA + AsCpf1 H800A	HBG1-1-AsCpf1H800A-RNP	合成未修飾	UAAUUUCUACUCU UGUAGAUCCUUGU CAAGGCUAUUGGU C (配列番号 1022)
HBG1-1 gRNA	His-AsCpf1-sNLS-sNLS H800A (配列番号 1032)	gRNA + AsCpf1 H800A	HBG1-1-AsCpf1H800A-RNP	5'OMe-PS 2OMe	UAAUUUCUACUCU UGUAGAUCCUUGU CAAGGCUAUUGGm U/PS2/mC (配列番号 1041)
tSpA 死滅 gRNA	SpCas9WT (配列番号 1033)	死滅 gRNA + SpCas9 WT	tSpA-Cas9-RNP	合成 5'-3' 3xPSOMe	mG*mG*mC*UGGCC AACCCAUGUUUU AGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCm U*mU*mU*U (配列番号 1024)
SpA gRNA	His-NLS-SpCas9D10A (配列番号 1034)	gRNA + SpCas9 ニッカーゼ	SpA-D10A-RNP	合成 5'-3' 3xPSOMe	mG*mG*mC*AAGGC UGGCCAACCCAU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCmU*mU*mU*U (配列番号 1025)
SpG gRNA	His-NLS-SpCas9D10A (配列番号 1034)	gRNA + SpCas9 ニッカーゼ	SpG-D10A-RNP	合成 5'-3' 3xPSOMe	mU*mA*mG*UCUUA GAGUAUCCAGUG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCG GUGCmU*mU*mU*U (配列番号 1026)

【０３５５】

【表１４－２】

Sp182 死滅 gRNA	SpCas9WT (配列番号 1033)	死滅 gRNA + SpCas9 WT	Sp182-Cas9- RNP	合成 5'-3' 3xPSOMe	mU*mU*mA*GAGU AUCCAGUGGUUU UAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGC mU*mU*mU*U (配列番号 1027)
「His」は 6-ヒスチジン精製配列を指す 「AsCpf1」は*アシダミノコッカス属(Acidaminococcus)*種 Cpf1 タンパク質配列を指す 「nNLS」はヌクレオプラスミン NLS を指し、「sNLS」は SV40 NLS を指す 「SpCas9」は *S.ピオゲネス(S. Pyogenes)*Cas9 タンパク質配列を指す 「*」はホスホロチオエート修飾を表す 「PS」はホスホロチオエート修飾を表す 「PS2」はホスホロジチオエート修飾を表す 「OMe」は 2-o-メチル修飾を表す 「m」は 2-o-メチル修飾を表す					

【０３５６】
【表１５】

表 15:Cpf1 ガイド RNA 標的化配列

gRNA ID	gRNA 標的化ドメイン配列 (RNA)	gRNA 標的化ドメイン配列 (DNA)
HBG1-1 gRNA	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号 1002)	CCTTGTCAAGGCTATTGGTC (配列番号 1003)
Sp182 dgRNA	UUAGAGUAUCCAGUG (配列番号 1028)	TTAGAGTATCCAGTG (配列番号 1029)
SpG gRNA	UAGUCUUAGAGUAUCCAGUG (配列番号 359)	TAGTCTTAGAGTATCCAGTG (配列番号 1030)
SpA gRNA	GGCAAGGCUGGCCAACCCAU (配列番号 941)	GGCAAGGCTGGCCAACCCAT (配列番号 944)
tSpA dgRNA	GGCUGGCCAACCCAU (配列番号 326)	GGCTGGCCAACCCAT (配列番号 1031)

【０３５７】
実施例１５： ＨＢＧプロモーターのＣＣＡＡＴボックス領域におけるＣｐｆ１ ＲＮＰ編集効率は、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９ ＲＮＰと共に同時送達されると向上するが、生存率に影響を与えない

Ｃｐｆ１－ＲＮＰと、近接的に標的化するＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９ ＲＮＰとのＣｐｆ１－ＲＮＰの同時送達は、触媒能がないこと又は単一ニックを導入することで標的部位における編集レベルを向上させ得るという仮説が立てられた。ＨＢＧプロモーターの遠位ＣＣＡＡＴボックス領域におけるＣｐｆ１－ＲＮＰ媒介編集を強化する試みでは、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ（表１４に示されるような３’修飾を有するＨＢＧ１－１ ｇＲＮＡ（配列番号１０４１に複合体化したＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ－Ｈ８００Ａ（配列番号１０３２）からなる）を（１）（ａ）ＳｐＡ ｇＲＮＡ（表１４、１５；図２７Ｂ）（「ＳｐＡ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ」、表１４）又は（ｂ）ＳｐＧ ｇＲＮＡ（表１４、１５；図２７Ｃ）（「ＳｐＧ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ」、表１４））から選択される完全長ガイドＲＮＡ（１００量体）に複合体化したＣａｓ９ Ｄ１０Ａタンパク質（Ｈｉｓ－ＮＬＳ－ＳｐＣａｓ９Ｄ１０Ａ、配列番号１０３４）を含有するＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａ ＲＮＰ；（２）（ａ）ｔＳｐＡ ｄｇＲＮＡ（表１４、１５；図２７Ｅ）（「ｔＳｐＡ－Ｃａｓ９－ＲＮＰ」、表１４）；（ｂ）Ｓｐ１８２ ｄｇＲＮＡ（表１４、１５；図２７Ｆ）（「Ｓｐ１８２－Ｃａｓ９－Ｒ

ＮＰ」、表１４）；又は（ｃ）ｔＳｐＡ－Ｃａｓ９－ＲＮＰ及びＳｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰ（表１４、１５、図２７Ｄ）から選択される短縮型死滅ガイドＲＮＡ（短縮プロトスペーサー領域を有する９５量体）に複合体化したＷＴ Ｃａｓ９タンパク質（ＳｐＣａｓ９ＷＴ、配列番号１０３３）を含有するＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）ＷＴ Ｃａｓ９ＲＮＰと共にｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞に同時送達した。ＲＮＰ複合体は、MaxCyte ＧＴ装置（MaxCyte，Ｉｎｃ）を用いて電気穿孔した。次に、電気穿孔の３日後、ＰＣＲ増幅された標的部位のIllumina配列決定（ＮＧＳ）により、標的部位の挿入／欠失のレベルを解析した。試験された全ての組み合わせにおいて、使用されたＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９酵素（Ｄ１０Ａ又はＷＴ）及びＰＡＭ配向にかかわりなく、全編集は、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ単独のMaxCyte送達に続いて観察されたレベルよりも増加した（図２９及び表１６）。さらに、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９ ＲＮＰを同時送達した場合、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞の生存率に有害作用はなかった（図３０）。

【０３５８】

【表１６】

表 16:試験された最大 RNP 用量での各 RNP の組み合わせによるインデル及びγグロビン発現の概要

Cpf1 RNP	Cas9 RNP1	Cas9 RNP2	インデル (NGS)	γグロビン (全β様鎖を超える)
-	-	-	0%	13.5%
HBG1-1-AsCpf1H800A-RNP	-	-	8.0%	20.0%
HBG1-1-AsCpf1H800A-RNP	SpG-D10A-RNP	-	88.6%	30.2%
HBG1-1-AsCpf1H800A-RNP	SpA-D10A-RNP	-	42.6%	32.5%
HBG1-1-AsCpf1H800A-RNP	tSpA-Cas9-RNP	-	32.2%	19.8%
HBG1-1-AsCpf1H800A-RNP	Sp182-Cas9-RNP	-	85.4%	42.8%
HBG1-1-AsCpf1H800A-RNP	tSpA-Cas9-RNP	Sp182-Cas9-RNP	80.1%	33.7%

【０３５９】

実施例１６： Ｃｐｆ１編集プロファイルはＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰの同時送達によって操作され得る

ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰをＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰと共にｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞に同時送達した場合に観察された全編集の増加（図２９）に加えて、インデルプロファイルの変化も観察された。Ｄ１０Ａ酵素によるＣｐｆ１－ＲＮＰ標的部位の近位への一本鎖切断の導入（図３１Ａ）は、インデルの方向性、長さ及び／又は位置を改変した（図３１Ｂ）。例えば、Ｓｐ１８２－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰは、Ｄ１０Ａ ＲＮＰによって導入されたニッキング部位に向けてプロファイルを強くシフトさせ、様々な長さの欠失がＣｐｆ１切断部位から上流のニッキング部位に向けて延びた（Ｓｐ１８２－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ、図３１Ｂ）。ＳｐＡ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ

は、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ切断部位からＤ１０Ａ酵素によって導入されたニッキング部位（ここでは、下流に位置する）まで伸びる欠失の生成も促進した一方、この場合、明らかにニッキング部位に源を発するが、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ切断部位まで完全に伸びていない追加的な欠失も生成された（ＳｐＡ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ、図３１Ｂ）。

【０３６０】

Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ標的部位の配向、標的鎖及びＣｐｆ１－ＲＮＰ標的部位までの距離が、追加的なＤＮＡニックによって促進される変異の位置と長さの違いにつながることは、ほぼ確実である（図３１Ａ）。特定の用途では、インデルプロファイルのこの方向性操作、すなわちＣｐｆ１－ＲＮＰとＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９ Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ結合部位との間で生じるインデルの頻度の増加は、所望の編集結果を助長し、生産的インデル（例えば、標的部位を妨害するインデル）の率を増加させるために用いられ得ることに留意すべきである。電気穿孔後の赤血球分化の１８日後にＵＰＬＣ解析によって検出されたように、ｄＣＣＡＡＴ標的領域を妨害し、ＨｂＦタンパク質の発現を誘導する設定では、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ及びＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｄ１０Ａ－ＲＮＰの同時送達は、模擬電気穿孔細胞において検出されたレベルを１６．７％（ＳｐＧ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ）又は１９．０％（ＳｐＡ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰ）上回るγ-グロビンレベルの増加をもたらした（図２９及び表１６）。ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰとＳｐＡ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰを対合させた場合、ＨｂＦレベルのより低い編集レベル（ＳｐＡ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰによる４２．６％対ＳｐＧ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰによる８８．６％）から、より高い上昇（Ｃａｓ９Ｄ１０Ａ－ＳｐＡ－ＲＮＰによる１９％対ＳｐＧ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰによる１６．７％）が達成されたことから、（ＳｐＧ－Ｄ１０Ａ－ＲＮＰと対比して）生産的インデルの頻度がより高かった（図２９及び表１６）。

【０３６１】

実施例１７： 死滅ガイドＲＮＡを含有するＳ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９ ＷＴ ＲＮＰの存在下において編集プロファイルを改変することなくＣｐｆ１編集を増加させる

MaxCyte電気穿孔装置を使用して、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ（６μＭの固定用量）を増加する用量のＳｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰ（短縮型の９５量体死滅ｇＲＮＡであるＳｐ１８２に複合体化した）と共にｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞に同時送達すると、最大１０倍を超える編集増強が観察された（最高用量のＳｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰで８５．４％の編集と対比して、単独で送達されたＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰでは８．０％）（図２９）。Ｓｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰの同時送達によってここで達成された編集のレベルは、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰを単独で２０ｕＭという高用量で送達した場合、MaxCyte電気穿孔装置を使用して得られた編集のレベルも大幅に上回った（図２８Ｂ）。Ｄ１０Ａ－ＲＮＰの同時送達によって観察された結果（実施例１６）とは対照的に、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰとＳｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰ（短縮型ｇＲＮＡと複合体化したＣａｓ９－ＷＴ）との同時送達によって達成された編集の増加は、インデルプロファイルに対する明白な影響と関連していなかった。電気穿孔された細胞で検出されたインデルは、隣接した対称的様式でＣｐｆ１切断部位の周囲に集中しており、Ｓｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰ標的部位ではインデルが検出されなかった（図３２Ａ）。注目すべきことに、全インデルの９６％は、遠位－ＣＣＡＡＴボックスを妨害し、全インデルの７９．５％は、ＣＣＡＡＴボックスモチーフの３つ以上のヌクレオチドを妨害する（図３２Ｂ）。ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ（ＨＢＧ１－１ ｇＲＮＡ（配列番号１０２２）に複合体化したＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ－Ｈ８００Ａ（配列番号１０３２）からなる）及びＳｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰを使用したさらなる投与最適化は、MaxCyte装置を使用した電気穿孔の１２０時間後、最大９２％までのｍＰＢ－ＣＤ３４＋細胞の編集レベルを可能にし、赤血球由来の細胞においてバックグラウンドを３２％上回るγ鎖発現レ

ベルをもたらした（処理細胞では４１％、模擬処理細胞では８％のγ鎖）（図３３）。これらの結果は、短縮型ｇＲＮＡに複合体化したＷＴ Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９タンパク質からなるＲＮＰが、それ自体の結合部位に検出可能なレベルの編集を導入するか、又はＣｐｆ１－ＲＮＰによって生成されるインデルの長さ又は方向性に著しく影響を及ぼすことなく、近位に結合したＣｐｆ１－ＲＮＰからの編集を増加させ得ることを実証する。ここで、Ｓｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰによって提供される編集増強は、遠位ＣＣＡＡＴボックス標的モチーフを妨害するインデルの頻度が高い、ＨＢＧプロモーターにおけるＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰの高編集を可能にし、電気穿孔された細胞のバルク赤血球子孫における治療的に妥当なγ鎖発現レベルをもたらす。

【０３６２】

実施例１８： 遠位ＣＣＡＡＴボックスを標的化するＣｐｆ１ ｇＲＮＡで編集された細胞集団内のクローナルＨｂＦ分布

次に、単細胞実験を実施して、ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１Ｈ８００Ａ－ＲＮＰ（表１４に示される３’修飾を有するＨＢＧ１－１ ｇＲＮＡ（配列番号１０４１）に複合体化したＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ－Ｈ８００Ａ（配列番号１０３２）からなる）＋Ｓｐ１８２－Ｃａｓ９－ＲＮＰ組み合わせで電気穿孔された、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞由来の赤血球細胞におけるγ鎖発現レベルの分布を評価した（図２７Ｆ、表１４）。電気穿孔後４８時間の回復放置期間後、非組織培養処理３８４ウェルプレート内の１細胞／ウェルで、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）によって細胞を選別した。次に、細胞を分化させ、１８日間にわたりクローン的に増殖させ、赤血球系統に分化させた（Giarratana 2011から適応）。ＵＰＬＣ解析を実施して、最初に編集されたｍＰＢ－ＣＤ３４＋細胞の全集団に由来する細胞のクローン性赤血球子孫におけるγ鎖発現レベル（γ鎖／［全β様鎖］の百分率）の分布を判定した。機能的利益を達成し、鎌状赤血球症に伴う症状を緩和するには、赤血球細胞の約３０％は、３０％を超える胎児型ヘモグロビンレベルを有するべきであると考えられる。解析されたクローン中、８３．１％は、模擬電気穿孔されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞に由来する赤血球クローンで検出された中央値レベル（中央値＝１８．８％）を超えるγ鎖レベルを有し、６４．２％は、全β様の３０％を超えるγ鎖レベルを有し、３５．８％は、全β様の４８．８％を超えるγ鎖レベルを有した（３０％＋対照細胞における１８．８％の中央値レベル）（図３４）。

【０３６３】

実施例１９： ＨＢＧプロモーター領域を標的とするＣｐｆ１ ｇＲＮＡのスクリーニング

単一ＲＮＰの構成要素として又は「ブースター要素」と組み合わせて、ＣＤ３４＋細胞におけるＨＢＧプロモーター領域の編集を増加させ、修飾細胞の赤血球子孫における胎児型グロビン発現を誘導するために使用し得る他のＡｓＣｐｆ１ ｇＲＮＡを同定するために、ＨＢＧプロモーターのいくつかのドメインを標的とするＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ＮＬＳ－ＮＬＳ（「ＡｓＣｐｆ１」、配列番号１０００）；ＡｓＣｐｆ１ Ｓ５４２Ｒ／Ｋ６０７Ｒ（「ＡｓＣｐｆ１ ＲＲ」、配列番号１０３６）；又はＡｓＣｐｆ１ Ｓ５４２Ｒ／Ｋ５４８Ｖ／Ｎ５５２Ｒ（「ＡｓＣｐｆ１ ＲＶＲ」、配列番号１０３７）ｇＲＮＡ配列（表１７）を設計した（表１８に列挙される）。ＡｓＣｐｆ１ ＲＲ及びＡｓＣｐｆ１ ＲＶＲは、それぞれＴＹＣＶ／ＡＣＣＣ／ＣＣＣＣ及びＴＡＴＶ／ＲＡＴＲ ＰＡＭを認識する操作されたＡｓＣｐｆ１変異型である（Gao 2017）。

【０３６４】

【表１７－１】

表 17:HBG ゲノム領域のサブドメイン

HbG'の ゲノム座標	ヌクレオチド	領域の名称
Chr 11 (NC_000011.10): 5,247,883- 5,248,186	TCCTAAAGCT TGGAACACTT TCCCTTCCTT AAGAACCATC CTTGCTACTC AGCTGCAATC AATCCAGCCC CCAGGTCTTC ACTGAACCTT TTCCCATCTC TTCCAAAACA TCTGTTTCTG AGAAGTCCTG TCCTATAGAG GTCTTTCTTC CCACCGGATT TCTCCTACAC CATTTACTCC CACTTGCAGA ACTCCCGTGT ACAAGTGTCT TTACTGCTTT TATTTGCTCA TCAAAATGCA CATCTCATAT AAAAATAAAT GAGGAGCATG CACACACCAC AAACACAAAC AGGCATGCAG AAAT (配列番号 1118)	領域 1:*HBG1* の下流
Chr 11 (NC_000011.10): 5,248,509 - 5,249,173	ATAAAGATGA ACCCATAGTG AGCTGAGAGC TCCAGCCTGG CCTCCAGATA ACTACACACC AAGCTTCCAC CCAGAATCAA GCCTATGTTA ACTTCCCTCA AAGCCTGAGA TTTTGCCTTC CCATTAAATG CAGGTAGTTG TTCCCCTTCA AGCACTAGTC ACTGGCCATA ATTTAAATCT TGCTATCTTC TTGCCACCAT GAACCCTGTA TGTTGTAGGC TGAAGACGTT AAAAGAAACA CACGCTGACA CACACACACA CACGCGCGCG CGCACACACA CACACACACA CAGAGCTGAC TTTCAAAATC TACTCCAGCC CAAATGTTTC AATTGTTCCT CACCCCTGGA CATACTTTGC CCCCATCTGG AATTAAAGGA TATAAGTTTG TAATGAAGCA TTAGCAGCAT TTTATATGTG TCCAGCTGAT ATAGGAATAG CCTTAGCAAT GTATGTTTGG CCACCAAAGT TCCCCACTTT GACTGAGCCA ATATATGCCT TCTGCCTGCA TCTTTTTAAC GACCATACTT GTCCTGCCTC CAGATAGATG TTTTAAAACA ACAAAAATGA GGGAAAGATG AAAGTTCTTT CTACTGGAAT CTAATAAAGA AAAGTCATTT TCCTCATTTC CACCTCTCTT TTCTCAAAGT CAAAATTGTC CATCT (配列番号 1119)	領域 2:*HBG1* イントロン 2 - A

【０３６５】

【表１７－２】

Chr 11 (NC_000011.10): 5,249,198 - 5,249,362	CCCTAAAACA TTACCACTGG GTCTCAGCCC AGTTAGTCCT CTGCAGTTTC TTCACCCCCA ACCCCAGTAT CTTCAAACAG CTCACACCCT GCTGTGCTCA GATCAATACT CCGTTGTCTA AGTTGCCTCG AGACTAAAGG CAACAGGGCT GAAACATCTC CTGGA (配列番号 1120)	領域 3:*HBG1* イントロン 2 - B
Chr 11 (NC_000011.10): 5,249,591- 5,249,712	CTGTGAGATT GACAAGAACA GTTTGACAGT CAGAAGGTGC CACAAATCCT GAGAAGCGAC CTGGACTTTT GCCAGGCACA GGGTCCTTCC TTCCCTCCCT TGTCCTGGTC ACCAGAGCCT AC (配列番号 1121)	領域 4:*HBG1* イントロン 1
Chr 11 (NC_000011.10): 5,249,904 - 5,249,927	GCCGCCGGCC CCTGGCCTCA CTGG (配列番号 1122)	領域 5:転写開始部位 (TSS) からの *HBG1*-60nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,249,955 - 5,249,987	CCTTGTCAAG GCTATTGGTC AAGGCAAGGC TGG (配列番号 1123)	領域 6:TSS からの *HBG1*-110nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,250,040 - 5,250,075	TGAGATAGTG TGGGGAAGGG GCCCCC AAGAGGATAC (配列番号 1124)	領域 7:TSS からの *HBG1*-200nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,250,089 - 5,250,129	TATAGCCTTT GCCTTGTTCC GATTCAGTCA TTCCAGTTTT T (配列番号 1125)	領域 8:TSS からの *HBG1*-250nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,250,141 - 5,250,254	TCTTCCCTTT AGCTAGTTTC CTTCTCCCAT CATAGAGGAT ACCAGGACTT CTTTTGTCAG CCGTTTTTTA CCTTCTTGTC TCTAGCTCCA GTGAGGCCTG TAGTTTAAAG CTAA (配列番号 1126)	領域 9:TSS からの *HBG1*-333nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,250,464 - 5,250,549	CCACAGTTTC AGCGCAGTAA TAGATTAGTG TTACATAATA TAAGACCTAA TGCTTACCTC AATATCTACT TATCCGTACC TATTTG (配列番号 1127)	領域 10:TSS からの *HBG1*-650nt 領域

【０３６６】

【表１７－３】

Chr 11 (NC_000011.10): 5,250,594 - 5,250,735	TATTCAGGTA TGTATGTATA CACCAGATGA TGTGTATTTA CCACTGGATA AGTGTGTGTG CTGGCTGATG ACCCAGGGTT TTGGCGTAGC TCTTCTATGC TCAGTAAAGA TGATGGTAGA ATGTTCTTTG GCAGGTACTG TG (配列番号 1128)	領域 11:TSS からの *HBG1*-800nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,253,425 - 5,254,121	CAATAAAGAT GAACCCATAG TGAGCTGAGA GCTCCAGCCT GGCCTCCAGA TAACTACACA CCAAGCTTCC ACCCAGAATC AAGCCTATGT TAACTTCCCT CAAAGCCTGA GATTTTGCTT TCCCATTAAA TGCAGGTAGT TGTTCTTCTT GCAGCACTAG TCACTGGCCA TAATTTAAAT CTTGTTATCT TCTTGCCACC ATGAACCCTG TATGCTGTAG GCTGAAAACG TTAAAAGAAA CACACGCTCT CACACACACA CAAACACACG CGCGCACACA CACACACACA CACACAGAGC TGACTTTCAA AATCTACTCC AGCCCAAATG TTTCAATTGT TCCTCACCCC TGGACATACT TTGCCCCCAT CTGGAATTAA AGGATATAAG TTTGTAATGA AGCATTAGCA GCATTTTATA TGTGTCCAGC TGATATAGGA ATAGCCTTAG CAATGTATGT TTGGCCACCA AAGTTCCCCA CTTTGACTGA GCCAATATAT GCCTTCTGCC TGCATCTTTT TAATGACCAT ACTTGTCCTG CCTCCAGATA GATGTTTTAA AACGAATAAC AAAAATAGGG GAAAGGTGAA AGTTCTTTCT ACCGAAATCT AATAAAGAAA AGTCATTTTC CTCATTTCCA CCTCTCTTTT CTCAAAGTCA AAGTTGTCCA TCTAGATTTT CAGAGGCACT CCTTAGG (配列番号 1129)	領域 12:*HBG2* イントロン 2-A

【０３６７】

【表１７－４】

Chr 11 (NC_000011.10): 5,254,122 - 5,254,306	CCCTAAAACA TTGCCACTGG GTCTCAGCCC AGTTAGTCCT CTGCAGTTTC TTCACTCCCA ACCCCAGTAT CTTCAAACAG CTCACACCCT GCTGTGCTCA GATCAATACT CAGTTGTCTA AGTTGCCTCG AGACTAAAGG CAACAGTGCT GAAACATCTC CTGGACTCAC CTTGAAGTTC TCAGG (配列番号 1130)	領域 13:*HBG2* イントロン 2-B
Chr 11 (NC_000011.10): 5,254,511 - 5,254,648	AGCCTGTGAG ATTGACAAGA ACAGTTTGAC AGTCAGAAGG TGCCACAAAT CCTGAGAAGC GACCTGGACT TTTGCCAGGC ACAGGGTCCT TCCTTCCCTC CCTTGTCCTG GTCACCAGAG CCTACCTTCC CAGGGTT (配列番号 1131)	領域 14:*HBG2* イントロン 1
Chr 11 (NC_000011.10): 5,254,829 - 5,254,866	CCGCCGGCCC CTGGCCTCAC TGGATACTCT AAGACTAT (配列番号 1132)	領域 15:TSS からの *HBG2*-60nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,254,879 - 5,254,909	CCTTGTCAAG GCTATTGGTC AAGGCAAGGC T (配列番号 1133)	領域 16:TSS からの *HBG2*-110nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,254,935 5,255,009	CAGGGACCGT TTCAGACAGA TATTTGCATT GAGATAGTGT GGGGAAGGGG CCCCCAAGAG GATACTGCTG CTTAA (配列番号 1134)	領域 17:TSS からの *HBG2*-200nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,255,025 - 5,255,053	TTGCCTTGTT CCGATTCAGT CATTCCAAT (配列番号 1135)	領域 18:TSS からの *HBG2*-250nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,255,076 - 5,255,179	TTTAGCTAGT TTTCTTCTCC CACCATAGAA GATACCAGGA CTTCTTTTGT CAGCCGTTTT TCACCTTCTT GTCTGTAGCT CCAGTGAGGC CTGTAGTTTA AAGT (配列番号 1136)	領域 19:TSS からの *HBG2*-330nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,255,255 - 5,255,292	GGACACGTCT TAGTCTCATT TAGTAAGCAT TGGTTTCC (配列番号 1137)	領域 20:TSS からの *HBG2*-500nt 領域
Chr 11 (NC_000011.10): 5,255,518 - 5,255,641	TTTTTTATAT TCAGGTATGT ATGTAGGCAC CCGATGATGT GTATTTATCA CTGGATAAGT GTATGTGCTG GCTGATGACC CAGGGTTTTG GTGTAGCTCT TCTATGCTCG GTAAAGATGA TGGT (配列番号 1138)	領域 21:TSS からの *HBG2*-800nt 領域
*NCBI 参照配列 NC_000011、座標は 1 ベースの座標系「Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p12 Primary Assembly」(Version NC_000011.10)を使用して報告される。		

【０３６８】

【表１８－１】

表 18:Cpf1 ガイド RNA

gRNA 標的化ドメイン配列 ID*	gRNA 標的化ドメイン配列 (RNA)	gRNA 標的化ドメイン配列 (DNA)	HbG1 におけるゲノム座標**	HbG2 におけるゲノム座標**	% 編集	鎖
AsCpf1 HBG1 プロモーター-1	AGACAGAUAU UUGCAUUGAG (配列番号 1139)	AGACAGATAT TTGCATTGAG (配列番号 1140)	Chr11:5250024:5250043	Chr11:52549468:5254967	5.43	+
AsCpf1 HBG1 プロモーター-2	CAUUGAGAUA GUGUGGGGAA (配列番号 1141)	CATTGAGATA GTGTGGGGAA (配列番号 1142)	Chr11:5250037:5250056	Chr11:52549601:5254980	8.30	+
AsCpf1 HBG1 プロモーター-3	UAGCCUUUGC CUUGUUCCGA (配列番号 1143)	TAGCCTTTGC CTTGTTCCGA (配列番号 1144)	Chr11:5250091:5250110	Chr11:52550019:5255038	0.23	+
AsCpf1 HBG1 プロモーター-4	CCUUGUUCCG AUUCAGUCAU (配列番号 1145)	CCTTGTTCCG ATTCAGTCAT (配列番号 1146)	Chr11:5250100:5250119	Chr11:52550028:5255047	1.15	+
AsCpf1 HBG1 プロモーター-5	UCUAAUUUAU UCUUCCCUUU (配列番号 1147)	TCTAATTTATT CTTCCCTTT (配列番号 1148)	Chr11:5250131:5250150	Chr11:52550059:5255078	0.16	+
AsCpf1 HBG1 プロモーター-6	CUUCUCCCAU CAUAGAGGAU (配列番号 1149)	CTTCTCCCATC ATAGAGGAT (配列番号 1150)	Chr11:5250161:5250180		12.73	+
AsCpf1 HBG2 プロモーター-7	UUCUCCCACC AUAGAAGAUA (配列番号 1151)	TTCTCCCACC ATAGAAGATA (配列番号 1152)		Chr11:52550090:5255109	8.11	+
AsCpf1 HBG1 プロモーター-8	CCACUGGAUA AGUGUGUGUG (配列番号 1153)	CCACTGGATA AGTGTGTGTG (配列番号 1154)	Chr11:5250634:5250653		13.33	+
AsCpf1 HBG1 プロモーター-9	GCGUAGCUCU UCUAUGCUCA (配列番号 1155)	GCGTAGCTCT TCTATGCTCA (配列番号 1156)	Chr11:5250677:5250696		13.48	+
AsCpf1 HBG1 プロモーター-10	CUGAGCAUAG AAGAGCUACG (配列番号 1157)	CTGAGCATAG AAGAGCTACG (配列番号 1158)	Chr11:5250678:5250697		10.73	-
AsCpf1 HBG2 プロモーター-11	UCACUGGAUA AGUGUAUGUG (配列番号 1159)	TCACTGGATA AGTGTATGTG (配列番号 1160)		Chr11:52555565:5255584	0.43	+

【０３６９】

【表１８－２】

AsCpf1 HBG2 プロモーター-12	GUGUAGCUCU UCUAUGCUCG (配列番号 1161)	GTGTAGCTCT TCTATGCTCG (配列番号 1162)		Chr11:525560 8:5255627	5.78	+
AsCpf1 HBG2 プロモーター-13	CCGAGCAUAG AAGAGCUACA (配列番号 1163)	CCGAGCATAG AAGAGCTACA (配列番号 1164)		Chr11:525560 9:5255628	3.24	-
HBG1-1 AsCpf1	CCUUGUCAAG GCUAUUGGUC (配列番号 1002)	CCTTGTCAAG GCTATTGGTC (配列番号 1003)	Chr11:524995 5:5249974	Chr11:525487 9:5254898	17.96	+
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-1	GACAGAUAUU UGCAUUGAGA (配列番号 1167)	GACAGATATT TGCATTGAGA (配列番号 1168)	Chr11:525002 5:5250044	Chr11:525494 9:5254968	8.48	+
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-2	ACACUAUCUC AAUGCAAAUA (配列番号 1169)	ACACTATCTC AATGCAAATA (配列番号 1170)	Chr11:525003 1:5250050	Chr11:525495 5:5254974	0.09	-
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-3	CACACUAUCU CAAUGCAAAU (配列番号 1171)	CACACTATCT CAATGCAAAT (配列番号 1172)	Chr11:525003 2:5250051	Chr11:525495 6:5254975	2.10	-
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-4	CCACACUAUC UCAAUGCAAA (配列番号 1173)	CCACACTATC TCAATGCAAA (配列番号 1174)	Chr11:525003 3:5250052	Chr11:525495 7:5254976	2.52	-
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-5	UUCCCCACAC UAUCUCAAUG (配列番号 1175)	TTCCCCACAC TATCTCAATG (配列番号 1176)	Chr11:525003 7:5250056	Chr11:525496 1:5254980	0.05	-
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-6	GAUUCAGUCA UUCCAGUUUU (配列番号 1177)	GATTCAGTCA TTCCAGTTTT (配列番号 1178)	Chr11:525010 9:5250128		0.77	+
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-7	AUUCAGUCAU UCCAGUUUUU (配列番号 1179)	ATTCAGTCAT TCCAGTTTTT (配列番号 1180)	Chr11:525011 0:5250129		0.24	+
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-8	GUCAUUCCAG UUUUUCUCUA (配列番号 1181)	GTCATTCCAG TTTTTCTCTA (配列番号 1182)	Chr11:525011 5:5250134		1.00	+
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-9	AGUUUUUCUC UAAUUUAUUC (配列番号 1183)	AGTTTTTCTCT AATTTATTC (配列番号 1184)	Chr11:525012 3:5250142		0.15	+
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-10	GUUUUUCUCU AAUUUAUUCU (配列番号 1185)	GTTTTTCTCTA ATTTATTCT (配列番号 1186)	Chr11:525012 4:5250143		0.15	+

【０３７０】

【表１８－３】

AsCpf1 RR HBG2 プロモーター-11	GAUUCAGUCA UUCCAAUUUU (配列番号 1187)	CAAGAGGATA CTGCTGCTTA (配列番号 1188)		Chr11:525498 9:5255008	***	+
AsCpf1 RR HBG2 プロモーター-12	AUUCAGUCAU UCCAAUUUUU (配列番号 1189)	AAGAGGATAC TGCTGCTTAA (配列番号 1190)		Chr11:525499 0:5255009	***	+
AsCpf1 RR HBG2 プロモーター-13	GUCAUUCCAA UUUUUCUCUA (配列番号 1191)	GATTCAGTCA TTCCAATTTT (配列番号 1192)		Chr11:525503 7:5255056	0.25	+
AsCpf1 RR HBG2 プロモーター-14	AAUUUUUCUC UAAUUUAUUC (配列番号 1193)	ATTCAGTCAT TCCAATTTTT (配列番号 1194)		Chr11:525503 8:5255057	0.13	+
AsCpf1 RR HBG2 プロモーター-15	AUUUUUCUCU AAUUUAUUCU (配列番号 1195)	GTCATTCCAA TTTTTCTCTA (配列番号 1196)		Chr11:525504 3:5255062	0.32	+
AsCpf1 RR HBG2 プロモーター-16	UUCUCCCAUC AUAGAGGAUA (配列番号 1197)	AATTTTTCTCT AATTTATTC (配列番号 1198)		Chr11:525505 1:5255070	0.14	+
AsCpf1 RR HBG2 プロモーター-17	AUCAUAGAGG AUACCAGGAC (配列番号 1199)	ATTTTTCTCTA ATTTATTCT (配列番号 1200)		Chr11:525505 2:5255071	0.10	+
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-18	ACCAUAGAAG AUACCAGGAC (配列番号 1201)	TTCTCCCATC ATAGAGGATA (配列番号 1202)	Chr11:525016 2:5250181		1.40	+
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-19	CAGUACCUGC CAAAGAACAU (配列番号 1203)	ATCATAGAGG ATACCAGGAC (配列番号 1204)	Chr11:525016 9:5250188		7.88	+
AsCpf1 RR HBG2 プロモーター-20	UAGUAUCUGG UAAAGAGCAU (配列番号 1205)	ACCATAGAAG ATACCAGGAC (配列番号 1206)		Chr11:525509 7:5255116	13.03	+
AsCpf1 RR HBG1 プロモーター-21	UCAAUGCAAA UAUCUGUCUG (配列番号 1207)	CAGTACCTGC CAAAGAACAT (配列番号 1208)	Chr11:525071 4:5250733		13.31	-
AsCpf1 RR HBG2 プロモーター-22	CUCUUGGGGG CCCCUUCCCC (配列番号 1209)	TAGTATCTGG TAAAGAGCAT (配列番号 1210)		Chr11:525564 5:5255664	4.07	-
AsCpf1 RVR HBG1 プロモーター-1	GAUUCAGUCA UUCCAAUUUU (配列番号 1211)	TCAATGCAAA TATCTGTCTG (配列番号 1212)	Chr11:525002 3:5250042	Chr11:525494 7:5254966	0.15	-
AsCpf1 RVR HBG1 プロモーター-2	AUUCAGUCAU UCCAAUUUUU (配列番号 1213)	CTCTTGGGGG CCCCTTCCCC (配列番号 1214)	Chr11:525005 1:5250070	Chr11:525497 5:5254994	1.09	-
AsCpf1 RVR HBG1 プロモーター-3	AAAAAAAUUA GCAGUAUCCU (配列番号 1215)	AAAAAAATTA GCAGTATCCT (配列番号 1216)	Chr11:525006 9:5250088		***	-
AsCpf1 RVR HBG1 プロモーター-4	GCCUUUGCCU UGUUCCGAUU (配列番号 1217)	GCCTTTGCCTT GTTCCGATT (配列番号 1218)	Chr11:525009 3:5250112	Chr11:525502 1:5255040	3.96	+
AsCpf1 RVR HBG2 プロモーター-5	AAAAAAAUUA AGCAGCAGUA (配列番号 1219)	AAAAAAATTA AGCAGCAGTA (配列番号 1220)		Chr11:525499 7:5255016	***	-

【０３７１】

【表１８－４】

AsCpf1 RVR HBG1 プロモーター-6	CUCAGUAAAG AUGAUGGUAG (配列番号 1221)	CTCAGTAAAG ATGATGGTAG (配列番号 1222)	Chr11:5250693:5250712		5.32	+
AsCpf1 RVR HBG2 プロモーター-7	ACUGGAUAAG UGUAUGUGCU (配列番号 1223)	ACTGGATAAG TGTATGTGCT (配列番号 1224)		Chr11:5255567:5255586	9.78	+
AsCpf1 RVR HBG2 プロモーター-8	UGCUGGCUGA UGACCCAGGG (配列番号 1225)	TGCTGGCTGA TGACCCAGGG (配列番号 1226)	Chr11:5250652:5250671	Chr11:5255583:5255602	0.24	+
AsCpf1 RVR HBG2 プロモーター-9	CUCGGUAAAG AUGAUGGUAG (配列番号 1227)	CTCGGTAAAG ATGATGGTAG (配列番号 1228)		Chr11:5255624:5255643	5.75	+
AsCpf1 RVR HBG2 プロモーター-10	UGGUAAAGAG CAUUCUACCA (配列番号 1229)	TGGTAAAGAG CATTCTACCA (配列番号 1230)		Chr11:5255638:5255657	8.55	-

*gRNA ID 名称は、RNP 複合体で使用される特定の Cpf1 分子を提供する
**NCBI 参照配列 NC_000011、座標は 1 ベースの座標系「Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p12 Primary Assembly」(Version NC_000011.10)を使用して報告される。
***試験されなかった gRNA を表す。

【０３７２】

Amaxa電気穿孔装置（Lonza）を使用して、ＲＮＰ（５μＭ）含有ＡｓＣｐｆ１タンパク質（配列番号１０００）、ＡｓＣｐｆ１　ＲＲタンパク質（配列番号１０３６）又は表１８のｇＲＮＡ標的化ドメインを含む単一ｇＲＮＡと複合体化したＡｓＣｐｆ１　ＲＶＲ（配列番号１０３７）（使用した特定のＣｐｆ１分子についてはｇＲＮＡ　ＩＤ名称を参照されたい）を動員された末梢血（ｍＰＢ）ＣＤ３４＋細胞に送達した。７２時間後、細胞からゲノムＤＮＡを抽出し、次にＰＣＲ増幅された標的部位のIllumina配列決定（ＮＧＳ）により、挿入／欠失のレベルを分析した。各ｇＲＮＡの編集の百分率（インデル＝欠失及び挿入）が上記の表１８に示される。特定の実施形態では、表１８に記載されるｇＲＮＡの１つ又は複数を含むＣｐｆ１　ＲＮＰを使用し、表１７に列挙される領域を標的化してＨｂＦ発現を誘導し得、「ブースター要素」と共に同時送達し、Ｃｐｆ１　ＲＮＰ単独の編集レベルと比較してより高い編集レベルを達成し得る。

【０３７３】

実施例２０：　ＣＣＡＡＴボックスを標的化するＨＢＧ１－１－Ｃｐｆ１　ＲＮＰとｓｓＯＤＮとの同時送達は、ヒト造血幹／前駆細胞における遺伝子編集の増加をサポートする

「４ｎｔ欠失」（ＨＢＧΔ－１１２：－１１５）をコード化する１００ｎｔのｓｓＯＤＮ（５０／５０相同性）ドナー鋳型とＣａｓ９　ＲＮＰとの同時送達は、より長い１８０ｎｔ鋳型と同等の結果を生じることが実証された（実施例１０及び図２３）ことから、「１８ｎｔ欠失」を生成する１００ｎｔのｓｓＯＤＮ（ＨＢＧ　Δ－１０４：－１２１）（すなわちｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４３１（配列番号１０４０）、表１１）をＣｐｆ１　ＲＮＰと共に同時送達し、編集結果をさらに調査した。

【０３７４】

簡潔に述べると、ヒトサイトカインを補充した培地中でヒト成人ｍＰＢ　ＣＤ３４＋細胞を２日間にわたり予備刺激し、修飾ＨＢＧ１－１　ｇＲＮＡ（配列番号１０４１、表１４）（「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１　ＲＮＰ」）に複合体化したＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａタンパク質（配列番号１０３２、表１４）を含む６μＭのＲＮＰ単独で又はＯＬＩ１６４３１（０．５～６μＭ）との組み合わせで電気穿孔した。ＲＮＰと、プラス鎖相同性アームを有する１８ｎｔ欠失をコード化するｓｓＯＤＮドナー（ＯＬＩ１６４３１）との同時送達は、電気穿孔の７２時間後に抽出されたゲノムＤＮＡからのＨＢＧ　ＰＣＲ産物の配列解析によって判定されるように、ドナーなしでは８．０％であった編集頻度を７５．６％に高めた（図３５Ａ）。このレベルの編集は、バックグラウンドを約２４％上回るＨｂＦレベルの増加を可能にした（図３５Ａ）。さらに、ＤＡＰＩ除外によって測定される細胞生存率（図３５Ｂ）又はコロニー形成能（図３５Ｃ）には、試験されたいずれの用量でも低下が観察され

なかったことに留意すべきである。

【０３７５】

実施例２１：　遠位ＣＣＡＡＴボックス部位を標的化するＲＮＰにおける編集を最大化するためのＨＢＧ１－１－Ｃｐｆ１　ＲＮＰ及びＯＬＩ１６４３１投与量の最適化

　ｓｓＯＤＮとＲＮＰとを同時送達した場合に編集の増加が実証された（実施例９～１１、１３、２０）ことから、全編集を最大化するために、同一の方法を用いて各成分の投与量を最適化した。簡潔に述べると、０～１２μＭのＯＬＩ１６４３１（配列番号１０４０、表１１）と共に０～１２μＭで同時送達される、未修飾ＨＢＧ１－１　ｇＲＮＡ（配列番号１０２２、表１４）に複合体化したＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａタンパク質（配列番号１０３２、表１４）からなるＲＮＰ（「Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１　ＲＮＰ」）で投与マトリックスを準備した。８μＭのＯＬＩ１６４３１と共に同時送達される８μＭのＨｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１　ＲＮＰの用量を使用して、１４日間の赤血球培養に続いて、細胞から抽出されたゲノムＤＮＡからのＨＢＧ　ＰＣＲ産物を配列解析によって測定した際、最大８９．４％のインデルが達成された（図３６Ａ）。これは、これらの投与条件下において、バックグラウンドを＞３２％上回るＨｂＦレベルの増加と一致した（図３６Ａ）。このサンプル（Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳ　Ｈ８００Ａ＿ＨＢＧ１－１　ＲＮＰ［８μＭ］＋ＯＬＩ１６４３１［８μＭ］）の生存率は、電気穿孔の４８時間後及び赤血球培養の１４日後の両方において未処理対照サンプルと同等であった（図３６Ｂ）。

【０３７６】

　しかし、実施例１３で示唆されたように、＞８μＭのＯＬＩ１６４３１がＲＮＰなしで単独で細胞に電気穿孔された場合、アーチファクトが観察された。これらの条件下でＰＣＲ増幅を電気穿孔の４８時間後に実施した場合、システム内の過剰なｓｓＯＤＮに起因すると思われる偽陽性結果があった（図３６Ａを参照されたい、４８時間目における８μＭ及び１２μＭのＯＬＩ１６４３１単独（黒色バー））。ｓｓＯＤＮのより低い用量において且つより遅い時点では、この偽陽性は、もはや明白ではなかった（図３６Ａ、４８時間目における４μＭ及び６μＭのＯＬＩ１６４３１単独（黒色バー）並びに１４日目における４μＭ、６μＭ、８μＭ及び１２μＭのＯＬＩ１６４３１単独（淡い灰色バー））。さらに、ｓｓＯＤＮ単独群で観察された細胞生存率の低下（図３６Ｂ、４８時間目における１２μＭのＯＬＩ１６４３１単独による約５７％への低下（黒色バー））は、複合的な要因であり得る。４μＭ及び６μＭのｓｓＯＤＮ用量で偽陽性結果がなかったことは、このアーチファクトが過剰なｓｓＯＤＮに起因し得ることを示唆する。これらの要因は、８μＭ及び１２μＭのＯＬＩ１６４３１単独群（図３６Ａ、陰性対照と比較した灰色ドット）で観察されたベースラインＨｂＦレベルと並んで、ｓｓＯＤＮの添加によるＲＮＰ編集の実質的且つ持続的な増強が本物であり、アーチファクトではないという確信を提供する。

【０３７７】

実施例２２：　様々なＣｐｆ１とＨＢＧプロモーター領域を標的化するｇＲＮＡとを含有するＲＮＰは、赤血球子孫におけるＨｂＦタンパク質発現の誘導を促進する、ヒト造血幹／前駆細胞における遺伝子編集サポートする

　配列番号１０２２、１０２３、１０４１～１０９３、１０９８～１１０６を含むガイドＲＮＡ（表１９）は、様々なＣｐｆ１変異型酵素（配列番号１０３２、１０９４～１０９７、１１０７～１１０９、表２０）に複合体化させ、様々なＲＮＰ複合体（表２１）を形成した。ＲＮＰは、５’末端への修飾及び／又は３’末端への修飾を有するｇＲＮＡ（表１９）を含有した。配列番号１０２２、１０２３、１０４１～１０８４、１０９８～１１０６を含むガイドＲＮＡ（表１９）は、遠位ＣＣＡＡＴボックス標的領域に同一予測切断部位を有し、関連標的化ドメインは、２０量体、２１量体、２２量体又は２３量体プロトスペーサー配列をそれぞれ含むｇＲＮＡ（表２２、表２３）について、配列番号１００２（ＨＢＧ１－１）、配列番号１２５４（ＨＢＧ１－１－２１量体）、配列番号１２５６（ＨＢＧ１－１－２２量体）、配列番号１２５８（ＨＢＧ１－１－２３量体）に記載される配

列を含有する。場合により、配列番号１２６０（ＡｓＣｐｆ１　ＨＢＧ１プロモーター－１（２１量体））、配列番号１２６２（ＡｓＣｐｆ１　ＨＢＧ１プロモーター－２（２１量体））又は配列番号１２６４（ＡｓＣｐｆ１　ＨＢＧ１プロモーター－６（２１量体）に記載される配列を含有する標的化ドメイン（表２２、表２３）を含む、配列番号１０８５～１０９６のガイドＲＮＡをはじめとするＨＢＧプロモーター内の他の位置を標的化するｇＲＮＡも試験した。表２１は、実施例２２～２４で試験された各ＲＮＰ並びに各ＲＮＰ複合体を形成するｇＲＮＡの配列番号及びＣｐｆ１変異型の配列番号の一覧を提供する。各ｇＲＮＡ及びＣｐｆ１変異型に関する追加的な情報は、それぞれ表１９及び表２０に見出され得る。

【０３７８】

実施例２２及び２３で使用したｇＲＮＡは、化学的に合成した。オリゴヌクレオチド合成のための化学物質は、BioAutomation、Glen Research、Millipore Sigma、Sigma-Aldrich、ChemGenes及びThermo Fisher Scientificから購入した。合成に使用した固体支持体は、ChemGenesからのUnylinker 2000 Å ＣＰＧ樹脂、2’-TBDMS rU 2000 Å ＣＰＧ樹脂又は2'-O-メチルアデノシン（N-Ｂｚ）Icaa 2000 Å ＣＰＧ樹脂のいずれかであった。ＲＮＡ（ＴＢＤＭＳで保護される）及びＤＮＡホスホラミダイトは、Thermo Fisher Scientificから入手された。特定の実施形態では、Glen ResearchからのＤＤＴＴ（3-((ジメチルアミノ-メチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-チオン）の溶液による硫化ステップ中、ホスホロチオエートが導入された。オリゴヌクレオチドは、BioAutomation MerMade 12合成機又はGE Aekta OligoPilot 100合成機のいずれかの上で標準的なＲＮＡ及びＤＮＡホスホロアミダイト化学作用を用いて合成した。合成に続いて、オリゴヌクレオチドを固体支持体から切断し、水酸化アンモニウム／メチルアミン及びＴＥＡ－３ＨＦを使用して二段階工程で脱保護した。脱塩後、分取ＨＰＬＣ上で逆相クロマトグラフィーを用いてオリゴヌクレオチドを精製した。

【０３７９】

最初に、ｇＲＮＡの５’末端が修飾されたｇＲＮＡを含むＲＮＰを使用して、編集の効果を試験した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、ＲＮＰ複合体（６．０μＭ及び１２μＭ）を１×10^6個のｍＰＢ　ＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して送達した。電気穿孔の７２時間後、ＰＣＲ増幅された標的部位のIllumina配列決定（ＮＧＳ）により、標的部位の挿入／欠失のレベルを解析した。結果は、修飾のないｇＲＮＡを含むＲＮＰ（ＲＮＰ３３、「ＨＢＧ１－１－ＡｓＣｐｆ１　ＲＮＰ」とも称される、表１４）又はｇＲＮＡの５’末端に対する、５ｎｔのＲＮＡ（ＲＮＰ３７）、１０ｎｔのＲＮＡ（ＲＮＰ３８）、２５ｎｔのＲＮＡ（ＲＮＰ３９）、６０ｎｔのＲＮＡ（ＲＮＰ４０）、５ｎｔのＤＮＡ（ＲＮＰ４１）、１０ｎｔのＤＮＡ（ＲＮＰ４２）、２５ｎｔのＤＮＡ（ＲＮＰ４３）及び６０ｎｔのＤＮＡ（ＲＮＰ４４）の付加をはじめとする修飾があるＲＮＰ（表２１）がオンターゲット編集を支持することを実証する（図３７）。

【０３８０】

次に、Ｃｐｆ１　ＲＮＰと、Ｓｐ１８２死滅ＲＮＰ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９（配列番号１０３３）と複合体化した配列番号１０２７（表１４）を含む死滅ｇＲＮＡ）又はｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４３１（配列番号１０４０、表１１）との同時送達の効果を試験した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中の４８時間の予備刺激に続いて、様々な濃度（６μＭ、８μＭ、８μＭ及び１２μＭ）のＲＮＰ３３（５’又は３’ｇＲＮＡ修飾なし、表２１）複合体を有する投与マトリックスをＳｐ１８２　ＲＮＰ（８μＭ、８μＭ、６μＭ及び４μＭ）又はｓｓＯＤＮ　ＯＬＩ１６４３１（８μＭ、８μＭ、６μＭ及び４μＭ）と共に５．２５×10^6個のｍＰＢ　ＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して同時送達した。電気穿孔に続いて、細胞をさらに４８時間培養に戻した。次いで、バルク細胞集団におけるｇＤＮＡ抽出及びインデル定量化のために、ＣＤ３４細胞の一部を分割した。さらに、表現型前駆細胞及び表現型造血幹細胞（ＨＳＣ）における編集を調べるために、ＨＳＰＣ亜集団を免疫表現型決定（Notta 20

11）によって（残りのＣＤ３４細胞中で）特性決定し、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）によって分離した。電気穿孔の４８時間後における免疫表現型決定は、ｈＣＤ３４、ｈＣＤ３８、ｈＣＤ４５ＲＡ、ｈＣＤ９０及びｈＣＤ１２３に対する抗体を有する細胞を染色することで実施した。表現型ＨＳＣは、ｈＣＤ３４ｂｒｉｇｈｔ ｈＣＤ３８ ｈＣＤ９０＋ ｈＣＤ４５ＲＡ－として定義され、前駆細胞は、ｈＣＤ３４ｂｒｉｇｈｔ ＣＤ３８＋として定義される。これらの２つの集団をＦＡＣＳで選別し、ＤＮＡを抽出して、これらの亜集団の編集レベルを判定した。ＰＣＲ増幅された標的のIllumina配列決定（ＮＧＳ）により、標的部位の挿入／欠失のレベルを解析した。結果は、「ブースター要素」Ｓｐ１８２ ＲＮＰ又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１と共に同時送達されたＲＮＰ３３は、ＲＮＰ３３を単独で送達した場合に観察されたレベル（図３７）よりも高いレベルでオンターゲット編集をサポートすることを実証する（図３８Ａ～Ｂ）。

【０３８１】

次に、ＲＮＰ３３（５’又は３’ｇＲＮＡ修飾なし、表２１）、ＲＮＰ４３（＋２５ ＤＮＡ ５’ｇＲＮＡ修飾、表２１）又はＲＮＰ３４（１×ＰＳ２－ＯＭｅ＋１×ＯＭｅ ３’ｇＲＮＡ修飾、表２１）と、Ｓｐ１８２ ｄｇＲＮＡ（表１５）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（表１１）との同時送達の効果を試験した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、ＲＮＰ３３、ＲＮＰ３４又はＲＮＰ４３複合体（８μＭ）をＳｐ１８２ ＲＮＰ（８μＭ）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（８μＭ）と共に５．２５×１０^{6}個のｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して同時送達した。電気穿孔に続いて、細胞をさらに４８時間培養に戻し、インデル定量化のために表現型の前駆細胞及び表現型のＨＳＣ画分に選別した。電気穿孔の４８時間後、ＰＣＲ増幅された標的部位のIllumina配列決定（ＮＧＳ）により、標的部位の挿入／欠失のレベルを解析した。結果は、「ブースター要素」Ｓｐ１８２ ＲＮＰ又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１と共に同時送達された５’修飾又は３’修飾を有するｇＲＮＡを含有するＲＮＰがオンターゲット編集をサポートすることを実証する（図３９）。試験された両方のブースター要素は、ＲＮＰ３４及びＲＮＰ３３と同等の編集レベルを提供した。ブースター要素なしで得られた編集レベルと比較すると、ＲＮＰ３３編集は、両方のブースター要素によって増強された一方、ＲＮＰ４３編集は、Ｓｐ１８２ ＲＮＰの添加によってのみ増強された（図３７、３９）。

【０３８２】

次に、異なるＣｐｆ１タンパク質のＲＮＰ編集に対する効果を試験した。様々なＣｐｆ１タンパク質を含むＲＮＰとの化学量論比の比較（ｇＲＮＡ：Ｃｐｆ１）を実施した。簡潔に述べると、ＲＮＰ（ＲＮＰ６４、ＲＮＰ６３、ＲＮＰ４５、表２１）を、ｇＲＮＡがモル過剰である２又は４のいずれかの化学量論比（ｇＲＮＡ：Ｃｐｆ１の複合体形成比）で送達した。全てのＲＮＰは、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、MaxCyte電気穿孔を介して８μＭで１×１０^{6}個のＣＤ３４＋細胞に送達した。電気穿孔に続いて、インデル定量化前に細胞をさらに７２時間培養に戻した。結果は、試験された濃度では、化学量論比が変更されても編集率に差がないことを実証した（図４０）。ＲＮＰ４５（Ｃｐｆ１タンパク質配列番号１０９４からなる）は、ＲＮＰ６３（Ｃｐｆ１タンパク質配列番号１０９５からなる）及びＲＮＰ６４（Ｃｐｆ１配列番号１１０９からなる）より性能が優れている。

【０３８３】

次に、Ｓｐ１８２ ＲＮＰ又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１と、異なるＣｐｆ１タンパク質を含有する様々なＲＮＰとの同時送達の効果を試験した。簡潔に述べると、ＲＮＰ（ＲＮＰ３３、ＲＮＰ６４、ＲＮＰ６３、ＲＮＰ４５、表２１）を単独で又はＳｐ１８２ ＲＮＰ又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１と組み合わせて送達した。全ての試薬は、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、MaxCyte電気穿孔を介して８μＭで１×１０^{6}個のＣＤ３４＋細胞に送達した。電気穿孔に続いて、インデル定量化前に細胞をさらに７２時間培養に戻した。結果は、「ブースター要素」Ｓｐ１８２ ＲＮＰ又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１が、試験された全てのＲＮＰにつ

いて編集を強化したことを示す（図４１）。

【０３８４】

様々な５’ＤＮＡ延長を有するｇＲＮＡを含有するＲＮＰ又は５’ＤＮＡ延長がないＲＮＰ（ＲＮＰ４５）を使用した編集の効果をｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１あり又はなしの同時送達で試験した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、MaxCyte電気穿孔を介して８μＭの濃度でＲＮＰ（ＲＮＰ４５（５’修飾なし）、ＲＮＰ４６、ＲＮＰ４７、ＲＮＰ４８、ＲＮＰ４９、ＲＮＰ５０、ＲＮＰ５１、ＲＮＰ５２、ＲＮＰ５３、ＲＮＰ５４、ＲＮＰ５５、ＲＮＰ５６及びＲＮＰ５７、表２１）を１×１０^{6}個のＣＤ３４＋細胞に単独で送達するか、又は８μＭのｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１と共に同時送達した。電気穿孔に続いて、インデル定量化前に細胞を培養に戻した。結果は、全てのＲＮＰがオンターゲット編集をサポートすることを実証する（図４２）。

【０３８５】

同一５’ＤＮＡ延長を有するが、異なる３’ｇＲＮＡ修飾を有するｇＲＮＡを含むＲＮＰを使用した編集の効果を試験して、３’ｇＲＮＡ修飾の影響を評価した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、MaxCyte電気穿孔を介して８μＭの濃度において、５’末端が一致するが、３’ｇＲＮＡ修飾が異なるｇＲＮＡ（ＲＮＰ４９対ＲＮＰ５８及びＲＮＰ５９対ＲＮＰ６０）を含むＲＮＰを１×１０^{6}個のＣＤ３４＋細胞に送達した。電気穿孔に続いて、インデル定量化前に細胞を培養に戻した。いずれの比較でも、３’ＰＳ－ＯＭｅを有するｇＲＮＡを含有するＲＮＰは、電気穿孔の２４時間後、未修飾３’バージョンよりも優れていた（図４３）。

【０３８６】

次に、ＲＮＰ５８について、異なる濃度のＣｐｆ１及びｇＲＮＡを試験した。簡潔に述べると、２：１、１：１又は０．５：１のモル濃度比のいずれかの化学量論比（ｇＲＮＡ：Ｃｐｆ１の複合体形成比）で４８時間の予備刺激に続いて、ＲＮＰ５８（＋２５ ＤＮＡ５’ｇＲＮＡ修飾及び１ｘＰＳ－ＯＭｅ ３’ｇＲＮＡ修飾、表２１）を１×１^{6}０個のＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して送達した。電気穿孔に続いて、インデル定量化前に細胞を培養に戻した。試験された全ての用量において、ＲＮＰを２：１の比率で複合体化させたときに編集が最適であった（図４４Ａ～Ｂ）。

【０３８７】

同一５’ＤＮＡ延長を有するが、異なる３’ｇＲＮＡ修飾を有するｇＲＮＡを含むＲＮＰを使用した編集の効果をさらに試験して、３’ｇＲＮＡ修飾の影響を評価した。簡潔に述べると、４８時間の予備刺激に続いて、５’末端が一致するが、３’ｇＲＮＡ修飾が異なるｇＲＮＡを含むＲＮＰ（ＲＮＰ５８、ＲＮＰ２、ＲＮＰ３、ＲＮＰ４、ＲＮＰ５、ＲＮＰ６、ＲＮＰ７、ＲＮＰ８、ＲＮＰ９、ＲＮＰ１０）を様々な濃度（１μＭ、２μＭ、４μＭ）で、１×１０^{6}個のＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して送達した。電気穿孔に続いて、インデル定量化前に細胞を培養に戻した。結果は、全てのＲＮＰがオンターゲット編集をサポートすることを示す（図４５Ａ～Ｂ）。

【０３８８】

次に、ＨＢＧプロモーターの様々な領域を標的化する３’ｇＲＮＡ修飾を有するか又は５’及び３’修飾を有するｇＲＮＡを含むＲＮＰによる編集を試験した。これらとしては、標的化ドメイン配列番号１２６０（ＡｓＣｐｆ１ ＨＢＧ１プロモーター－１（２１量体））、１２６２（ＡｓＣｐｆ１ ＨＢＧ１プロモーター－２（２１量体））、１２６４（ＡｓＣｐｆ１ ＨＢＧ１プロモーター－６（２１量体））を含むガイドＲＮＡ配列番号１０８５～１０９６が挙げられる（表２２、表２３）。遠位ＣＣＡＡＴボックス標的領域に変えて、これらのｇＲＮＡは、表１７から選択される領域内に編集事象を提供するように構成される。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、未修飾５’ｇＲＮＡ及び１ｘＰＳ－ＯＭｅ ３’ｇＲＮＡ修飾を含有するｇＲＮＡを含むＲＮＰ（ＲＮＰ１１、ＲＮＰ１６、ＲＮＰ１９及びＲＮＰ２２、表２１）、＋２０ ＤＮＡ＋２ｘＰＳ ５’ｇＲＮＡ修飾及び１ｘＰＳ－ＯＭｅ ３’ｇＲ

ＮＡ修飾を含有するｇＲＮＡを含むＲＮＰ（ＲＮＰ１２、ＲＮＰ２１及びＲＮＰ２４、表２１）、＋２５　ＤＮＡ　５’ｇＲＮＡ修飾及び１ｘＰＳ－ＯＭｅ　３’ｇＲＮＡ修飾を含有するｇＲＮＡを含むＲＮＰ（ＲＮＰ５８及びＲＮＰ２０、表２１）を８μＭの濃度で１×１０^{6}個のＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して送達した。ｍＰＢ　ＣＤ３４＋細胞の編集に続いて、赤血球系統への生体外分化を１８日間実施し（Giarratana 2011）、インデル分析のために培養１４日目にｇＤＮＡを単離した。簡潔に述べると、ＲＮＰを上述のようにＣＤ３４＋細胞に送達した。ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の回復に続いて、処理された細胞を計数して赤血球分化培地に移し、細胞計数及び栄養供給を４、７、１０及び１４日目に実施して、１８日目に赤血球を採取した。これらのＣＤ３４＋由来の赤血球細胞を計数し、ＨＰＬＣ等級の水中で溶解してから、濾過し細胞残骸を除去した。次に、γ-グロビン鎖の相対発現レベル（全β様グロビン鎖に対する）を各試料についてＵＰＬＣによって測定し、０．１％トリフルオロ酢酸含有水に対する０．１％トリフルオロ酢酸含有アセトニトリルの比率を徐々に増加させることにより、タンパク質の分離を達成した（図４６Ａ～Ｃ）。図４６Ａ～Ｃは、全てのＲＮＰがオンターゲット編集をサポートしたことを示した。しかし、特定の標的部位における編集のみがＨＢＦ発現の増加をもたらす。ＲＮＰ５８の濃度（０、１μＭ、２μＭ、４μＭ）を変化させて、同一の実験を実施した（図４７）。

【０３８９】

次に、異なるＣｐｆ１タンパク質のＲＮＰ編集に対する効果を試験した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、様々なＣｐｆ１タンパク質に複合体化した配列番号１０５１（＋２５　ＤＮＡ　５’ｇＲＮＡ修飾及び１ｘＰＳ－ＯＭｅ　３’ｇＲＮＡ修飾、表１９）を含むｇＲＮＡを含むＲＮＰ５８、ＲＮＰ２６、ＲＮＰ２７及びＲＮＰ２８（表２１）を８μＭで１×１０^{6}個のＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して送達した。結果は、全てのＲＮＰがオンターゲット編集をサポートすることを実証した（図４８）。

【０３９０】

次に、様々な５’ｇＲＮＡ修飾を有するｇＲＮＡ及び同一の３’修飾を有するｇＲＮＡを含有する異なるＲＮＰの効果を試験した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、ＲＮＰ（ＲＮＰ５８（＋２５　ＤＮＡ　５’ｇＲＮＡ修飾及び１ｘＰＳ－ＯＭｅ　３’ｇＲＮＡ修飾）、ＲＮＰ２９（＋２５　ＤＮＡ＋２ｘＰＳ　５’ｇＲＮＡ修飾及び１ｘＰＳ－ＯＭｅ　３’ｇＲＮＡ修飾）、ＲＮＰ３０（ポリＡ　ＲＮＡ＋２ｘＰＳ　５’ｇＲＮＡ修飾及び１ｘＰＳ－ＯＭｅ　３’ｇＲＮＡ修飾）並びにＲＮＰ３１（ＰｏｌｙＵ　ＲＮＡ＋２ｘＰＳ　５’ｇＲＮＡ修飾及び１ｘＰＳ－ＯＭｅ　３’ｇＲＮＡ修飾）（表２１））を１μＭ、２μＭ又は４μＭで１×１０^{6}個のＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して送達した（ＲＮＰ３０は細胞の入手可能性が原因で１μＭでは試験しなかった）。結果は、全てのＲＮＰがオンターゲット編集をサポートすることを実証した（図４９）。

【０３９１】

次に、異なるＣｐｆ１タンパク質のＲＮＰ編集に対する効果を試験した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、様々なＣｐｆ１タンパク質に複合体化した配列番号１０５１（＋２５　ＤＮＡ　５’ｇＲＮＡ修飾及び１ｘＰＳ－ＯＭｅ　３’ｇＲＮＡ修飾、表１９）を含むｇＲＮＡを含むＲＮＰ５８、ＲＮＰ２７及びＲＮＰ２６（表２１）を２μＭ又は４μＭで１×１０^{6}個のＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して送達した。バルクＣＤ３４、表現型の前駆細胞及び表現型の造血幹細胞（ＨＳＣ）における編集を調べるために、ＨＳＰＣ亜集団を特性決定した。このように電気穿孔に続いて、細胞をさらに４８時間培養に戻し、インデル定量化のために前駆細胞及びＨＳＣ画分に選別した。電気穿孔の４８時間後、ＰＣＲ増幅された標的部位のIllumina配列決定（ＮＧＳ）により、標的部位の挿入／欠失のレベルを解析した。結果は、全てのＲＮＰがバルクＣＤ３４、表現型の前駆細胞及び表現型の造血幹細胞においてオンターゲット編集をサポートすることを実証した（図５０）。

【０３９２】
次に、異なるＣｐｆ１タンパク質を含有するＲＮＰに対する、ＲＮＰと、Ｓｐ１８２ ＲＮＰ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９（配列番号１０３３）に複合体化した配列番号１０２７（表１４）を含む死滅ｇＲＮＡ）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（配列番号１０４０、表１１）との同時送達の効果を試験した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、ＲＮＰ６１、ＲＮＰ６２、ＲＮＰ３４（表２１）を８μＭでＳｐ１８２ ＲＮＰ（８μＭ）又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（８μＭ）と共に２５×１０^{6}個のｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して同時送達した。バルクＣＤ３４、表現型の前駆細胞及び表現型の造血幹細胞（ＨＳＣ）における編集を調べるために、ＨＳＰＣ亜集団を特性決定した。このように電気穿孔に続いて、細胞をさらに４８時間培養に戻し、インデル定量化のために前駆細胞及びＨＳＣ画分に選別した。電気穿孔の４８時間後、ＰＣＲ増幅された標的部位のIllumina配列決定（ＮＧＳ）により、標的部位の挿入／欠失のレベルを解析した。結果は、「ブースター要素」Ｓｐ１８２ ＲＮＰ又はｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１と共に同時送達されたＲＮＰがオンターゲット編集をサポートすることを実証する（図５１）。これらの細胞の一部は、生体内生着モデルでさらに特性決定するために電気穿孔の２４時間後にも凍結保存した（実施例２３を参照されたい）。

【０３９３】
次に、ＲＮＰ５８及びＲＮＰ３２編集の効果を試験した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、ＲＮＰ５８及びＲＮＰ３２（表２１）を２μＭで６×１０^{6}個のｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して送達した。バルクＣＤ３４、表現型の前駆細胞及び表現型ＨＳＣにおける編集を調べるために、ＨＳＰＣ亜集団を特性決定した。このように電気穿孔に続いて、細胞をさらに４８時間培養に戻し、インデル定量化のために前駆細胞及びＨＳＣ画分に選別した。電気穿孔の４８時間後、ＰＣＲ増幅された標的部位のIllumina配列決定（ＮＧＳ）により、標的部位の挿入／欠失のレベルを解析した。結果は、ＲＮＰ５８及びＲＮＰ３２がオンターゲット編集をサポートすることを実証する（図５２）。

【０３９４】
ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、ＲＮＰ５８及びＲＮＰ１（表２１）を２μＭ～８μＭの濃度で２５×１０^{6}個のｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して送達した。バルクＣＤ３４、表現型の前駆細胞及び表現型の造血幹細胞（ＨＳＣ）における編集を調べるために、ＨＳＰＣ亜集団を特性決定した。このように電気穿孔に続いて、細胞をさらに４８時間培養に戻し、インデル定量化のために前駆細胞及びＨＳＣ画分に選別した。電気穿孔の４８時間後、ＰＣＲ増幅された標的部位のIllumina配列決定（ＮＧＳ）により、標的部位の挿入／欠失のレベルを解析した。結果は、試験されたＲＮＰがオンターゲット編集をサポートすることを実証する（図５３）。これらの細胞の一部は、生体内生着モデをルさらに特性決定するために電気穿孔の２４時間後にも凍結保存した（実施例２３を参照されたい）。

【０３９５】
実施例２３： 編集されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞のＮＯＤ，Ｂ６．ＳＣＩＤ Ｉｌ２ｒγ－／－Ｋｉｔ（Ｗ４１／Ｗ４１）マウスへの輸液は、長期的な生着及びＨｂＦ誘導をもたらす

ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（配列番号１０４０、表１１）と共に同時送達されたＲＮＰ３４及びＲＮＰ３３（表２１）の送達が長期的な再増殖造血幹細胞における編集を達成するかどうかを判定するために、動員末梢血（ｍＰＢ）からのヒト成人ＣＤ３４＋細胞を非照射ＮＯＤ，Ｂ６．ＳＣＩＤ Ｉｌ２ｒγ－／－Ｋｉｔ（Ｗ４１／Ｗ４１）（Jackson lab系統名：NOD.Cg-Kit〈W-41J〉Tyr〈+〉Prkdc〈scid〉Il2rg〈tm1Wjl〉/ThomJ）（「ＮＢＳＧＷ」）マウスに輸液した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、８μＭの用量のＲＮＰ及び６μＭのｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１を６２．５×１０^{6}／ｍＬ個のｍＰＢ ＣＤ３４＋

細胞にMaxCyte電気穿孔を介して電気穿孔した。２４時間後、ｍＣＤ３４＋細胞を凍結保存した。５日後、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を解凍し、尾静脈注射を介して１マウス当たり１００万個の細胞でＮＢＳＧＷマウスに輸液した。８週間後、マウスを安楽死させ、大腿骨、脛骨及び骨盤骨から骨髄（ＢＭ）を採取した。ＣＤ１５＋、ＣＤ１９＋、グリコフォリンＡ（ＧｌｙＡ、ＣＤ２３５ａ＋）及び系統陰性ＣＤ３４＋としてそれぞれ同定された細胞の骨髄亜集団をＦＡＣＳによって単離し、ＤＮＡを抽出して、これらの画分のそれぞれにおける編集レベルを判定した。図５４は、次世代配列決定法によって判定された、未分画ＢＭ又は流動選別された個々のＢＭ亜集団のインデルの頻度を示す。

【０３９６】

次に、Ｓｐ１８２ ＲＮＰ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９（配列番号１０３３）に複合体化した配列番号１０２７（表１４）を含む死滅ｇＲＮＡ）と共に同時送達されたＲＮＰ３４又はＲＮＰ３３（表２１）の送達が長期的な再増殖造血幹細胞における編集を達成するかどうかを判定するために、動員末梢血（ｍＰＢ）からのヒト成人ＣＤ３４＋細胞を非照射ＮＢＳＧＷマウスに輸液した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、様々な用量のＲＮＰ及び様々な用量のＳｐ１８２ ＲＮＰを６２．５×１０^{6}／ｍＬ個のｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して電気穿孔した。２４時間後、ｍＣＤ３４＋細胞を凍結保存した。５日後、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を解凍し、尾静脈注射を介して１マウス当たり１００万個の細胞でＮＢＳＧＷマウスに輸液した。８週間後、マウスを安楽死させ、大腿骨、脛骨及び骨盤骨から骨髄（ＢＭ）を採取した。ＣＤ１５＋、ＣＤ１９＋、グリコフォリンＡ（ＧｌｙＡ、ＣＤ２３５ａ＋）及び系統陰性ＣＤ３４＋としてそれぞれ同定された細胞の骨髄亜集団をＦＡＣＳによって単離し、ＤＮＡを抽出して、これらの画分のそれぞれにおける編集レベルを判定した。図５５Ａは、次世代配列決定法によって判定された、未分画ＢＭ又は流動選別された個々のＢＭ亜集団のインデルの頻度を示す。

【０３９７】

最後に、ＢＭ由来のＣＤ３４＋細胞による長期的なＨｂＦ誘導を解析した。ＢＭ細胞のアリコートを赤血球分化条件下で１８日間培養し（Giarratana 2011）、ＵＰＬＣによってＨｂＦ発現を評価した。簡潔に述べると、輸液の８週間後にマウスから抽出された未分画ＢＭ細胞を１８日間にわたり赤血球培養条件に置いた。細胞計数及び栄養供給を７日目、１０日目、１４日目に行い、１８日目に赤血球を採取した。これらの骨髄由来の赤血球細胞を計数し、ＨＰＬＣ等級の水中で溶解してから、濾過し細胞残骸を除去した。次に、γ-グロビン鎖の相対発現レベル（全β様グロビン鎖に対する）を各試料についてＵＰＬＣによって測定し、０．１％トリフルオロ酢酸含有水に対する０．１％トリフルオロ酢酸含有アセトニトリルの比率を徐々に増加させることにより、タンパク質の分離を達成した（図５４Ｂ）。これらのデータは、ヒトＣＤ３４＋細胞のＳｐ１８２ ＲＮＰ編集と共に同時送達されたＲＮＰ３４及びＲＮＰ３３により、堅固な長期的ＨｂＦ誘導が達成されることを実証する。

【０３９８】

次に、ｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１（配列番号１０４０、表１１）と共に同時送達されたＲＮＰ６１又はＲＮＰ６２（表２１）の送達が長期的な再増殖造血幹細胞における編集を達成するかどうかを判定するために、ｍＰＢからのヒト成人ＣＤ３４＋細胞を非照射ＮＢＳＧＷマウスに輸液した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、８μＭのＲＮＰ及び８μＭのｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１を６２．５×１０^{6}／ｍＬ個のｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して電気穿孔した。２４時間後、ｍＣＤ３４＋細胞を凍結保存した。４日後、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を解凍し、尾静脈注射を介して１マウス当たり１００万個の細胞でＮＢＳＧＷマウスに輸液した。８週間後、マウスを安楽死させ、大腿骨、脛骨及び骨盤骨から骨髄（ＢＭ）を採取した。ＣＤ１５＋、ＣＤ１９＋、グリコフォリンＡ（ＧｌｙＡ、ＣＤ２３５ａ＋）及び系統陰性ＣＤ３４＋としてそれぞれ同定された細胞の骨髄亜集団をＦＡＣＳによって単離し、ＤＮＡを抽出して、これらの画分のそれぞれにおける編集レベルを

判定した。図５６Ａは、次世代配列決定法によって判定された、未分画ＢＭ又は流動選別された個々のＢＭ亜集団のインデルの頻度を示す。

【０３９９】

最後に、ＢＭ由来のＣＤ２３５ａ＋（ＧｌｙＡ＋）赤血球細胞による長期的なＨｂＦ誘導を解析した。ＢＭ細胞のアリコートを赤血球分化条件下で１８日間培養し、ＵＰＬＣによってＨｂＦ発現を評価した。簡潔に述べると、輸液の８週間後にマウスから抽出された未分画ＢＭ細胞を１８日間にわたり赤血球培養条件に置いた。図５６Ｂは、赤血球細胞によるγ／β様鎖（％）として計算されたＨｂＦ発現を示す。これらのデータは、ヒトＣＤ３４＋細胞のｓｓＯＤＮ ＯＬＩ１６４３１編集と共に同時送達されたＲＮＰ６１及びＲＮＰ６２により、堅固な長期的なＨｂＦ誘導が達成されることを実証する。

【０４００】

次に、ＲＮＰ１又はＲＮＰ５８（表２１）の送達が長期的な再増殖造血幹細胞における編集を達成するかどうかを判定するために、ｍＰＢからのヒト成人ＣＤ３４＋細胞を非照射ＮＢＳＧＷマウスに輸液した。簡潔に述べると、ＳＣＦ、ＴＰＯ及びＦＬＴ３を補充したX-Vivo 10培地中で４８時間の予備刺激に続いて、４μＭ又は８μＭのＲＮＰ１又は２μＭ、４μＭ又は８μＭのＲＮＰ５８を６２．５×１０^{6}／ｍＬ個のｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞にMaxCyte電気穿孔を介して電気穿孔した。２４時間後、ｍＣＤ３４＋細胞を凍結保存した。４日後、ｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞を解凍し、尾静脈注射を介して１マウス当たり１００万個の細胞でＮＢＳＧＷマウスに輸液した。８週間後、マウスを安楽死させ、大腿骨、脛骨及び骨盤骨から骨髄（ＢＭ）を採取した。ＢＭにおけるヒトキメラ現象並びに系統再構成（ＣＤ４５＋、ＣＤ１４＋、ＣＤ１９＋、グリコフォリンＡ（ＧｌｙＡ、ＣＤ２３５ａ＋）、系統並びにＣＤ３４＋及びマウスＣＤ４５＋マーカー発現）は、フローサイトメトリーによって判定し解析した（図５７）。ＧｌｙＡ＋細胞の頻度は、ＢＭ中のＧｌｙＡ＋細胞／全細胞として計算した。ヒトキメラ現象は、ヒトＣＤ４５／（ヒトＣＤ４５＋ｍＣＤ４５）として定義した。

【０４０１】

模擬形質移入されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞と比較して、同様のキメラ現象及び系統分布は、ＲＮＰで形質移入されたｍＰＢ ＣＤ３４＋細胞によって移植の８週間後に達成され、編集が造血幹細胞の生着可能性を維持することと同等であることを実証する。図５８は、輸液の８週間後、未分画ＢＭの次世代配列決定法によって判定されたインデルを示す。図５９は、２μＭ、４μＭ又は８μＭのＲＮＰ５８による、ＢＭ、ＣＤ１５＋、ＣＤ１９＋、グリコフォリンＡ（ＧｌｙＡ、ＣＤ２３５ａ＋）及びｌｉｎ－ＣＤ３４＋細胞のインデル率の頻度を示す。

【０４０２】

また、編集されたＣＤ３４＋細胞に由来するＣＤ２３５ａ＋（ＧｌｙＡ＋）赤血球細胞による長期的なＨｂＦ誘導についても解析した。骨髄から得られたＧｌｙＡ＋細胞を蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）によって単離して収集し、ＨＰＬＣ等級水中で溶解した。溶解産物は、次に、ＵＰＬＣによってＨｂＦ発現について評価した。図６０は、ＧｌｙＡ＋細胞によるγ／β様鎖（％）として計算されたＨｂＦ発現を示す。これらのデータは、様々な濃度のＲＮＰ５８によるヒトＣＤ３４＋細胞のＲＮＰ５８編集により、堅固な長期的なＨｂＦ誘導が達成されることを実証する。

【０４０３】

重要なことに、異なる濃度のＲＮＰ１又はＲＮＰ５８で電気穿孔されたＣＤ３４$^{+}$細胞は、造血コロニー形成細胞（ＣＦＣ）アッセイで判定されるように、それらの生体外造血活性を維持した（すなわち未処理ドナー適合ＣＤ３４$^{+}$細胞陰性対照と比較して赤血球コロニー及び骨髄球コロニーの量又は多様性に差はなかった）（図６１）。

【０４０４】

<u>実施例２４：　編集された造血幹細胞を使用したβ-ヘモグロビン症の治療</u>

本明細書に開示される方法及びゲノム編集システムは、それを必要とする患者における鎌状赤血球症又はβ-サラセミアなどのβ-異常ヘモグロビン症の治療に使用され得る。例

えば、自己由来処置において、患者に由来する細胞に対してゲノム編集を実施し得る。患者の細胞の生体外における修正及び患者への細胞の再導入は、ＨｂＦ発現の増加及びβ-異常ヘモグロビン症の治療をもたらし得る。

【０４０５】

例えば、ＨＳＣは、当業者に周知の技術を用いて、β-異常ヘモグロビン症を有する患者の骨髄から抽出し得る。ＨＳＣは、ゲノム編集のために、本明細書で開示される方法を用いて修飾され得る。例えば、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと複合体化した、ＨＢＧ遺伝子の１つ又は複数の領域を標的化するガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含むＲＮＰを使用して、ＨＳＣを編集し得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１タンパク質であり得る。特定の実施形態では、Ｃｐｆ１タンパク質は、修飾Ｃｐｆ１タンパク質であり得る。特定の実施形態では、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、配列番号１０００、１００１、１００８～１０１８、１０３２、１０３５～３９、１０９４～１０９７、１１０７～０９（Ｃｐｆ１ポリペプチド配列）又は配列番号１０１９～１０２１、１１１０～１７（Ｃｐｆ１ポリヌクレオチド配列）に記載される配列によってコード化され得る。例えば、修飾Ｃｐｆ１タンパク質は、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化され得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、修飾又は未修飾ｇＲＮＡであり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１３、表１８又は表１９に記載される配列を含み得る。例えば、特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、配列番号１０５１に記載される配列を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、表２１に記載されるＲＮＰ複合体を含み得る。例えば、ＲＮＰ複合体は、配列番号１０５１に記載される配列を含むｇＲＮＡと、配列番号１０９７に記載される配列によってコード化される修飾Ｃｐｆ１タンパク質とを含み得る（ＲＮＰ３２、表２１）。特定の実施形態では、修飾ＨＳＣは、未修飾ＨＳＣと比較してヒトＨＢＧ１遺伝子、ＨＢＧ２遺伝子又はその両方のインデルの頻度又はレベルに増加を有する。特定の実施形態では、修飾ＨＳＣは、増加したレベルのＨｂＦを発現する赤血球細胞に分化し得る。修飾ＨＳＣの集団は、輸液又は当業者に知られている他の方法を介した患者への再導入のために選択され得る。再導入のための修飾ＨＳＣの集団は、例えば、修飾ＨＳＣの赤血球子孫のＨｂＦ発現の増加又は修飾ＨＳＣのインデル頻度の増加に基づいて選択され得る。いくつかの実施形態では、細胞の再導入前の任意の形態のアブレーションは、修飾ＨＳＣの生着を増強するために用いられ得る。他の実施形態では、末梢血幹細胞（ＰＢＳＣ）は、当業者に周知の技術（例えば、アフェレーシス又は白血球アフェレーシス）を使用してβ-異常ヘモグロビン症を有する患者から抽出され得、幹細胞は、ＰＢＳＣから除去され得る。上記のゲノム編集方法は、幹細胞に対して実施され得、修飾幹細胞は、上記のように患者に再導入され得る。

【０４０６】

【表１９】

表 20:Cpf1 タンパク質変種

Cpf1 変種 ID	Cpf1 変種アミノ酸配列番号	Cpf1 変種ヌクレオチド配列番号
His-AsCpf1-sNLS-sNLS H800A	配列番号 1032	配列番号 1110
Cpf1-1	配列番号 1094	配列番号 1111
Cpf1-2	配列番号 1095	配列番号 1112
Cpf1-3	配列番号 1096	配列番号 1113
Cpf1-4	配列番号 1097	配列番号 1114
Cpf1-5	配列番号 1107	配列番号 1115
Cpf1-6	配列番号 1108	配列番号 1116
Cpf1-7	配列番号 1109	配列番号 1117

【０４０７】

【表２０－１】

表 21:RNP 複合体

RNP 名称	gRNA 配列番号*	Cpf1 アミノ酸配列番号**
RNP64	配列番号 1022	配列番号 1109
RNP1	配列番号 1051	配列番号 1095
RNP2	配列番号 1098	配列番号 1094
RNP3	配列番号 1099	配列番号 1094
RNP4	配列番号 1100	配列番号 1094
RNP5	配列番号 1101	配列番号 1094
RNP6	配列番号 1068	配列番号 1094
RNP7	配列番号 1102	配列番号 1094
RNP8	配列番号 1081	配列番号 1094
RNP9	配列番号 1082	配列番号 1094
RNP10	配列番号 1083	配列番号 1094
RNP11	配列番号 1069	配列番号 1094
RNP12	配列番号 1084	配列番号 1094
RNP16	配列番号 1085	配列番号 1094
RNP19	配列番号 1088	配列番号 1094
RNP20	配列番号 1089	配列番号 1094
RNP21	配列番号 1090	配列番号 1094
RNP22	配列番号 1091	配列番号 1094
RNP23	配列番号 1048	配列番号 1097
RNP24	配列番号 1093	配列番号 1094
RNP26	配列番号 1051	配列番号 1096
RNP27	配列番号 1051	配列番号 1107
RNP28	配列番号 1051	配列番号 1108
RNP29	配列番号 1103	配列番号 1094
RNP30	配列番号 1104	配列番号 1094
RNP31	配列番号 1105	配列番号 1094
RNP32	配列番号 1051	配列番号 1097
RNP33	配列番号 1022	配列番号 1032
RNP34	配列番号 1041	配列番号 1032
RNP37	配列番号 1042	配列番号 1032
RNP38	配列番号 1043	配列番号 1032
RNP39	配列番号 1044	配列番号 1032
RNP40	配列番号 1045	配列番号 1032
RNP41	配列番号 1046	配列番号 1032
RNP42	配列番号 1047	配列番号 1032
RNP43	配列番号 1048	配列番号 1032
RNP44	配列番号 1049	配列番号 1032
RNP45	配列番号 1022	配列番号 1094
RNP46	配列番号 1046	配列番号 1094
RNP47	配列番号 1047	配列番号 1094
RNP48	配列番号 1052	配列番号 1094
RNP49	配列番号 1048	配列番号 1094
RNP50	配列番号 1053	配列番号 1094

【０４０８】

【表２０－２】

RNP51	配列番号 1054	配列番号 1094
RNP52	配列番号 1055	配列番号 1094
RNP53	配列番号 1056	配列番号 1094
RNP54	配列番号 1057	配列番号 1094
RNP55	配列番号 1058	配列番号 1094
RNP56	配列番号 1059	配列番号 1094
RNP57	配列番号 1060	配列番号 1094
RNP58	配列番号 1051	配列番号 1094
RNP59	配列番号 1067	配列番号 1094
RNP60	配列番号 1068	配列番号 1094
RNP61	配列番号 1041	配列番号 1095
RNP62	配列番号 1041	配列番号 1094
RNP63	配列番号 1022	配列番号 1095
*表 19 を参照されたい **表 20 を参照されたい		

【０４０９】

【表２１】

表 22:Cpf1 HBG1 標的化ドメイン及び予測切断部位

gRNA ID	gRNA 標的化ドメイン (RNA)	gRNA 標的化ドメイン (DNA)	HBG1 における標的化ドメイン座標*	HBG1 における予測切断部位座標#	鎖	標的化ドメイン長さ
HBG1-1	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)	CCTTGTCAAGGCTATTGGTC(配列番号1003)	Chr11:5249954-5249974	Chr11:5249973, Chr11:5249977	+	20
HBG1-1 (21 量体)	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA(配列番号1254)	CCTTGTCAAGGCTATTGGTCA(配列番号1255)	Chr11:5249954-Chr11:5249975	Chr11:5249973, Chr11:5249977	+	21
HBG1-1 (22 量体)	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCAA (配列番号 1256)	CCTTGTCAAGGCTATTGGTCAA (配列番号 1257)	Chr11:5249954-Chr11:5249976	Chr11:5249973, Chr11:5249977	+	22
HBG1-1 (23 量体)	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCAAG (配列番号 1258)	CCTTGTCAAGGCTATTGGTCAAG (配列番号 1259)	Chr11:5249954-Chr11:5249976	Chr11:5249973, Chr11:5249977	+	23
AsCpf1 HBG1 プロモーター-1	AGACAGAUAUUUGCAUUGAG(配列番号1139)	AGACAGATATTTGCATTGAG(配列番号1140)	Chr11:5250023-Chr11:5250043	Chr11:5250042, Chr11:5250046	+	20
AsCpf1 HBG1 プロモーター-1 (21 量体)	AGACAGAUAUUUGCAUUGAGA (配列番号 1260)	AGACAGATATTTGCATTGAGA (配列番号 1261)	Chr11:5250023-Chr11:5250044	Chr11:5250042, Chr11:5250046	+	21
AsCpf1 HBG1 プロモーター-2	CAUUGAGAUAGUGUGGGGAA(配列番号1141)	CATTGAGATAGTGTGGGGAA(配列番号1142)	Chr11:5250036-Chr11:5250056	Chr11:5250055, Chr11:5250059	+	20
AsCpf1 HBG1 プロモーター-2 (21 量体)	CAUUGAGAUAGUGUGGGGAAG (配列番号 1262)	CATTGAGATAGTGTGGGGAAG (配列番号 1263)	Chr11:5250036-Chr11:5250057	Chr11:5250055, Chr11:5250059	+	21
AsCpf1 HBG1 プロモーター-6	CUUCUCCCAUCAUAGAGGAU (配列番号 1149)	CTTCTCCCATCATAGAGGAT (配列番号 1150)	Chr11:5250160-Chr11:5250180	Chr11:5250179, Chr11:5250183	+	20
AsCpf1 HBG1 プロモーター-6 (21 量体)	CUUCUCCCAUCAUAGAGGAUA (配列番号 1264)	CTTCTCCCATCATAGAGGATA (配列番号 1265)	Chr11:5250160-Chr11:5250181	Chr11:5250179, Chr11:5250183	+	21

*NCBI 参照配列 NC_000011、座標は 1 ベースの座標系「Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p12 Primary Assembly」(Version NC_000011.10)を使用して報告される。
Zetsche et al, 2015 に基づく予測切断部位、座標はゼロベースの座標を用いて報告される。

【０４１０】

【表２２】

表 23:Cpf1 HBG2 標的化ドメイン及び予測切断部位

gRNA ID	gRNA 標的化ドメイン (RNA)	gRNA 標的化ドメイン (DNA)	HBG2 における標的化ドメイン座標*	HBG2 における予測切断部位座標#	鎖	標的化ドメイン長さ
HBG1-1	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号 1002)	CCTTGTCAAGGCTATTGGTC (配列番号 1003)	Chr11:5254878 Chr11:5254898	Chr11:5254897, Chr11:5254901	+	20
HBG1-1 21 量体	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA (配列番号 1254)	CCTTGTCAAGGCTATTGGTCA(配列番号 1255)	Chr11:5254878 Chr11:5254899	Chr11:5254897, Chr11:5254901	+	21
HBG1-1 22 量体	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCAA (配列番号 1256)	CCTTGTCAAGGCTATTGGTCAA (配列番号 1257)	Chr11:5254878 Chr11:5254900	Chr11:5254897, Chr11:5254901	+	22
HBG1-1 23 量体	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCAAG (配列番号 1258)	CCTTGTCAAGGCTATTGGTCAAG (配列番号 1259)	Chr11:5254878 Chr11:5254901	Chr11:5254897, Chr11:5254901	+	23
AsCpf1 HBG1 プロモーター-1	AGACAGAUAUUUGCAUUGAG (配列番号 1139)	AGACAGATATTTGCATTGAG (配列番号 1140)	Chr11:5254947 Chr11:5254967	Chr11:5254966 Chr11:5254970	+	20
AsCpf1 HBG1 プロモーター-1 (21 量体)	AGACAGAUAUUUGCAUUGAGA (配列番号 1260)	AGACAGATATTTGCATTGAGA (配列番号 1261)	Chr11:5254947 Chr11:5254968	Chr11:5254966 Chr11:5254970	+	21
AsCpf1 HBG1 プロモーター-2	CAUUGAGAUAGUGUGGGGAA (配列番号 1141)	CATTGAGATAGTGTGGGGAA (配列番号 1142)	Chr11:5254960 Chr11:5254980	Chr11:5254979 Chr11:5254983	+	20
AsCpf1 HBG1 プロモーター-2 (21 量体)	CAUUGAGAUAGUGUGGGGAAG (配列番号 1262)	CATTGAGATAGTGTGGGGAAG (配列番号 1263)	Chr11:5254960 Chr11:5254981	Chr11:5254979 Chr11:5254983	+	21

*NCBI 参照配列 NC_000011、座標は 1 ベースの座標系「Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p12 Primary Assembly」(Version NC_000011.10)を使用して報告される。
#(Zetsche et al, 2015)に基づく予測切断部位、座標はゼロベースの座標を用いて報告される。

【０４１１】

【表２３】

表 24:gRNA 5'延長

5'延長 配列番号:	5'延長配列	5'修飾
1231	rCrUrUrUrU	+5 RNA
1232	rArArGrArCrCrUrUrUrU	+10 RNA
1233	rArUrGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+25 RNA
1234	rArGrGrCrCrArGrCrUrUrGrCrCrGrGrUrUrUrUrUrUrArGrUrCrGrUrGrCrUrGrCrUrUrCrArUrGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+60 RNA
1235	CTTTT	+5 DNA
1236	AAGACCTTTT	+10 DNA
1237	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+25 DNA
1238	AGGCCAGCTTGCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+60 DNA
1239	TTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+20 DNA
1240	GCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+30 DNA
1241	GCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+50 DNA
1242	TAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+40 DNA
1243	C*C*GAAGTTTTCTTCGGTTTT	+20 DNA + 2xPS
1244	T*T*TTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+25 DNA + 2xPS
1245	A*A*CGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+30 DNA + 2xPS
1246	G*C*GTTGTTTTCAACGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+41 DNA + 2xPS
1247	G*G*CTTCTTTTGAAGCCTTTTTGCGTTGTTTTCAACGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+62 DNA + 2xPS
1248	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+25 DNA + 2xPS
1249	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	+25 A
1250	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	+25 T
1251	mA*mU*rGrUrGrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+25 RNA + 2xPS
1252	mA*mA*rArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArA	PolyA RNA + 2xPS
1253	mU*mU*rUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrU	PolyU RNA + 2xPS

全ての塩基は大文字である
小文字「r」は RNA、2'-ヒドロキシを表し;「r」で修飾されていない塩基は DNA である
全ての塩基は、特に記載されている場合を除き、標準的なホスホジエステル結合を介して連結されている;
「*」はホスホロチオエート修飾を表す
「PS」はホスホロチオエート修飾を表す

【０４１２】

【表２４－１】

表 19:Cpf1 ガイド RNA

gRNA 配列の配列番号	gRNA 配列	5'修飾**	3'修飾	crRNA+ gRNA 標的化ドメインの長さ	gRNA 標的化ドメインの長さ	gRNA 標的化ドメイン (RNA)
1022	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	-	-	40	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1023	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUmC/PS2/mA	-	1xPS2-OMe + 1xOMe	41	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA (配列番号1254)
1041	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGmU/PS2/mC	-	1xPS2-OMe + 1xOMe	40	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1042	rCrUrUrUrUrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+5 RNA	-	45	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1043	rArArGrArCrCrUrUrUrUrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+10 RNA	-	50	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1044	rArUrGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+25 RNA	-	65	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)

【０４１３】

【表２４－２】

1045	rArGrGrCrCrArGrCrUrUrGrCrCrGrGrUrUrUrUrUrArGrUrCrGrUrGrCrUrGrCrUrUrCrArUrGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrUrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+60 RNA	-	100	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1046	CTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+5 DNA	-	45	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1047	AAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrUrGrGrUrC	+10 DNA	-	50	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1048	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+25 DNA	-	65	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1049	AGGCCAGCTTGCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+60 DNA	-	100	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)

【０４１４】

【表２４－３】

1050	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUmC/PS2/mA	+25 DNA	1xPS2-OMe + 1xOMe	66	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA(配列番号1254)
1051	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC*mA	+25 DNA	1xPS-OMe	66	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA(配列番号1254)
1052	TTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+20 DNA	-	60	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1053	GCTTCATGTGTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+30 DNA	-	70	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1054	GCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+50 DNA	-	90	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1055	TAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+40 DNA	-	80	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)

【０４１５】

【表２４－４】

1056	C*C*GAAGTTTTCTTCGGTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+20 DNA + 2xPS	-	60	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1057	T*T*TTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+25 DNA + 2xPS	-	65	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1058	A*A*CGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+30 DNA + 2xPS	-	70	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1059	G*C*GTTGTTTTCAACGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+41 DNA + 2xPS	-	81	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1060	G*G*CTTCTTTTGAAGCCTTTTTGCGTTGTTTTCAACGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+62 DNA + 2xPS	-	102	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1061	mUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	1xOMe	-	40	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)

【０４１６】

【表２４－５】

1062	mU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	1xPS-OMe	-	40	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1063	mUmArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	2xOMe	-	40	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1064	mU*mA*rArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	2xPS-OMe	-	40	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1065	mUmAmArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	3xOMe	-	40	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1066	mU*mA*mA*rUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	3xPS-OMe	-	40	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1067	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC	+25 DNA + 2xPS	-	65	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1068	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC*mA	+25 DNA + 2xPS	1xPS-OMe	66	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA (配列番号1254)

【０４１７】

【表２４－６】

1069	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC*mA	-	1xPS-OMe	41	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA (配列番号1254)
1070	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCmA*rU	-	1xPS-OMe + rU	42	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA (配列番号1254)
1071	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCrU	-	rU	41	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1072	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCrArU	-	rU	42	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA(配列番号1254)
1073	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCrArArGrU	-	rU	44	23	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCAAG(配列番号1258)
1074	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCrU	+25 DNA + 2xPS	rU	66	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1075	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCrArArGrU	+25 DNA + 2xPS	rU	69	23	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCAAG (配列番号1258)

【０４１８】

【表２４－７】

1076	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCrA	-	-	41	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA (配列番号1254)
1077	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCrArArG	-	-	43	23	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCAAG (配列番号1258)
1078	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCrArArG	+25 DNA + 2xPS	-	68	23	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCAAG (配列番号1258)
1079	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCrUrUrU	-	4xrU	44	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1080	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCmU*mU*mU*rU	-	3xPS-OMe-U + rU	44	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1081	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrCrUrUrU	+25 DNA + 2xPS	4xrU	69	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1082	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAArUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC*mA	+25 A	1xPS-OMe	66	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA (配列番号1254)

【０４１９】

【表２４－８】

1083	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC*mA	+25 T	1xPS-OMe	66	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA (配列番号1254)
1084	C*C*GAAGTTTTCTTCGGTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC*mA	+20 DNA + 2xPS	1xPS-OMe	61	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA (配列番号1254)
1085	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrArGrArCrArGrArUrArUrUrUrGrCrArUrUrGrArG*mA	-	1xPS-OMe	41	21	AGACAGAUAUUUGCAUUGAGA (配列番号1260)
1086	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrArGrArCrArGrArUrArUrUrUrGrCrArUrUrGrArG*mA	+25 DNA	1xPS-OMe	66	21	AGACAGAUAUUUGCAUUGAGA(配列番号1260)
1087	C*C*GAAGTTTTCTTCGGTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrArGrArUrArUrUrUrGrCrArUrUrGrArG*mA	+20 DNA + 2xPS	1xPS-OMe	61	21	AGACAGAUAUUUGCAUUGAGA (配列番号1260)
1088	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrUrGrArGrArUrArGrUrGrUrGrGrArA*mG	-	1xPS-OMe	41	21	CAUUGAGAUAGUGUGGGGAAG (配列番号1262)
1089	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrUrGrArGrArUrArGrUrGrUrGrGrArA*mG	+25 DNA	1xPS-OMe	66	21	CAUUGAGAUAGUGUGGGGAAG(配列番号1262)

【０４２０】

【表２４－９】

1090	C*C*GAAGTTTTCT TCGGTTTTrUrArAr UrUrUrCrUrArCrUrC rUrUrGrUrArGrArUr CrArUrUrGrArGrAr UrArGrUrGrUrGrGr GrGrArA*mG	+20 DNA + 2xPS	1xPS-OMe	61	21	CAUUGAGAU AGUGUGGGG AAG (配列番号 1262)
1091	rUrArArUrUrUrCrUr ArCrUrCrUrUrGrUrA rGrArUrCrUrUrCrUr CrCrCrArUrCrArUrA rGrArGrGrArU*mA	-	1xPS-OMe	41	21	CUUCUCCCA UCAUAGAGG AUA (配列番号 1264)
1092	ATGTGTTTTTGTC AAAAGACCTTTTr UrArArUrUrUrCrUr ArCrUrCrUrUrGrUrA rGrArUrCrUrUrCrUr CrCrCrArUrCrArUrA rGrArGrGrArU*mA	+25 DNA	1xPS-OMe	66	21	CUUCUCCCA UCAUAGAGG AUA (配列番号 1264)
1093	C*C*GAAGTTTTCT TCGGTTTTrUrArAr UrUrUrCrUrArCrUrC rUrUrGrUrArGrArUr CrUrUrCrUrCrCrCrA rUrCrArUrArGrArGr GrArU*mA	+20 DNA + 2xPS	1xPS-OMe	61	21	CUUCUCCCA UCAUAGAGG AUA (配列番号 1264)
1098	A*T*GTGTTTTTGTC AAAAGACCTTTTr UrArArUrUrUrCrUr ArCrUrCrUrUrGrUrA rGrArUrCrCrUrUrGr UrCrArArGrGrCrUrA rUrUrGrGrUrCmA*r U	+25 DNA + 2xPS	1xPS-OMe + rU	67	21	CCUUGUCAA GGCUAUUGG UCA (配列番号 1254)
1099	A*T*GTGTTTTTGTC AAAAGACCTTTTr UrArArUrUrUrCrUr ArCrUrCrUrUrGrUrA rGrArUrCrCrUrUrGr UrCrArArGrGrCrUrA rUrUrGrGrUrCmA*m A*rU	+25 DNA + 2xPS	2xPS-OMe + rU	68	22	CCUUGUCAA GGCUAUUGG UCAA (配列番号 1256)

【０４２１】

【表２４－１０】

1100	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUmC*rU	+25 DNA + 2xPS	1xPS-OMe + rU	66	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC(配列番号1002)
1101	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrU*mC	+25 DNA + 2xPS	1xPS-OMe	65	20	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUC (配列番号1002)
1102	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC*mA*mA	+25 DNA + 2xPS	2xPS-OMe	67	22	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCAA(配列番号1256)
1103	mA*mU*rGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrUrGrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC*mA	+25 RNA + 2xPS	1xPS-OMe	66	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA (配列番号1254)
1104	mA*mA*rArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrUrUrGrUrCrArArGrGrCrUrArUrUrGrGrUrC*mA	PolyA RNA + 2xPS	1xPS-OMe	66	21	CCUUGUCAAGGCUAUUGGUCA (配列番号1254)

【０４２２】

【表２４－１１】

1105	mU*mU*rUrUrUr

【表２５】

表 25:配列リストに提示される配列:

配列番号:	説明
1-2, 4-6, 12, 14	Cas9 ポリペプチド
3, 7-11, 13	Cas9 コード配列
15-23, 52-123	Cas9 RuvC 様ドメイン
24-28, 124-198	Cas9 HNH 様ドメイン
29-31, 38-51	全長モジュラー及び単分子 gRNA
32-37	gRNA 近位及び尾部ドメイン
199-205	PAM 配列
251-901, 1002	gRNA 標的化ドメイン (RNA) - 表 2、19、22、23 を参照されたい
910-919, 943-945, 956-959, 1003	gRNA 標的化ドメイン (DNA) - 表 7、9 を参照されたい
920-929, 946-948, 960-963, 1004	gRNA 標的化ドメインプラス PAM (NGG) (RNA) - 表 7、9 を参照されたい
930-939, 949-951, 964-967, 1005	gRNA 標的化ドメインプラス PAM (NGG) (DNA) - 表 7、9 を参照されたい
970, 971, 996, 997	gRNA 配列 (DNA) - 表 10、12 を参照されたい
972, 973, 998, 999	gRNA 配列 (DNA) - 表 10、12 を参照されたい
902, 903	HPFH 欠失部位を含むヒト *HBG1* 及び *HBG2* プロモーター配列
904-909, 974-995	オリゴヌクレオチドドナー配列及び相同性アーム - 表 8、11 を参照されたい
968-969	*BCL11Ae* 配列
1006, 1007	核局在化シグナル配列
1000, 1001, 1008-1018 1032-1039 1094-1097, 1107-1109	Cpf1 ポリペプチド配列
1019-1021 1110-1117	Cpf1 ヌクレオチド配列

【０４２５】

参照による援用

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

【０４２６】

均等物

当業者は、日常的実験のみを用いて、本明細書に記載される特定の実施形態の多数の均等物を認識するか又は見極めることができるであろう。このような均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

以下に、出願当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

［１］　プレボテラ属（Prevotella）及びフランシセラ属（Francisella）１（Ｃｐｆ１）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はその変異型からのＣＲＩＳＰＲと、細胞内のＨＢＧ遺伝子のプロモーターにおける標的部位に結合することができるｇＲＮＡとを含むＲＮＰ複合体。
［２］　前記ｇＲＮＡは、修飾されているか又は未修飾である、［１］に記載のＲＮＰ複合体。
［３］　細胞内のＨＢＧ遺伝子のプロモーターを改変する方法であって、前記細胞を、［１］に記載のＲＮＰ複合体に接触させるステップを含む方法。
［４］　前記改変は、ＨＢＧ遺伝子の前記プロモーターのＣＣＡＡＴボックス標的領域内のインデルを含む、［３］に記載の方法。
［５］　前記標的部位は、Ｃｈｒ１１（NC_000011.10）５，２４９，９０４～５，２４９，９２７（表１７、領域６）；Ｃｈｒ１１（NC_000011.10）５，２５４，８７９～５，２５４，９０９（表１７、領域１６）；又はそれらの組み合わせに位置するヌクレオチドを含む、［１］に記載のＲＮＰ複合体。
［６］　単離細胞であって、［１］に記載のＲＮＰ複合体の前記細胞への送達によって生成されたＨＢＧ遺伝子のプロモーターにおける改変を含む単離細胞。
［７］　ｇＲＮＡ及びＣｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はその変異型を含むＲＮＰ複合体を使用するゲノム編集により、ヒト細胞内の胎児型ヘモグロビン（ＨｂＦ）のレベルを増加させて、ＨＢＧ遺伝子のプロモーターにおける改変に影響を及ぼして、それによりＨｂＦの発現を増加させる生体外方法。
［８］　ＣＤ３４＋又は造血幹細胞の集団であって、前記集団の１つ又は複数の細胞は、ＨＢＧ遺伝子のプロモーターにおける改変を含み、前記改変は、ｇＲＮＡ及びＣｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はその変異型を含むＲＮＰ複合体を前記ＣＤ３４＋又は造血性幹細胞の集団に送達することによって生成される、ＣＤ３４＋又は造血幹細胞の集団。
［９］　鎌状赤血球症の１つ又は複数の症状の緩和を、それを必要とする対象において行う方法であって、
ａ）ＣＤ３４＋又は造血幹細胞の集団を前記対象から単離するステップと；
ｂ）ｇＲＮＡ及びＣｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ又はその変異型を含むＲＮＰ複合体を前記単離細胞の集団に送達することにより、生体外で前記単離細胞の集団を修飾して、それにより前記集団の１つ又は複数の細胞におけるＨＢＧ遺伝子のプロモーターの改変に影響を及ぼすステップと；
ｃ）前記修飾された細胞の集団を前記対象に投与して、それにより前記対象における鎌状赤血球症の１つ又は複数の症状を緩和させるステップと
を含む方法。
［１０］　前記改変は、前記ＨＢＧ遺伝子の前記プロモーターのＣＣＡＡＴボックス標的領域内のインデルを含む、［９］に記載の方法。
［１１］　前記ＲＮＰ複合体は、電気穿孔を使用して送達される、［９］に記載の方法。
［１２］　［９］に記載の方法に従って修飾された細胞の集団であって、前記細胞の集団における前記細胞の少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％又は少なくとも約９０％は、生産的インデルを含む、細胞の集団。
［１３］　５’末端及び３’末端を含み、且つ前記５’末端におけるＤＮＡ延長と、前記３’末端における2'-O-メチル-3’-ホスホロチオエート修飾とを含むｇＲＮＡであって、標的部位とハイブリダイズすることができるＲＮＡセグメントと、Ｃｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼに結合することができるＲＮＡセグメントとを含むｇＲＮＡ。
［１４］　前記ＤＮＡ延長は、配列番号１２３５～１２５０に記載される配列を含む、［１３］に記載のｇＲＮＡ。
［１５］　Ｃｐｆ１ ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及び［１４］に記載のｇＲＮＡを含むＲＮＰ複合体。
【０４２７】

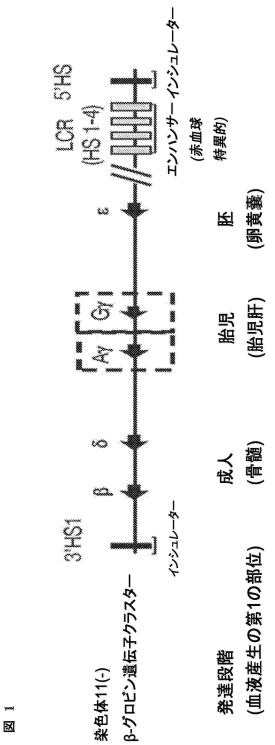
参考文献

Ahern et al., Br J Haematol 25(4):437-444 (1973)
Akinbami Hemoglobin 40:64-65 (2016)
Aliyu et al. Am J Hematol 83:63-70 (2008)
Anders et al. Nature 513(7519):569-573 (2014)
Angastiniotis & Modell Ann N Y Acad Sci 850:251-269 (1998)
Bae et al. Bioinformatics 30(10):1473-1475 (2014)
Barbosa et al. Braz J Med Bio Res 43(8):705-711 (2010)
Bouva Hematologica 91(1):129-132 (2006)
Briner et al. Mol Cell 56(2):333-339 (2014)
Brousseau Am J Hematol 85(1):77-78 (2010)
Caldecott Nat Rev Genet 9(8):619-631 (2008)
Canvers et al. Nature 527(12):192-197 (2015)
Chang et al. Mol Ther Methods Clin Dev 4:137-148 (2017)
Chassanidis Ann Hematol 88(6):549-555 (2009)
Chylinski et al. RNA Biol 10(5):726-737 (2013)
Cong et al. Science 399(6121):819-823 (2013)
Costa et al., Cad Saude Publica 18(5):1469-1471 (2002)
Davis & Maizels 2 Proc Natl Acad Sci USA 111(10):E924-932 (2014)
Fine et al. Sci Rep. 5:10777 (2015)
Frit et al. DNA Repair (Amst) 17:81-97 (2014)
Fu et al. Nat Biotechnol 32:279-284 (2014)
Gao et al. Nat Biotechnol.: 35(8):789-792 (2017)
Giarratana et al. Blood:118, 5071 - 5079 (2011)
Guilinger et al. Nat Biotechnol 32:577-582 (2014)
Heigwer et al. Nat Methods 11(2):122-123 (2014)
Hsu et al. Nat Biotechnol 31(9):827-832 (2013)
Iyama & Wilson DNA Repair (Amst) 12(8):620-636 (2013)
Jiang et al. Nat Biotechnol 31(3):233-239 (2013)
Jinek et al. Science 337(6096):816-821 (2012)
Jinek et al. Science 343(6176):1247997 (2014)
Kleinstiver et al. Nature 523(7561):481-485 (2015a)
Kleinstiver et al. Nat Biotechnol 33(12):1293-1298 (2015b)
Kleinstiver et al. Nature 529(7587):490-495 (2016)
Komor et al. Nature 533(7603):420-424 (2016)
Lee et al. Nano Lett 12(12):6322-6327 (2012)
Lewis "Medical-Surgical Nursing: Assessment and Management of Clinical Problems" (2014)
Li Cell Res 18(1):85-98 (2008)
Makarova et al. Nat Rev Microbiol 9(6):467-477 (2011)
Mali et al. Science 339(6121):823-826 (2013)
Mantovani et al. Nucleic Acids Res 16(16):7783-7797 (1988)
Marteijn et al. Nat Rev Mol Cell Biol 15(7):465-481 (2014)
Martyn et al., Biochim Biophys Acta 1860(5):525-536 (2017)
Nishimasu et al. Cell 156(5):935-949 (2014)
Nishimasu et al. Cell 162:1113-1126 (2015)
Notta et al. Science 333(6039):218-21 (2011)
Ran & Hsu Cell 154(6):1380-1389 (2013)
Richardson et al. Nat Biotechnol 34:339-344 (2016)
Shmakov et al. Molecular Cell 60(3):385-397 (2015)

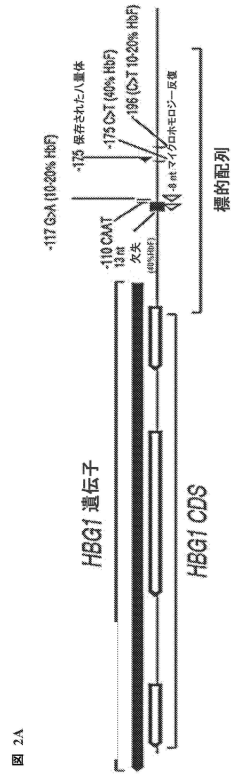
Sternberg et al. Nature 507(7490):62-67 (2014)
Superti-Furga et al. EMBO J 7(10):3099-3107 (1988)
Thein Hum Mol Genet 18(R2):R216-223 (2009)
Tsai et al. Nat Biotechnol 34(5): 483 (2016)
Waber et al. Blood 67(2):551-554 (1986)
Wang et al. Cell 153(4):910-918 (2013)
Xiao et al. Bioinformatics 30(8):1180-1182 (2014)
Xu et al. Genes Dev 24(8):783-798 (2010)
Yamano et al. Cell 165(4): 949-962 (2016)
Zetsche et al. Nat Biotechnol 33(2):139-42 (2015)

【図面】

【図１】



【図２Ａ】



【図２Ｂ】

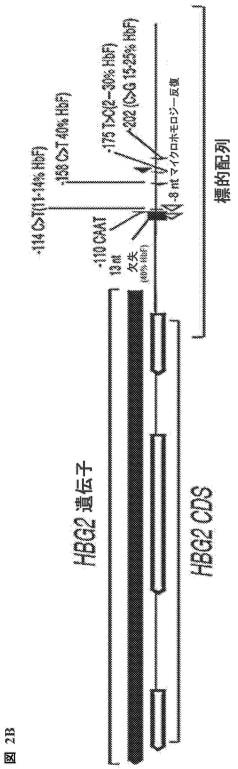
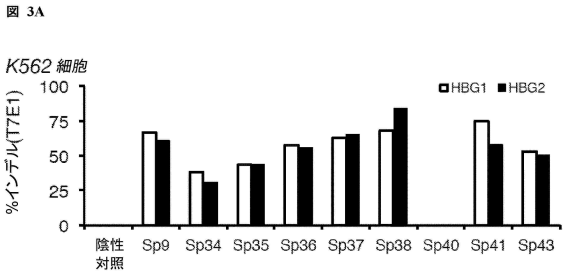
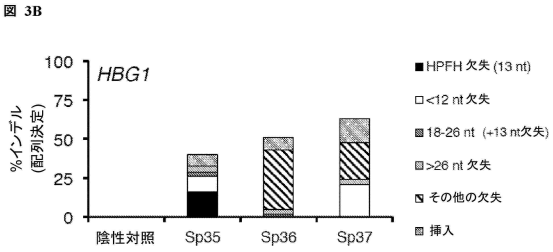


図 2B

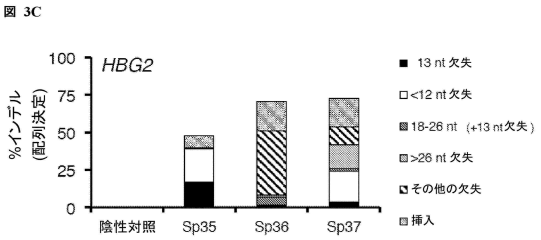
【図３Ａ】



【図３Ｂ】

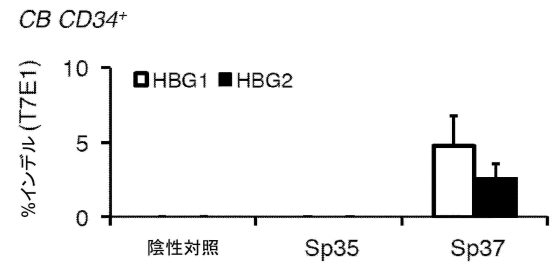


【図３Ｃ】



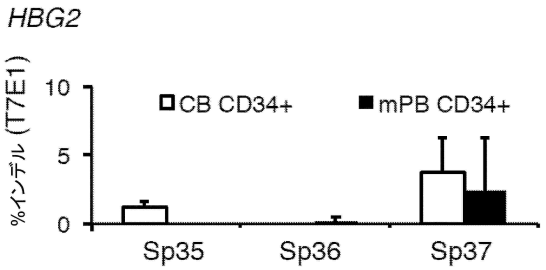
【図４Ａ】

図 4A



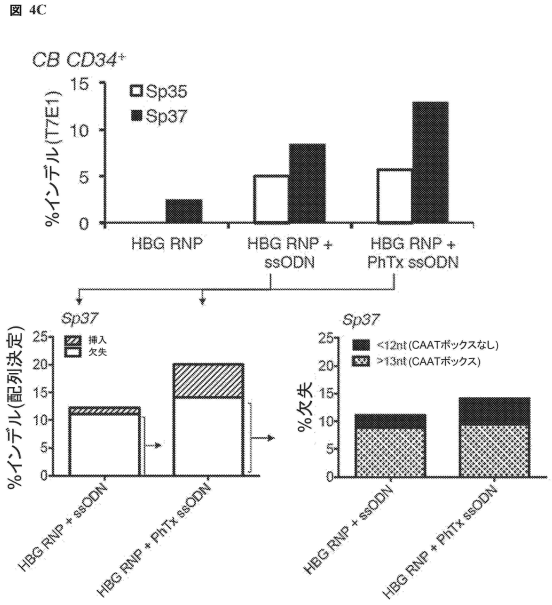
【図４Ｂ】

図 4B



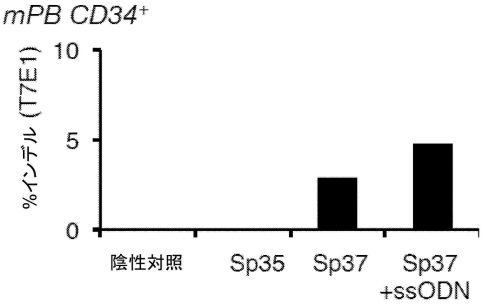
【図４Ｃ】

図 4C



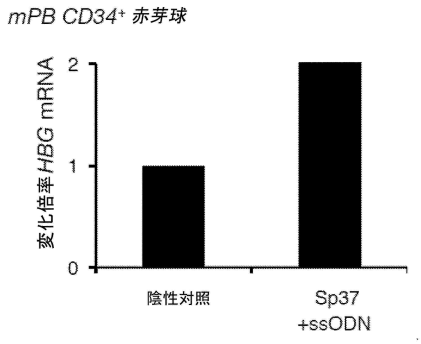
【図５Ａ】

図 5A



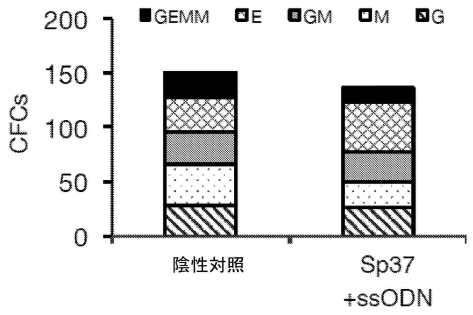
【図５Ｂ】

図 5B



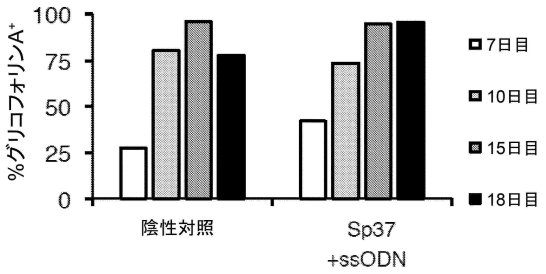
【図６Ａ】

図 6A



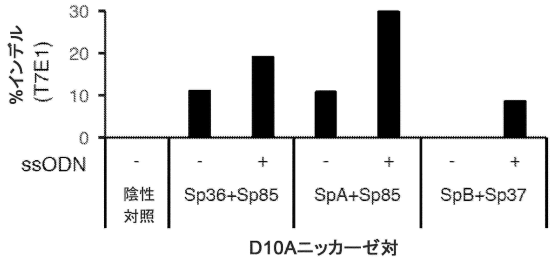
【図６Ｂ】

図 6B



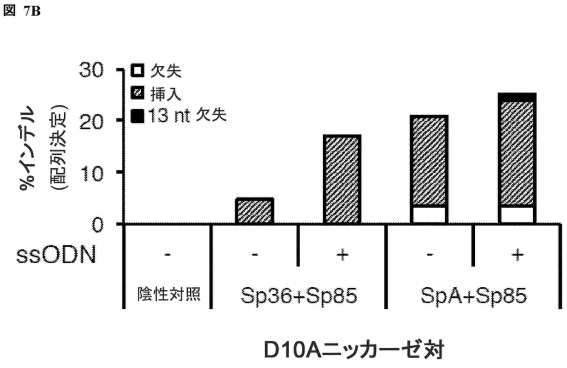
【図７Ａ】

図 7A



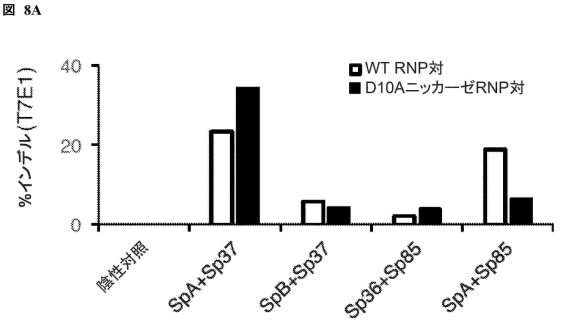
【図７Ｂ】

図 7B



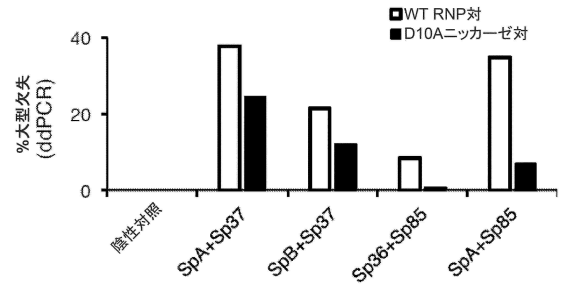
【図８Ａ】

図 8A



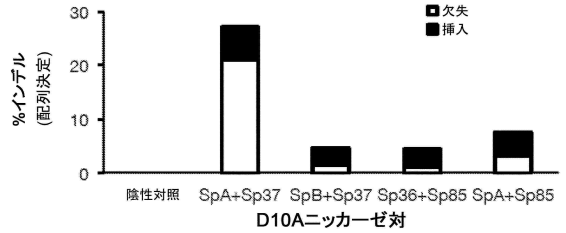
【図８Ｂ】

図 8B



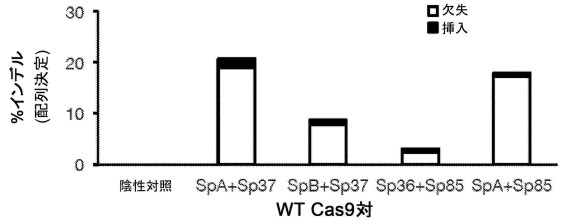
【図８Ｃ】

図 8C



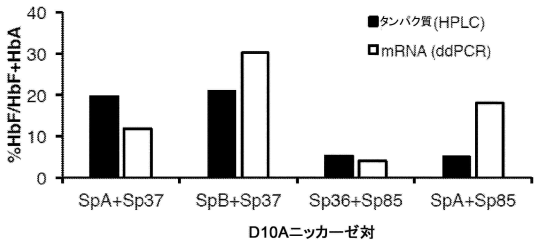
【図８Ｄ】

図 8D



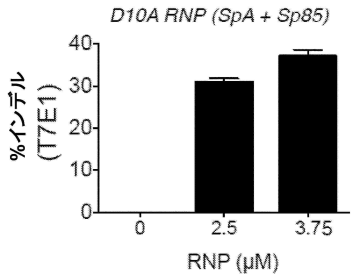
【図９】

図 9



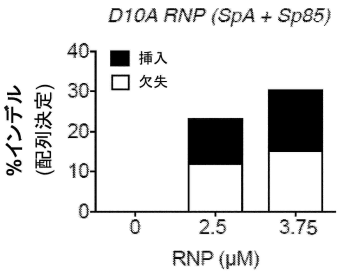
【図１０Ａ】

図 10A



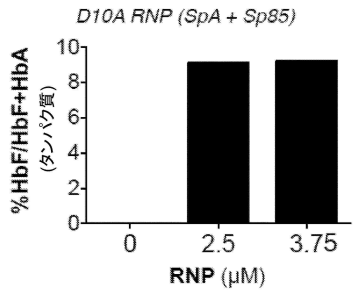
【図１０Ｂ】

図 10B



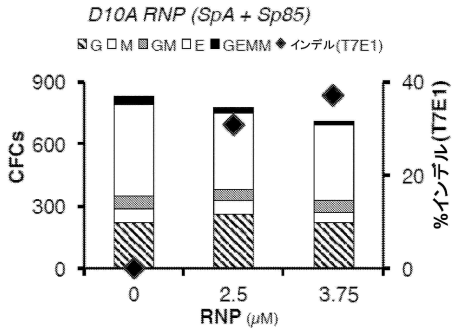
【図１０Ｃ】

図 10C



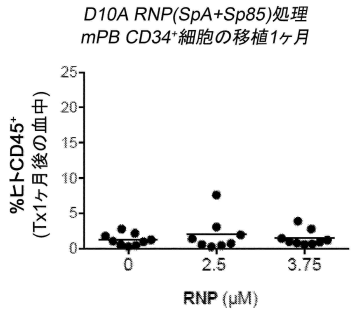
【図１０Ｄ】

図 10D



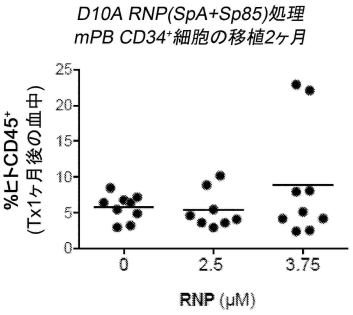
【図１０Ｅ】

図 10E



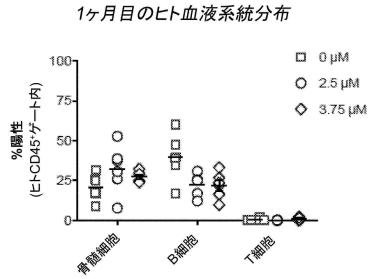
【図１０Ｆ】

図 10F



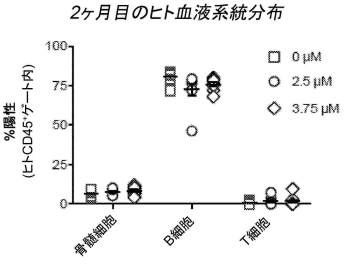
【図１０Ｇ】

図 10G



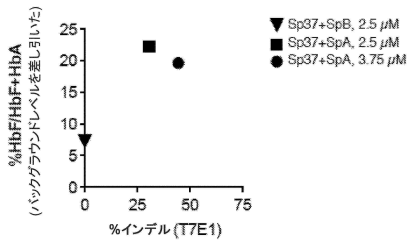
【図１０Ｈ】

図 10H



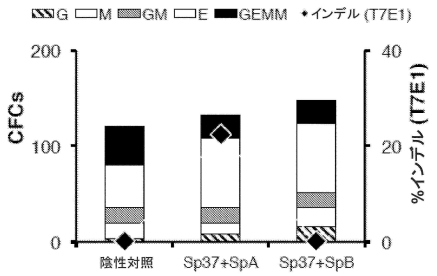
【図１１Ａ】

図 11A



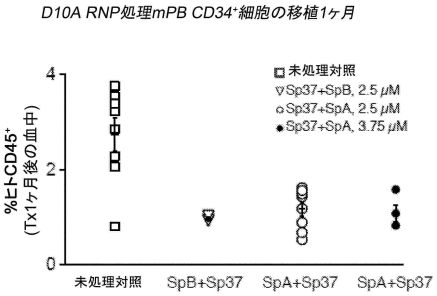
【図１１Ｂ】

図 11B



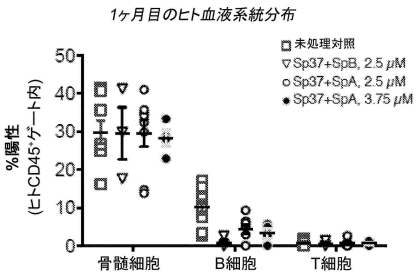
【図１１Ｃ】

図 11C



【図１１Ｄ】

図 11D



【図１２】

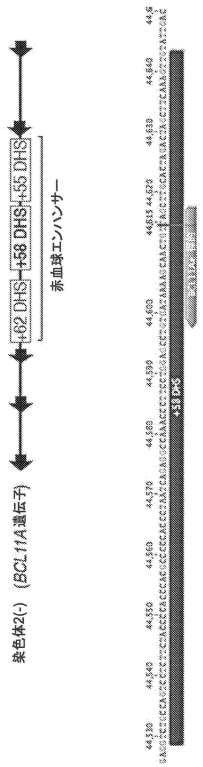
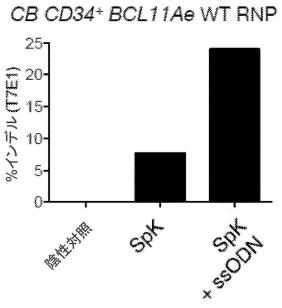


図 12

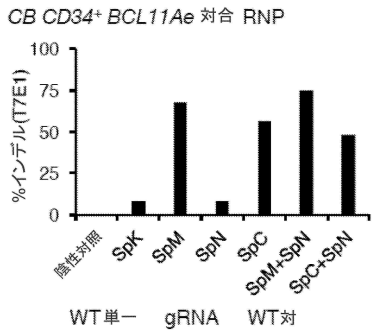
【図１３Ａ】

図 13A



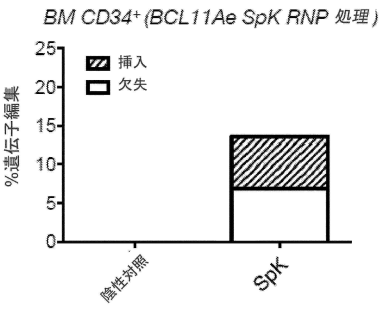
【図１３Ｂ】

図 13B



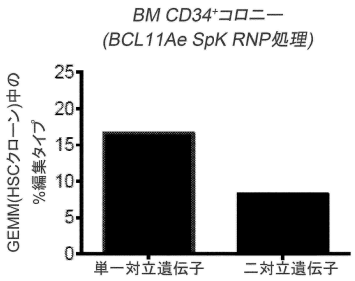
【図１４Ａ】

図 14A



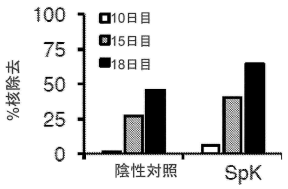
【図１４Ｂ】

図 14B



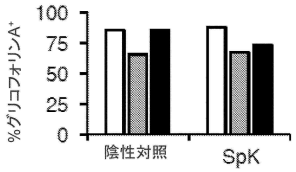
【図１４Ｃ】

図 14C



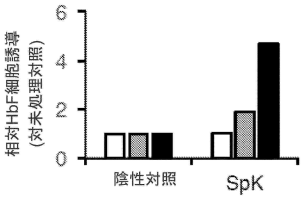
【図１４Ｄ】

図 14D



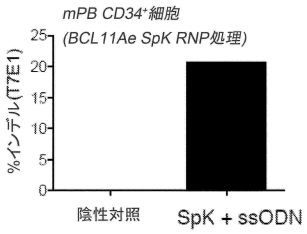
【図１４Ｅ】

図 14E



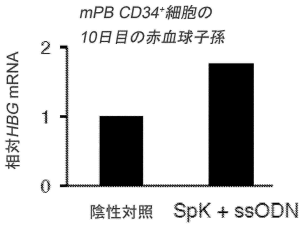
【図１５Ａ】

図 15A



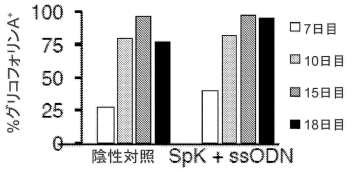
【図１５Ｂ】

図 15B



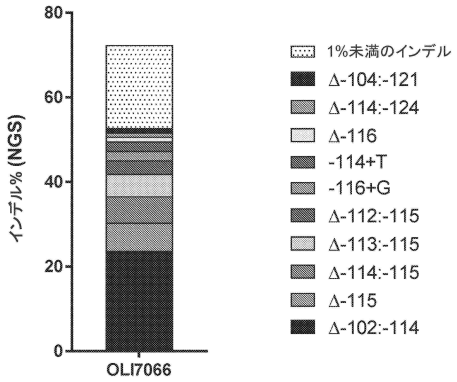
【図１５Ｃ】

図 15C



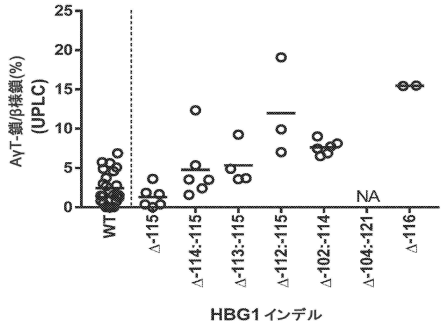
【図１６】

図 16



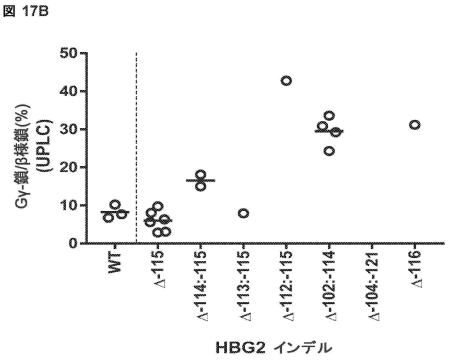
【図１７Ａ】

図 17A



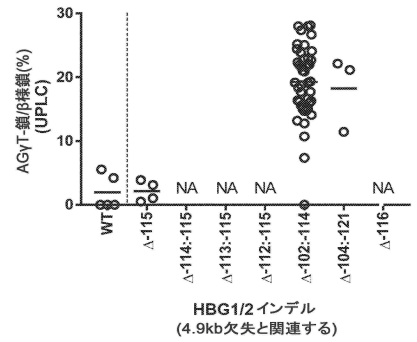
【図１７Ｂ】

図 17B



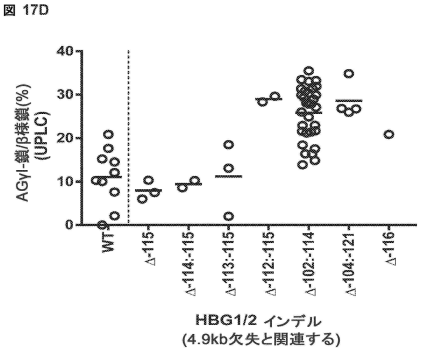
【図１７Ｃ】

図 17C



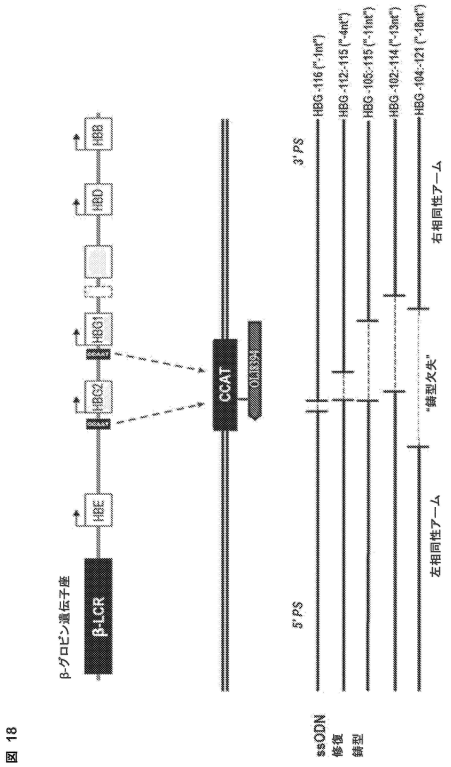
【図１７Ｄ】

図 17D



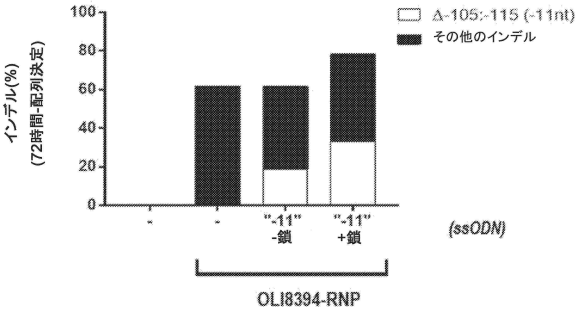
【図１８】

図 18



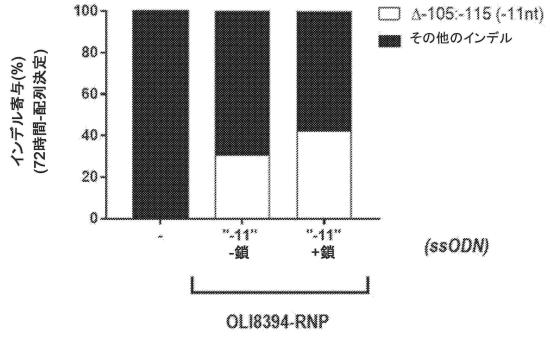
【図１９Ａ】

図 19A



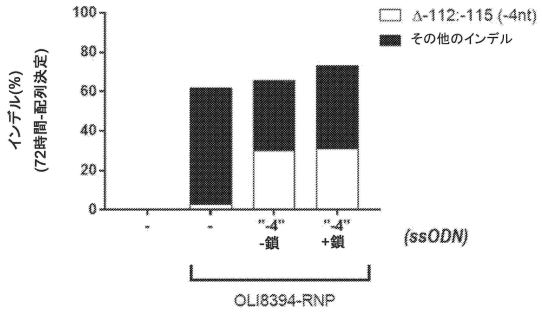
【図１９Ｂ】

図 19B



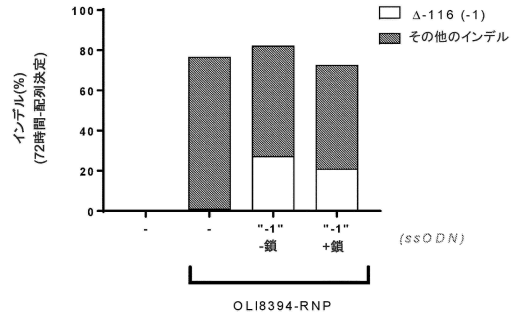
【図１９Ｃ】

図 19C



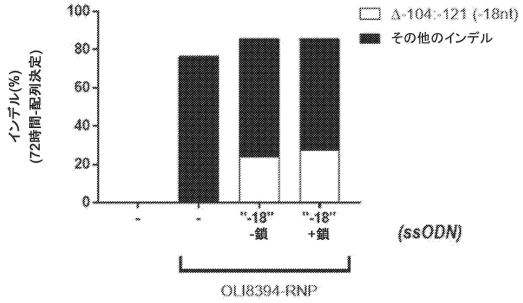
【図１９Ｄ】

図 19D

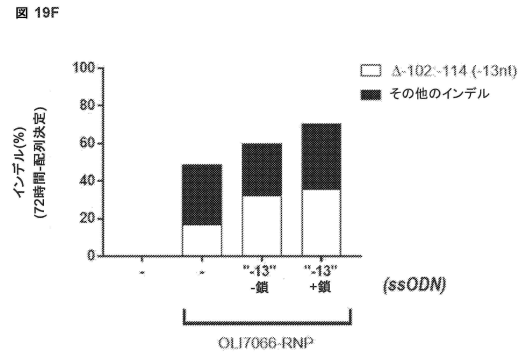


【図１９Ｅ】

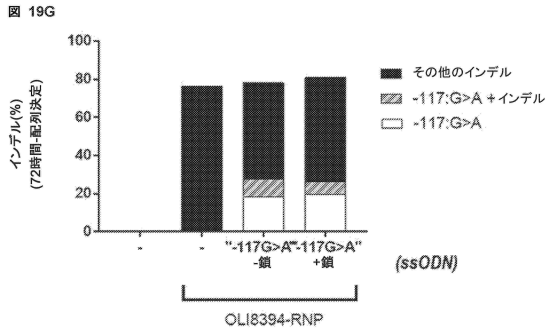
図 19E



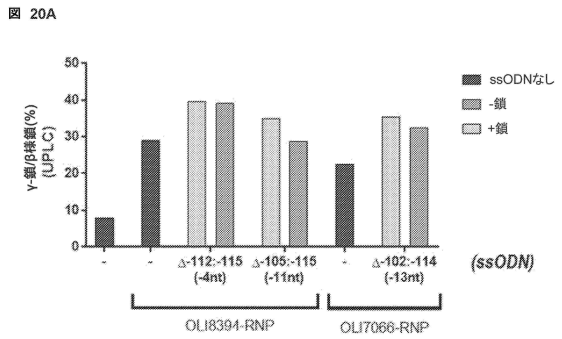
【図１９Ｆ】



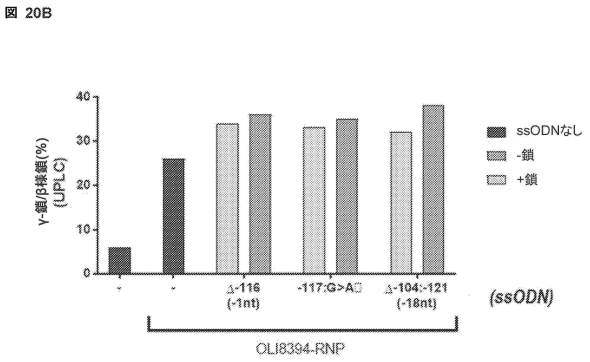
【図１９Ｇ】



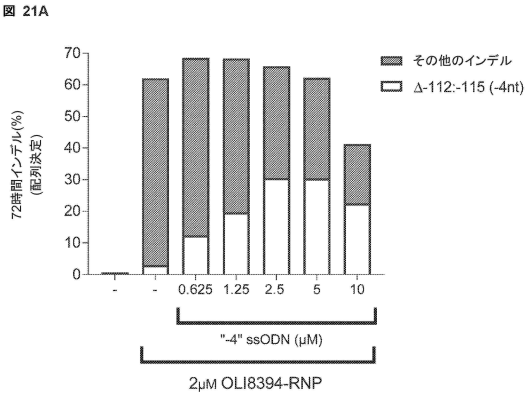
【図２０Ａ】



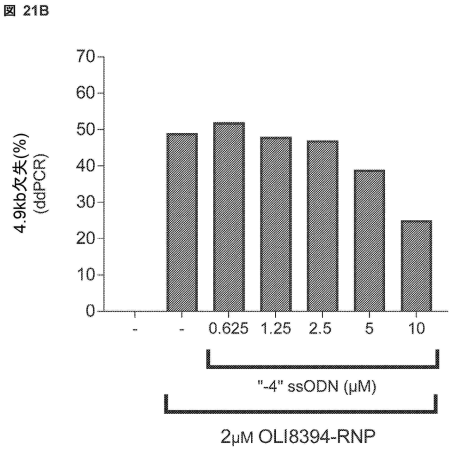
【図２０Ｂ】



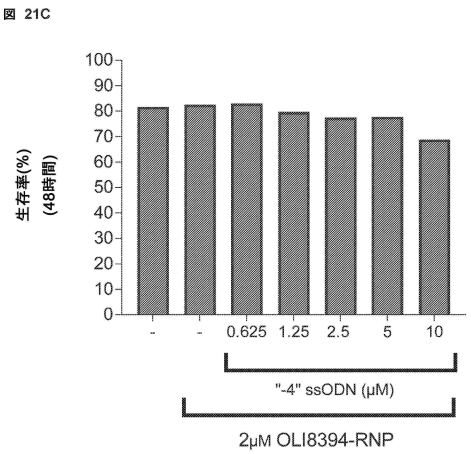
【図２１Ａ】



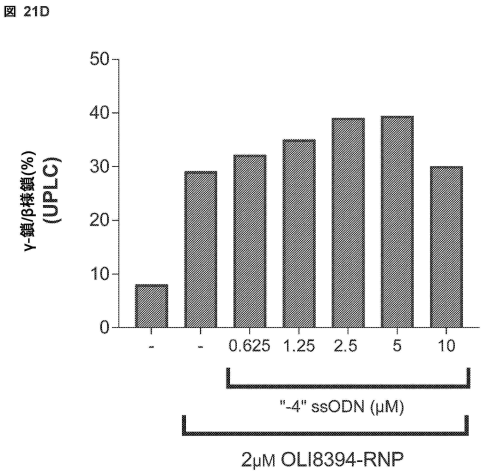
【図２１Ｂ】



【図２１Ｃ】

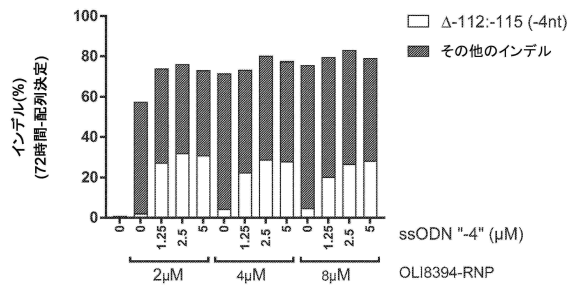


【図２１Ｄ】



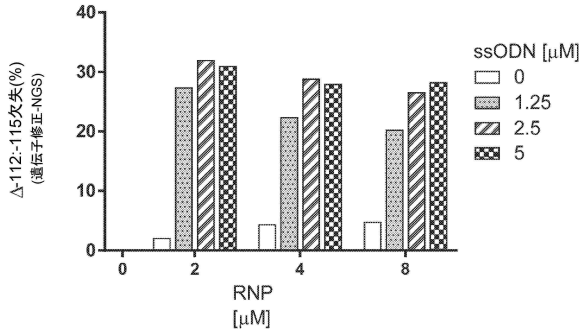
【図２２Ａ】

図 22A



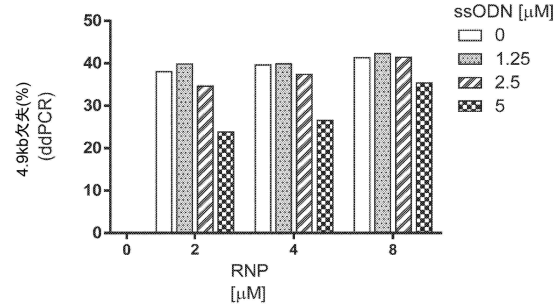
【図２２Ｂ】

図 22B



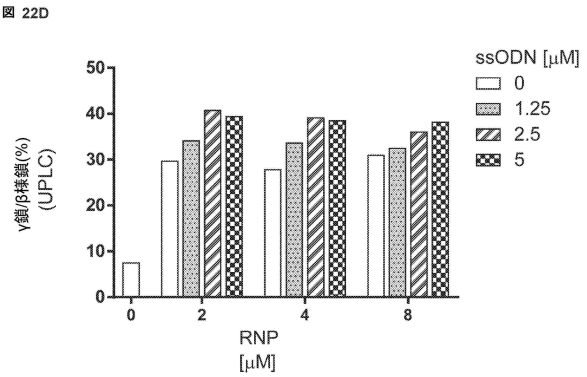
【図２２Ｃ】

図 22C



【図２２Ｄ】

図 22D



【図２３Ａ】

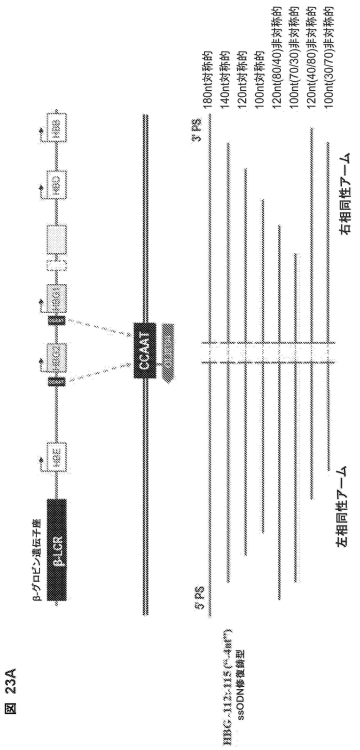
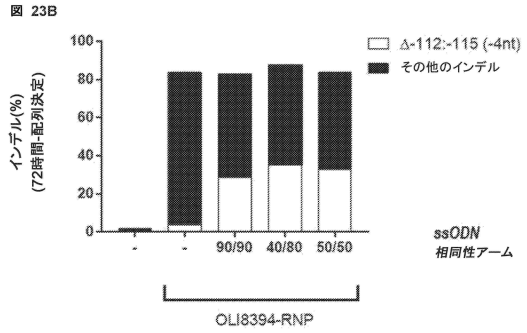
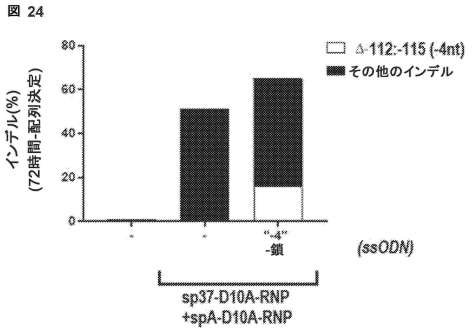


図 23A

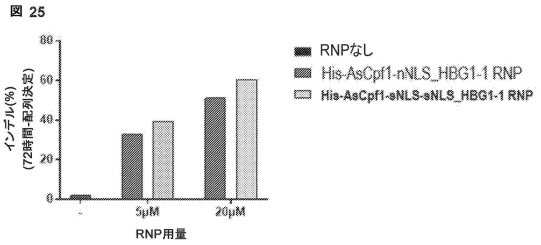
【図２３Ｂ】



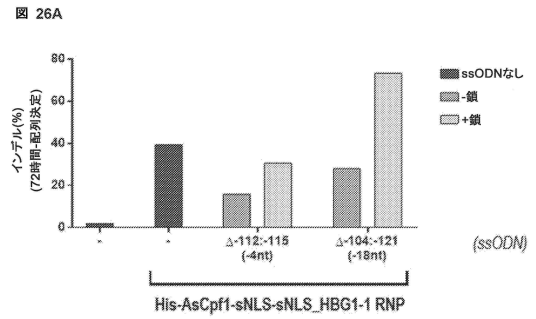
【図２４】



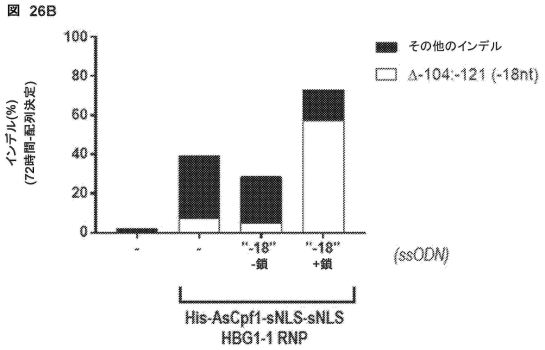
【図２５】



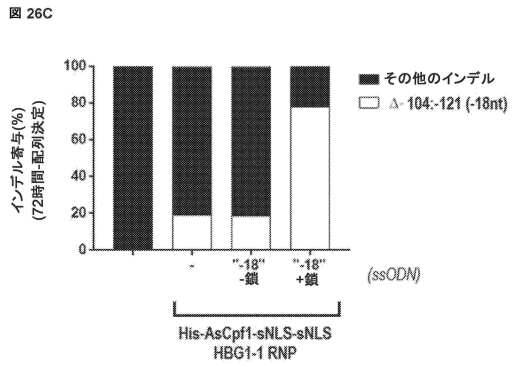
【図２６Ａ】



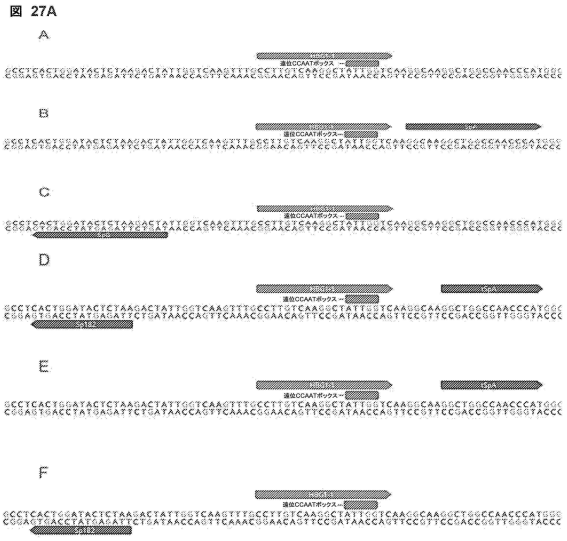
【図２６Ｂ】



【図２６Ｃ】

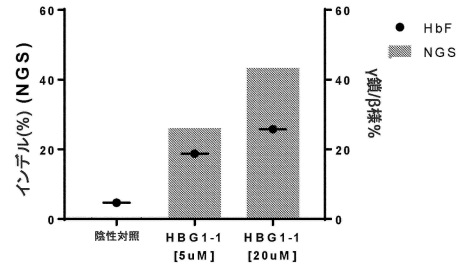


【図２７】



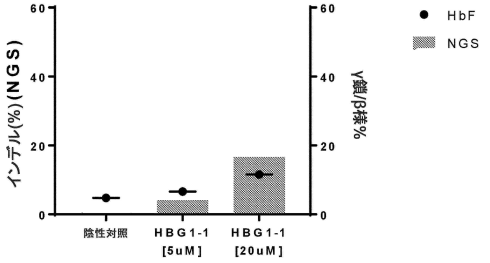
【図２８Ａ】

図 28A



【図２８Ｂ】

図 28B



【図２９】

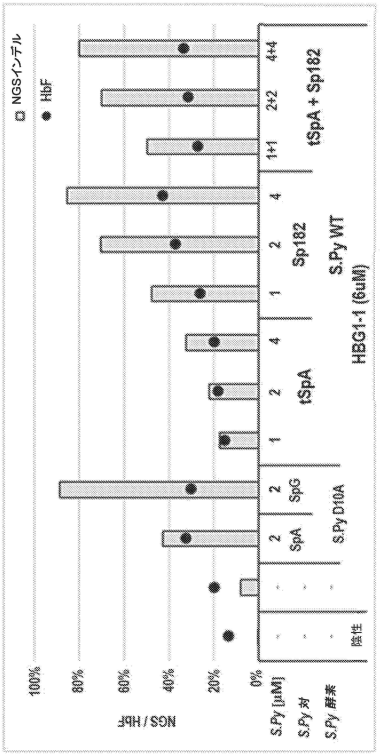


図 29

【図３０】

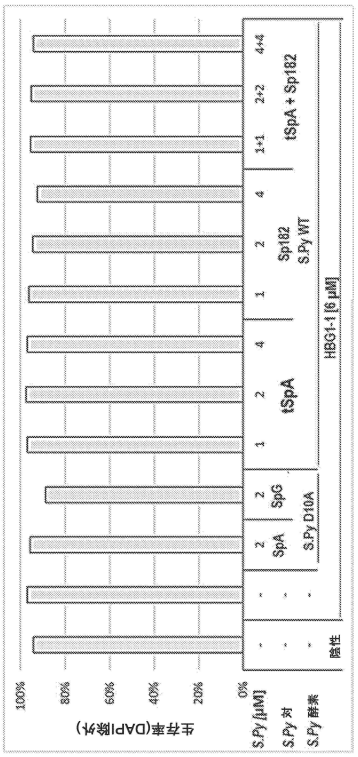


図 30

【図３１Ａ】

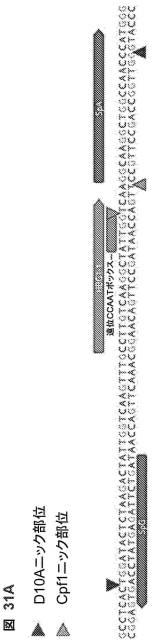


図 31A

【図３１Ｂ】

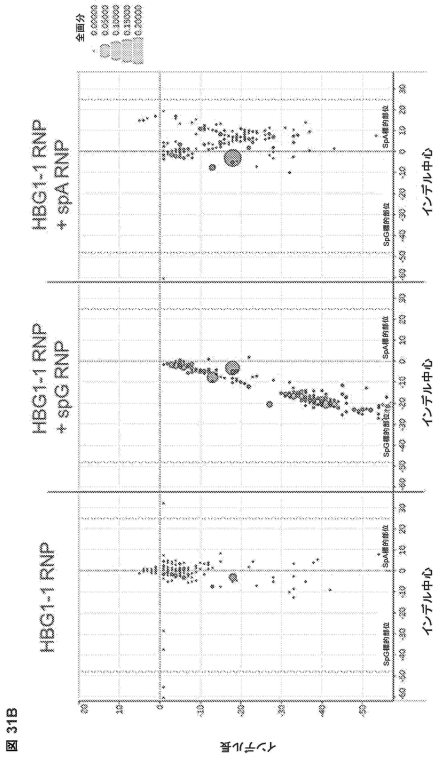


図 31B

【図３２Ａ】

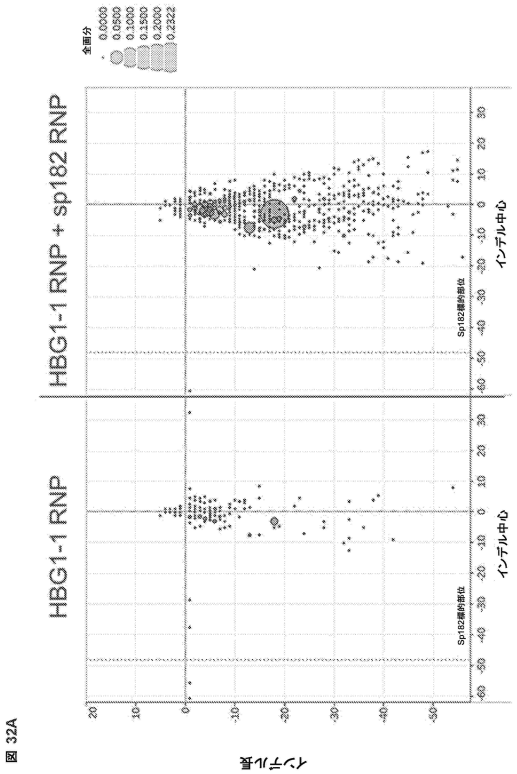


図 32A

【図３２Ｂ】

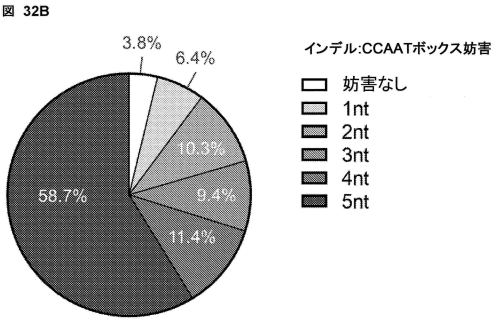
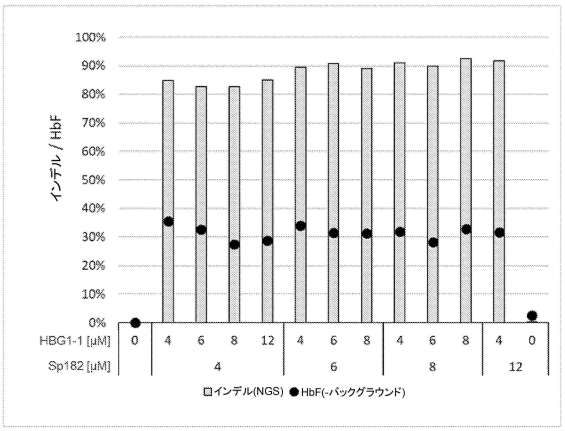


図 32B

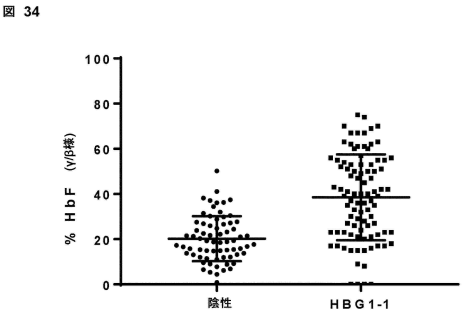
【図３３】

図 33



【図３４】

図 34



【図３５Ａ】

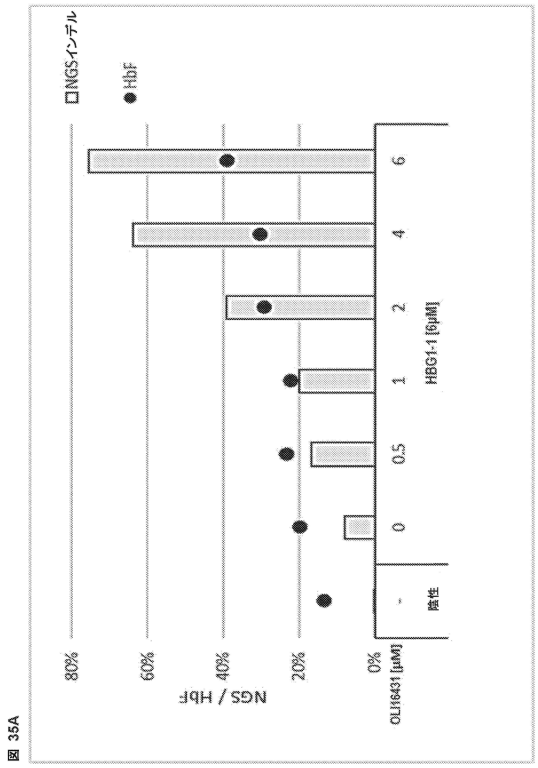


図 35A

【図３５Ｂ】

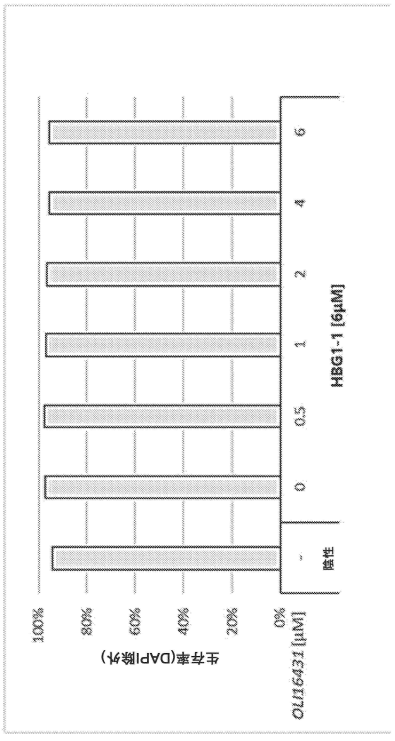


図 35B

【図３５Ｃ】

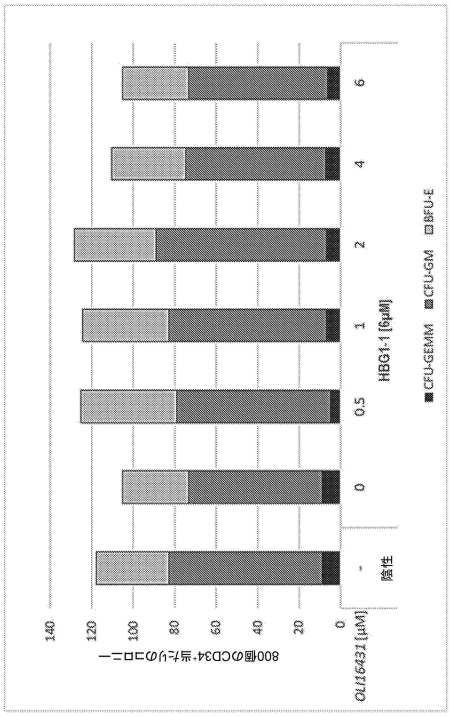
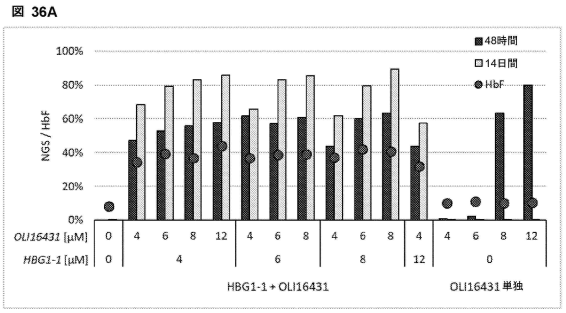


図 35C

【図３６Ａ】



【図３６Ｂ】

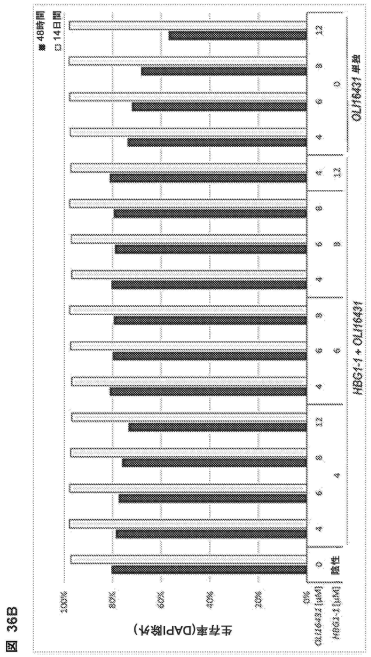


図 36B

【図３７】

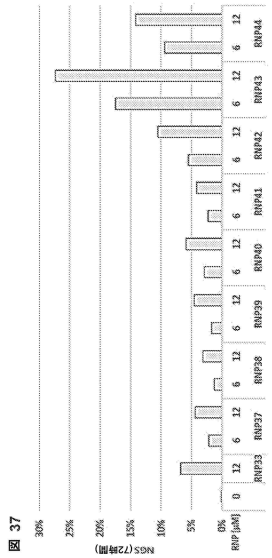
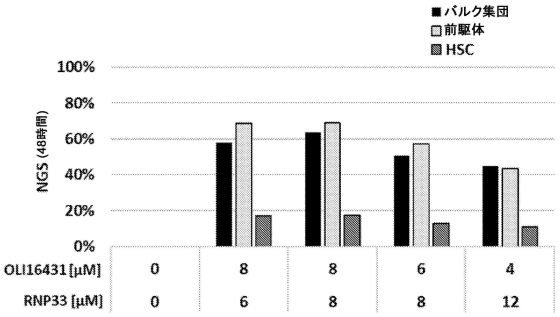


図 37

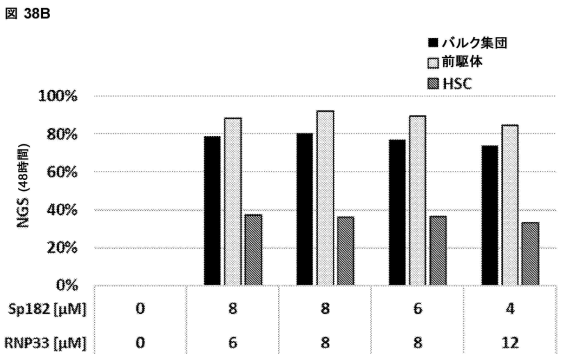
【図３８Ａ】

図 38A



【図３８Ｂ】

図 38B



【図３９】

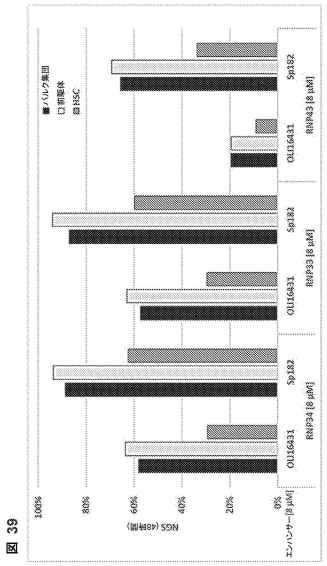


図 39

【図４０】

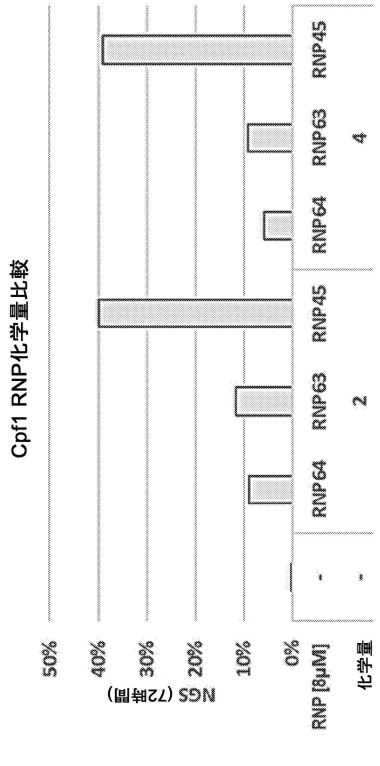
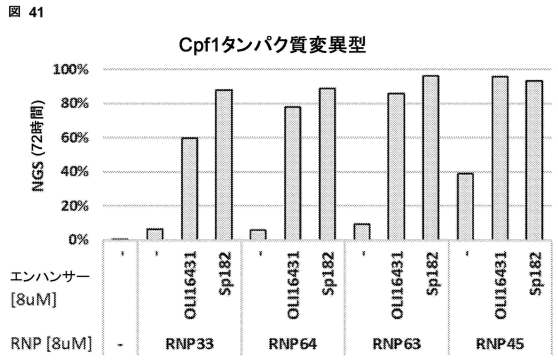
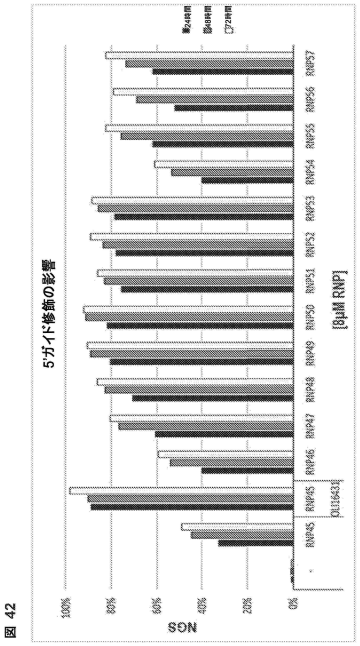


図 40

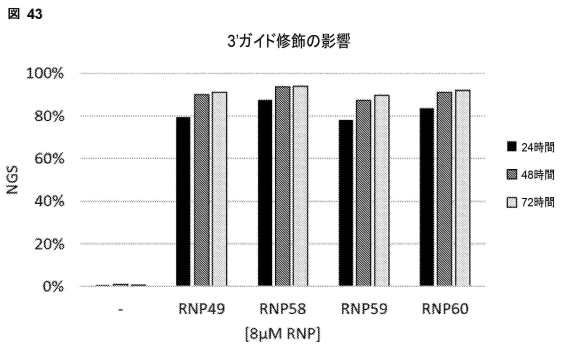
【図４１】



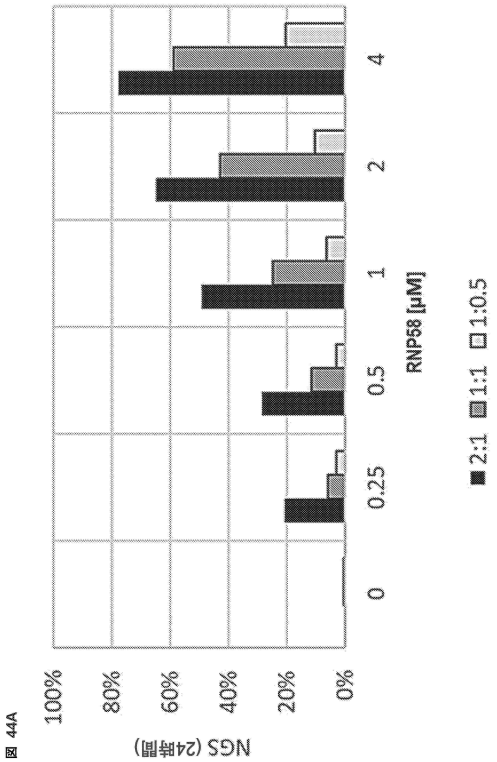
【図４２】



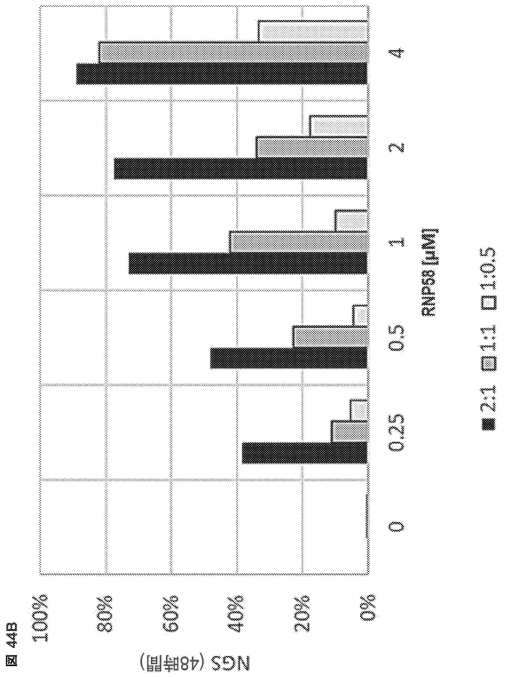
【図４３】



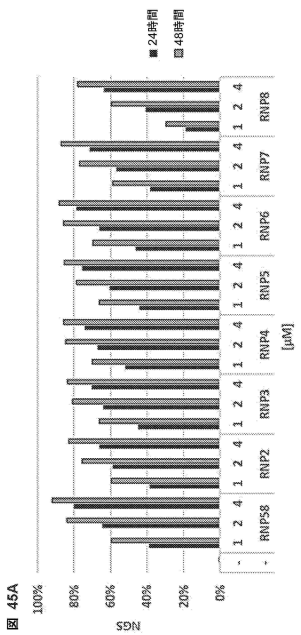
【図４４Ａ】



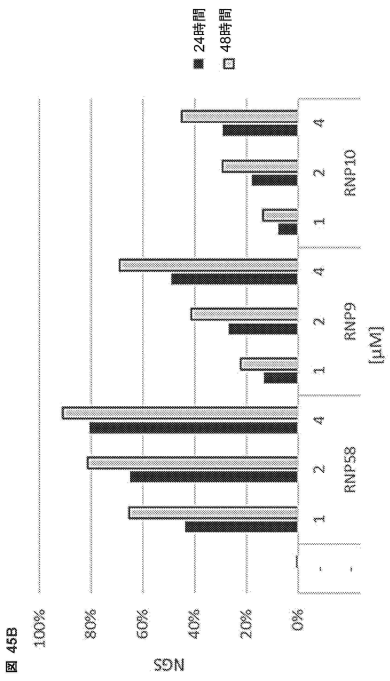
【図４４Ｂ】



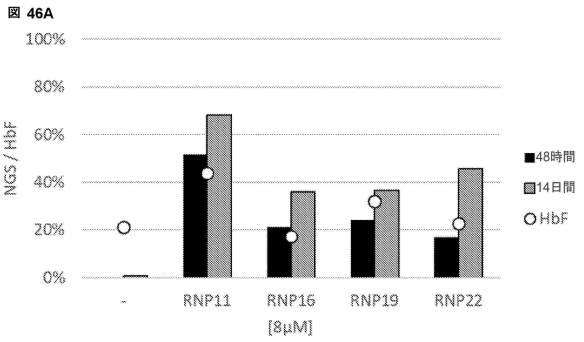
【図４５Ａ】



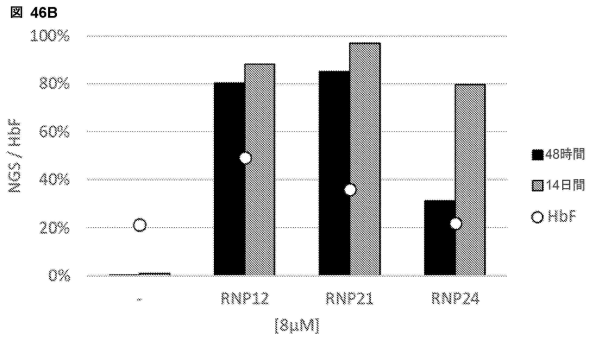
【図４５Ｂ】



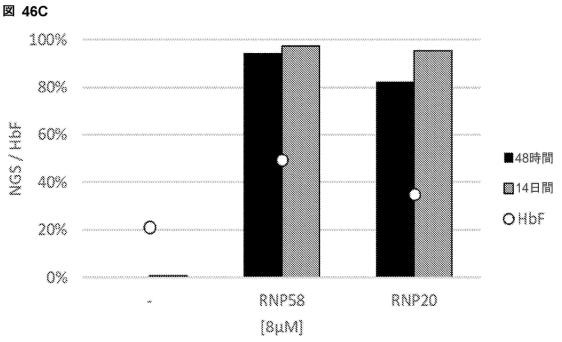
【図４６Ａ】



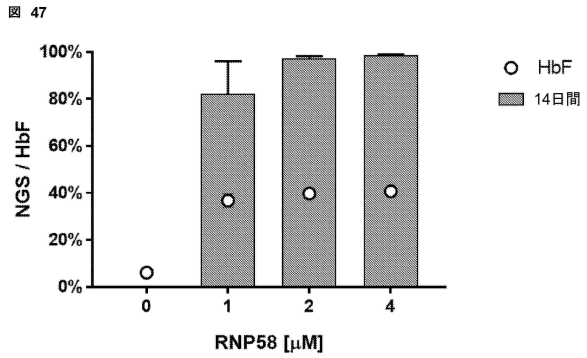
【図４６Ｂ】



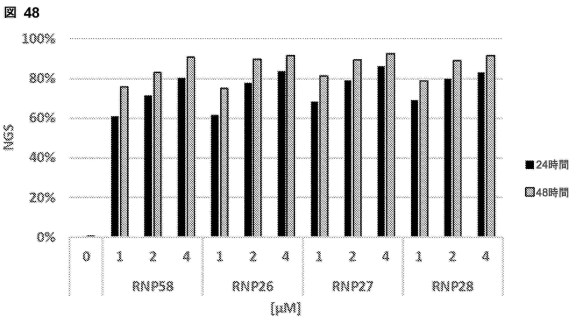
【図４６Ｃ】



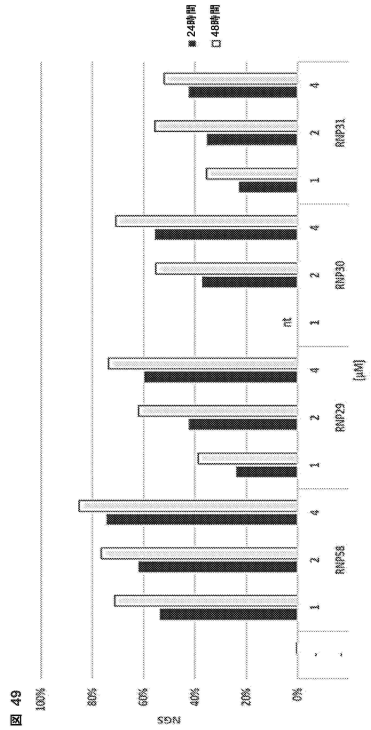
【図４７】



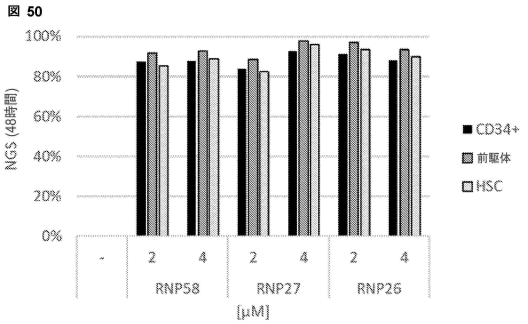
【図４８】



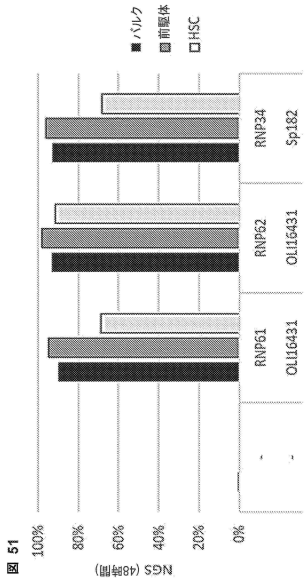
【図４９】



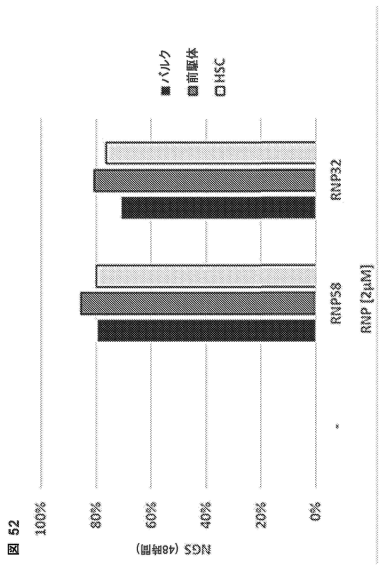
【図５０】



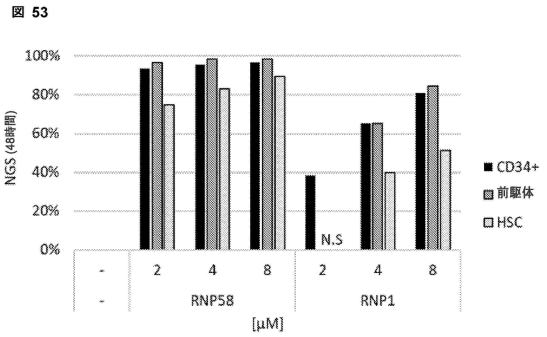
【図５１】



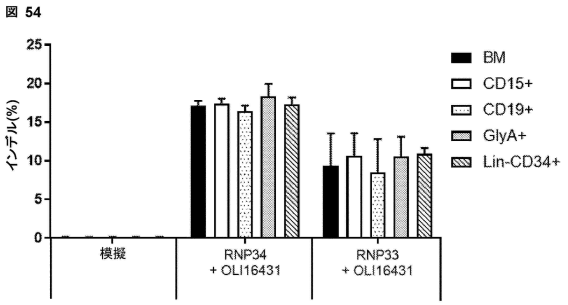
【図５２】



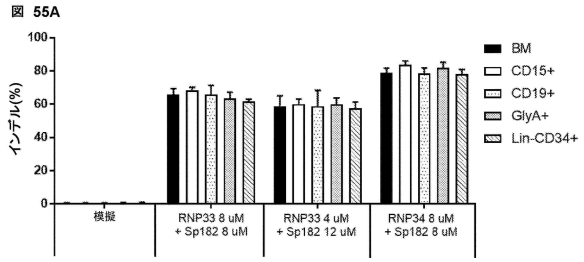
【図５３】



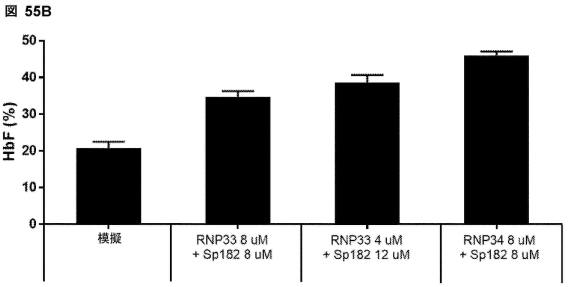
【図５４】



【図５５Ａ】

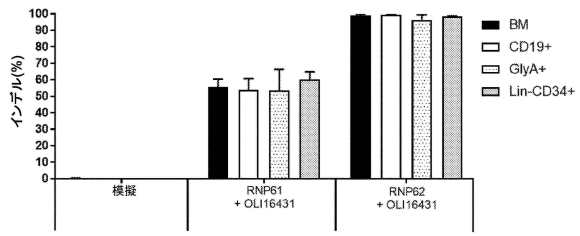


【図５５Ｂ】



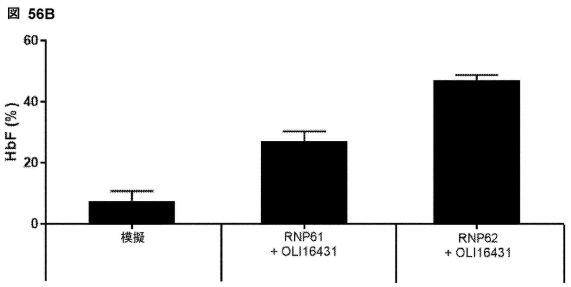
【図５６Ａ】

図 56A



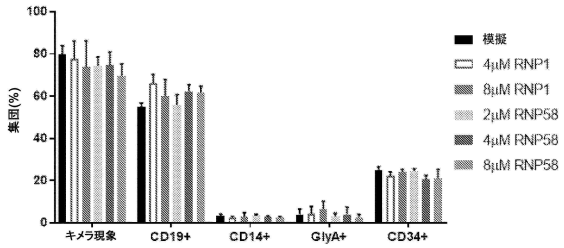
【図５６Ｂ】

図 56B



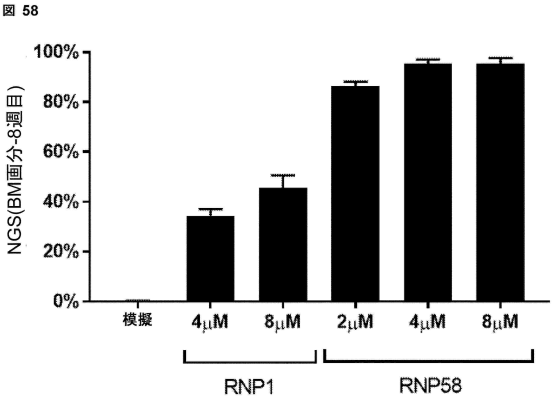
【図５７】

図 57

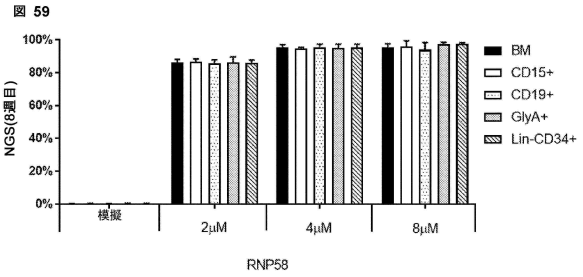


【図５８】

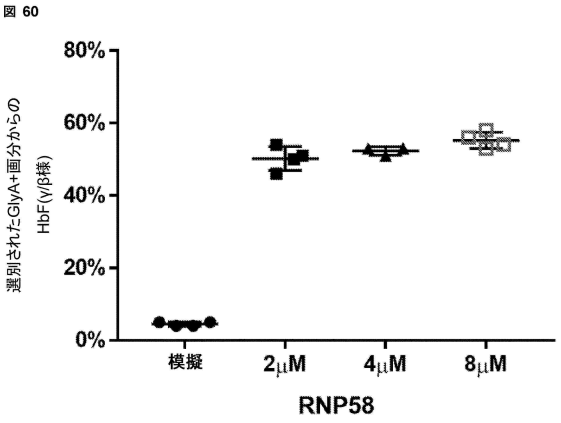
図 58



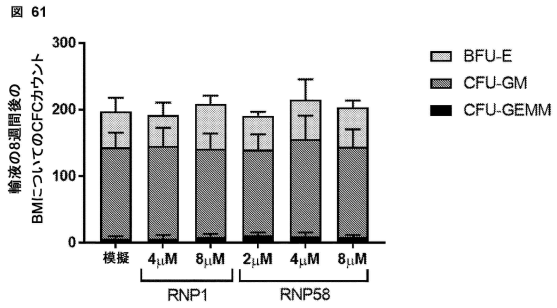
【図５９】



【図６０】



【図６１】



【図６２－１】

図 62

His-AsCpf1-sNLS-sNLS H800A アミノ酸配列(配列番号1032)

MGHHHHHHGSTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYAD
QCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKA
ELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIF
TRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNL
AIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSI
DLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSE
AFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKL
EMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGR
YKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNN
PEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLL
YHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYR
PKSRMKRMAARLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKD
RRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQ
QFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGI
AEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPL
TGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQF
DAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRS
VLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQ
NGISNQDWLAYIQELRNGS**PKKKRKV**GS**PKKKRKV**

His-AsCpf1-sNLS-sNLS H800A ヌクレオチド配列(配列番号1110)

ATGGGCCATCATCATCACCATCACGGTAGCACCCAGTTTGAAGGCTTTACCAATCTGTATCAGGTTAGC
AAAACCCTGCGTTTTGAACTGATTCCGCAGGGTAAAACCCTGAAACATATTCAAGAACAGGGCTTCAT
CGAAGAGGATAAAGCACGTAACGATCACTACAAAGAACTGAAACCGATTATCGACCGCATCTATAAA
ACGTACGCAGATCAGTGTCTGCAGCTGGTTCAGCTGGATTGGGAAAATCTGAGCGCAGCAATTGATAG
TTATCGCAAAGAGAAAACCGAAGAAACCCGTAATGCACTGATTGAAGAACAGGCAACCTATCGTAAT
GCCATCCATGATTATTTCATTGGTCGTACCGATAATCTGACCGATGCAATTAACAAACGTCACGCCGA
AATCTATAAAGGCCTGTTTAAAGCCGAACTGTTTAATGGCAAAGTTCTGAAACAGCTGGGCACCGTTA
CCACCACCGAACATGAAAATGCACTGCTGCGTAGCTTTGATAAATTCACCACCTATTTCAGCGGCTTTT
ATGAGAATCGCAAAAACGTGTTTAGCGCAGAAGATATTAGCACCGCAATTCCGCATCGTATTGTGCAG
GATAATTTCCCGAAATTCAAAGAGAACTGCCACATTTTTACCCGTCTGATTACCGCAGTTCCGAGCCTG
CGTGAACATTTTGAAAACGTTAAAAAAGCCATCGGCATCTTTGTTAGCACCAGCATTGAAGAAGTTTT
TAGCTTCCCGTTTACAATCAGCTGCTGACCCAGACACAGATTGATCTGTATAACCAGCTGTTAGGTGG
TATTAGCCGTGAAGCAGGCACCGAAAAAATCAAAGGTCTGAATGAAGTGCTGAATCTGGCCATTCAG
AAAAATGATGAAACCGCACATATTATTGCAAGCCTGCCGCATCGTTTTATTCCGCTGTTTAAGCAGATT
CTGAGCGATCGTAATACCCTGAGCTTTATTCTGGAAGAATTCAAATCCGATGAAGAGGTGATTCAGAG
CTTCTGCAAATACAAAACGCTGCTGCGCAATGAAAATGTTCTGGAAACTGCCGAAGCACTGTTTAACG
AACTGAATAGCATTGATCTGACCCACATCTTTATCAGCCACAAAAAACTGGAAACCATTTCAAGCGCA
CTGTGTGATCATTGGGATACCCTGCGTAATGCCCTGTATGAACGTCGTATTAGCGAACTGACCGGTAA
AATTACCAAAAGCGCGAAAGAAAAAGTTCAGCGCAGTCTGAAACATGAGGATATTAATCTGCAAGAG
ATTATTAGCGCAGCCGGTAAAGAACTGTCAGAAGCATTTAAACAGAAAACCAGCGAAATTCTGAGCC
ATGCACATGCAGCACTGGATCAGCCGCTGCCGACCACACTGAAAAAACAAGAAGAAAAAGAGATCCT
GAAAAGCCAGCTGGATAGCCTGCTGGGTCTGTATCATCTGCTGGACTGGTTTGCAGTTGATGAAAGCA
ATGAAGTTGATCCGGAATTTAGCGCACGTCTGACCGGCATTAAGCTGGAAATGGAACCGAGCCTGAGT
TTTTACAATAAAGCCCGTAATTATGCCACCAAAAAACCGTATAGCGTGGAAAAATTCAAGCTGAACTT
CCAGATGCCGACACTGGCAAGCGGTTGGGATGTTAATAAAGAAAAGAACAATGGTGCCATCCTGTTCG
TGAAAAATGGCCTGTATTATCTGGGTATCATGCCGAAACAGAAAGGTCGTTATAAAGCACTGAGCTTT
GAACCGACAGAAAAAACCAGTGAAGGCTTCGATAAAATGTACTATGATTACTTTCCGGACGCAGCCA
AAATGATTCCGAAATGCAGCACCCAGCTGAAAGCAGTTACCGCACATTTTCAGACCCATACCACACCG
ATTCTGCTGAGCAATAACTTTATTGAACCGCTGGAAATCACCAAAGAGATCTACGATCTGAATAACCC

【図６２－２】

GGAAAAAGAGCCGAAAAAGTTTCAGACCGCCTATGCAAAAAAAACCGGTGATCAGAAAGGTTATCGT
GAAGCGCTGTGTAAATGGATTGATTTCACCCGTGATTTTCTGAGCAAATACACCAAAACCACCAGTAT
CGATCTGAGCAGCCTGCGTCCGAGCAGCCAGTATAAAGATCTGGGCGAATATTATGCAGAACTGAATC
CGCTGCTGTATCATATTAGCTTTCAGCGTATTGCCGAGAAAGAAATAATGGATGCAGTTGAAACCGGT
AAGCTGTACCTGTTCCAGATTTATAACAAAGACTTTGCCAAAGGCCATCATGGTAAACCGAATCTGCA
TACCCTGTATTGGACCGGTCTGTTTAGCCCTGAAAATCTGGCAAAAACCAGCATTAAACTGAATGGTC
AGGCGGAACTGTTTTATCGTCCGAAAAGCCGTATGAAACGTATGGCAGCACGTCTGGGTGAAAAAATG
CTGAATAAAAAGCTGAAGGATCAGAAAACCCCGATTCCGGATACACTGTATCAAGAGCTGTATGATTA
TGTGAATCATCGTCTGAGTCATGATCTGAGTGATGAAGCACGTGCCCTGCTGCCGAATGTTATTACCAA
AGAAGTTAGCCACGAGATCATTAAAGATCGTCGTTTTACCAGCGACAAGTTTTTTTTCCATGTTCCGAT
TACGCTGAATTATCAGGCAGCAAATAGCCCGAGCAAATTTAACCAGCGTGTGAATGCATATCTGAAAG
AACATCCGGAAACACCGATTATTGGTATTGATCGTGGTGAACGCAACCTGATTTATATCACCGTTATTG
ATAGCACCGGCAAGATCCTGGAACAGCGTAGCCTGAATACCATTCAGCAGTTTGATTATCAGAAAAAG
CTGGACAACCGTGAAAAAGAACGTGTTGCAGCCCGTCAGGCATGGTCAGTTGTTGGTACAATTAAAGA
CCTGAAACAGGGTTATCTGAGCCAGGTTATTCATGAAATTGTGGATCTGATGATTCATTACCAGGCAG
TTGTTGTGCTGGAAAACCTGAATTTTGGCTTTAAAAGCAAACGTACCGGCATTGCGGAAAAAGCAGTT
TATCAGCAGTTCGAAAAGATGCTGATCGATAAACTGAACTGTCTGGTGCTGAAAGATTATCCGGCTGA
AAAAGTTGGCGGTGTTCTGAATCCGTATCAGCTGACCGATCAGTTTACCAGCTTTGCAAAAATGGGCA
CCCAGAGCGGATTTCTGTTTTATGTTCCGGCACCGTATACGAGCAAAATTGATCCGCTGACCGGTTTTG
TTGATCCGTTTGTTTGGAAAACCATCAAAAACCATGAAAGCCGCAAACATTTTCTGGAAGGTTTGATT
TCCTGCATTACGACGTTAAGACCGGTGATTTTATTCTGCACTTTAAGATGAATCGGAACCTGTCATTTC
AGCGTGGTCTGCCTGGTTTTATGCCTGCATGGGATATTGTGTTTGAGAAAAACGAAACACAGTTCGAT
GCAAAAGGCACCCCGTTTATTGCAGGTAAACGTATTGTTCCGGTGATTGAAAATCATCGTTTCACCGGT
CGTTATCGCGATCTGTATCCGGCAAATGAACTGATCGCACTGCTGGAAGAGAAAGGTATTGTTTTCGT
GATGGCTCAAACATTCTGCCGAAACTGTTAGAGAATGATGATAGCCATGCCATTGATACCATGGTTGC
CCTGATTCGTAGCGTTCTGCAGATGCGTAATAGCAATGCAGCAACCGGTGAAGATTACATTAATAGTC
CGGTTCGTGATCTGAATGGTGTTTGTTTTGATAGCCGTTTTCAGAATCCGGAATGGCCGATGGATGCGG
ATGCAAATGGTGCATATCATATTGCACTGAAAGGACAGCTGCTGCTGCTGAACCACCTGAAAGAAAGTAA
AGATTTGAAGCTGCAGAATGGCATTAGCAATCAGGATTGGCTGGCATATATCCAAGAACTGCGTAACG
GTTCT**CCTAAGAAAAAGCGCAAAGTT**GGCAGT**CCGAAGAAGAAACGTAAGGTT**

Cpf1-1 アミノ酸配列(配列番号1094)

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLD
WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLK
QLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSL
REHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETA
HIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHK
KLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEIL
SHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYN
KARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEK
TSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTA
YAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEI
MDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAH
RLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFH
VPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLD
NREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFE
KMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVW
KTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIA
GKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSN
AATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWL
AYIQELRNGRS**SDDEATADSQHAAPPKKKRKV**GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLEHHHHHH

Cpf1-1 ヌクレオチド配列(配列番号1111)

【図６２－３】

ATGACCCAGTTTGAAGGTTTCACCAATCTGTATCAGGTTAGCAAAACCCTGCGTTTTGAACTGATTCCG
CAGGGTAAAACCCTGAAACATATTCAAGAACAGGGCTTCATCGAAGAGGATAAAGCACGTAACGATC
ACTACAAAGAACTGAAACCGATTATCGACCGCATCTATAAAACCTATGCAGATCAGTGTCTGCAGCTG
GTTCAGCTGGATTGGGAAAATCTGAGCGCAGCAATTGATAGTTATCGCAAAGAAAAAACCGAAGAAA
CCCGTAATGCACTGATTGAAGAACAGGCAACCTATCGTAATGCCATCCATGATTATTTCATTGGTCGTA
CCGATAATCTGACCGATGCAATTAACAAACGTCACGCCGAAATCTATAAAGGCCTGTTTAAAGCCGAA
CTGTTTAATGGCAAAGTTCTGAAACAGCTGGGCACCGTTACCACCACCGAACATGAAAATGCACTGCT
GCGTAGCTTTGATAAATTCACCACCTATTTCAGCGGCTTTTATGAGAATCGCAAAAACGTTATAAAAAG
ACCATCGGCATCTTTGTTAGCACCAGCATTGAAGAAGTTTTTAGCTTCCCGTTTTACAATCAGCTGCTGA
CCCAGACCCAGATTGATCTGTATAACCAACTGCTGGGTGGTATTAGCCGTGAAGCAGGCACCGAAAAA
ATCAAAGGTCTGAATGAAGTGCTGAATCTGGCCATTCAGAAAAATGATGAAACCGCACATATTATTGC
AAGCCTGCCGCATCGTTTTATTCCGCTGTTCAAACAAATTCTGAGCGATCGTAATACCCTGAGCTTTAT
TCTGGAAGAATTCAAATCCGATGAAGAGGTGATTCAGAGCTTTTGCAAATACAAAACGCTGCTGCGCA
ATGAAAATGTTCTGGAAACTGCCGAAGCACTGTTTAACGAACTGAATAGCATTGATCTGACCCACATC
TTTATCAGCCACAAAAAACTGGAAACCATTTCAAGCGCACTGTGTGATCATTGGGATACCCTGCGTAA
TGCCCTGTATGAACGTCGTATTAGCGAACTGACCGGTAAAATTACCAAAAGCGCGAAAGAAAAGTTC
AGCGCAGTCTGAAACATGAGGATATTAATCTGCAAGAGATTATTAGCGCAGCCGGTAAAGAACTGTCA
GAAGCATTTAAACAGAAAACCAGCGAAATTCTGTCACATGCACGCACTGGATCAGCCGCTGCCC
GACCACCCTGAAAAAACAAGAAGAAAAAGAAATCCTGAAAAGCCAGCTGGATAGCCTGCTGGGTCTG
TATCATCTGCTGGACTGGTTTGCAGTTGATGAAAGCAATGAAGTTGATCCGGAATTTAGCGCACGTCT
GACCGGCATTAAACTGGAAATGGAACCGAGCCTGAGCTTTTATAACAAAGCCGTCATTATGCCACCA
AAAAACCGTATAGCGTCGAAAAATTCAAACTGAACTTTCAGATGCCGACCCTGGCAAGCGGTTGGGAT
GTTAATAAAGAAAAAAACAACGGTGCCATCCTGTTGATAAAATCGTCATTATCTGGGTATTAT
GCCGAAACAGAAAGGTCGTTATAAAGCGCTGAGCTTTGAACCGACGGAAAAAACCAGTGAAGGTTTT

【図６２－４】

AGGACAGCTGCTGCTGAACCACCTGAAAGAAAGCAAAGATCTGAAACTGCAAAACGGCATTAGCAAT
CAGGATTGGCTGGCATATATCCAAGAACTGCGTAACGGTCGT**AGCAGTGATGATGAAGCAACCGCA**
GATAGCCAGCATGCAGCACCGCCTAAAAAGAAACGTAAAGTTGGTGGTAGCGGTGGTTCAGGTGG
TAGTGGCGGTAGTGGTGGCTCAGGGGGTTCTGGTGGCTCTGGTGGTAGCCTCGAGCACCACCACCACC
ACCAC

Cpf1-アミノ酸配列(配列番号1095)

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLD
WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLK
QLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSL
REHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETA
HIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHK
KLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEIL
SHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYN
KARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTE
KTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQT
AYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEK
EIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMA
HRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFF
HVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLD
NREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQF
EKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVW
KTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIA
GKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSN
AATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWL
AYIQELRNGRS**SDDEATADSQHAAPPKKKRKV**GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLEHHHHHH

Cpf1-2 ヌクレオチド配列(配列番号1112)

ATGACCCAGTTTGAAGGTTTCACCAATCTGTATCAGGTTAGCAAAACCCTGCGTTTTGAACTGATTCCG
CAGGGTAAAACCCTGAAACATATTCAAGAACAGGGCTTCATCGAAGAGGATAAAGCACGTAACGATC
ACTACAAAGAACTGAAACCGATTATCGACCGCATCTATAAAACCTATGCAGATCAGTGTCTGCAGCTG
GTTCAGCTGGATTGGGAAAATCTGAGCGCAGCAATTGATAGTTATCGCAAAGAAAAAACCGAAGAAA
CCCGTAATGCACTGATTGAAGAACAGGCAACCTATCGTAATGCCATCCATGATTATTTCATTGGTCGTA
CCGATAATCTGACCGATGCAATTAACAAACGTCACGCCGAAATCTATAAAGGCCTGTTTAAAGCCGAA
CTGTTTAATGGCAAAGTTCTGAAACAGCTGGGCACCGTTACCACCACCGAACATGAAAATGCACTGCT
GCGTAGCTTTGATAAATTCACCACCTATTTCAGCGGCTTTTATGAGAATCGCAAAAACGTTATAAAAAG
ACCATCGGCATCTTTGTTAGCACCAGCATTGAAGAAGTTTTTAGCTTCCCGTTTTACAATCAGCTGCTGA
CCCAGACCCAGATTGATCTGTATAACCAACTGCTGGGTGGTATTAGCCGTGAAGCAGGCACCGAAAAA
ATCAAAGGTCTGAATGAAGTGCTGAATCTGGCCATTCAGAAAAATGATGAAACCGCACATATTATTGC
AAGCCTGCCGCATCGTTTTATTCCGCTGTTCAAACAAATTCTGAGCGATCGTAATACCCTGAGCTTTAT
TCTGGAAGAATTCAAATCCGATGAAGAGGTGATTCAGAGCTTTTGCAAATACAAAACGCTGCTGCGCA
ATGAAAATGTTCTGGAAACTGCCGAAGCACTGTTTAACGAACTGAATAGCATTGATCTGACCCACATC
TTTATCAGCCACAAAAAACTGGAAACCATTTCAAGCGCACTGTGTGATCATTGGGATACCCTGCGTAA
TGCCCTGTATGAACGTCGTATTAGCGAACTGACCGGTAAAATTACCAAAAGCGCGAAAGAAAAGTTC
AGCGCAGTCTGAAACATGAGGATATTAATCTGCAAGAGATTATTAGCGCAGCCGGTAAAGAACTGTCA
GAAGCATTTAAACAGAAAACCAGCGAAATTCTGTCACATGCACGCACTGGATCAGCCGCTGCCC
GACCACCCTGAAAAAACAAGAAGAAAAAGAAATCCTGAAAAGCCAGCTGGATAGCCTGCTGGGTCTG
TATCATCTGCTGGACTGGTTTGCAGTTGATGAAAGCAATGAAGTTGATCCGGAATTTAGCGCACGTCT
GACCGGCATTAAACTGGAAATGGAACCGAGCCTGAGCTTTTATAACAAAGCCGTCATTATGCCACCA
AAAAACCGTATAGCGTCGAAAAATTCAAACTGAACTTTCAGATGCCGACCCTGGCAAGCGGTTGGGAT
GTTAATAAAGAAAAAAACAACGGTGCCATCCTGTTGATAAAATCGTCATTATCTGGGTATTAT
GCCGAAACAGAAAGGTCGTTATAAAGCGCTGAGCTTTGAACCGACGGAAAAAACCAGTGAAGGTTTT

【図６２－５】

GATAAAATGTACTACGACTATTTTCCGGATGCAGCCAAAATGATTCCGAAATGTAGCACCCAGCTGAA
AGCAGTTACCGCACATTTTCAGACCCATACCACCCCGATTCTGCTGAGCAATAACTTTATTGAACCGCT
GGAAATCACCAAAGAGATCTACGATCTGAATAACCCGGAAAAAGTCAACGAGCGATTTCTGCAGATCTCA
TATGCAAAAAAAAACCGGTGATCAGAAAGGTTATCGTGAAGCGCTGTGTAAATGGATTGATTTCACCCG
TGATTTTCTGAGCAAATACACCAAAACCACCAGTATCGATCTGAGCAGCCTGCGTCCGAGCAGCCAGT
ATAAAGATCTGGGCGAATATTATGCAGAACTGAATCCGCTGCTGTATCATATTAGCTTTCAGCGTATTG
CCGAGAAAGAAATAATGGACGCAGTTGAAACCGGTAAACTGTACCTGTTCCAGATCTACAATAAAGAT
TTTGCCAAAGGCCATCATGGCAAACCGAATCTGCATACCCTGTATTGGACCGGTCTGTTTAGCCCTGAA
AATCTGGCAAAAACCTCGATTAAACTGAATGGTCAGGCGGAACTGTTTTATCGTCCGAAAAGCCGTAT
GAAACGTATGGCACATCGTCTGGGTGAAAAAATGCTGAACAAAAAACTGAAAGACCAGAAAAACCCCG
ATCCCGGATACACTGTATCAAGAACTGTATGATTATGTGAACCATCGTCTGAGCCATGATCTGAGTGA
TGAAGCACGTGCCCTGCTGCCGAATGTTATTACCAAAGAAGTTAGCCACGAGATCATTAAAGATCGTC
GTTTTACCAGCGACAAATTCTTTTTTCATGTGCCGATTACCTGAATTATCAGGCAGCAAATAGCCCGA
GCAAATTTAACCAGCGTGTTAATGCATATCTGAAAGAACATCCAGAAACGCCGATTATTGGTATTGAT
CGTGGTGAACGTAACCTGATTTATATCACCGTTATTGATAGCACCGGCAAAATCCTGGAACAGCGTAG
CCTGAATACCATTCAGCAGTTTGATTACCAGAAAAAACTGGATAATCGCGAGAAAGAACGTGTTGCAG
CACGTCAGGCATGGTCAGTTGTTGGTACAATTAAAGACCTGAAACAGGGTTATCTGAGCCAGGTTATT
CATGAAATTGTGGATCTGATGATTCACTATCAGGCCGTTGTTGTGCTGGAAAACCTGAATTTTGGCTTT
AAAAGCAAACGTACCGGCATTGCAGAAAAAGCAGTTTATCAGCAGTTCGAGAAAATGCTGATTGACA
AACTGAATTGCCTGGTGCTGAAAGATTATCCGGCTGAAAAAGTTGGTGGTGTTCTGAATCCGTATCAG
CTGACCGATCAGTTTACCAGCTTTGCAAAAATGGGCACCCAGAGCGGATTTCTGTTTTATGTTCCGGCA
CCGTATACGAGCAAAATTGATCCGCTGACCGGTTTTGTTGATCCGTTTGTTTGGAAAACCATCAAAAAC
CATGAAAGCCGCAAACATTTTCTGGAAGGTTTCATTTCTGCATTACGACGTTAAGACCGGTGATTTC
ATCCTGCACTTTAAAATGAATCGCAATCTGAGTTTTCAGCGTGGCCTGCCTGGTTTTATGCCTGCATGG
GATATTGTGTTTGAGAAAAACGAAACACAGTTCGATGCAAAAGGCACCCCGTTTATTGCAGGTAAACG
TATTGTTCCGGTGATTGAAAATCATCGTTTCACCGGTCGTTATCGCGATCTGTATCCGGCAAATGAACT
GATCGCACTGCTGGAAGAGAAAGGTATTGTTTTTCGTGATGGCTCAAACATTCTGCCGAAACTGCTGG
AAAATGATGAGCCATGCAATTGATACCATGGTTGCACTGATTCGTAGCGTTCTGCAGATGCGTAAT
AGCAATGCAGCAACCGGTGAAGATTACATTAATAGTCCGGTTCGTGATCTGAATGGTGTTTGTTTTGAT
AGCCGTTTTCAGAATCCGGAATGGCCGATGGATGCAGATGCAAATGGTGCATATCATATTGCACTGAA
AGCCGTTTTCAGAATCCGGAATGGCCGATGGATGCAGATGCAAATGGTGCATATCATATTGCACTGAA

【図６２－６】

Cpf1-3 ヌクレオチド配列(配列番号1113)

ATGACCCAGTTTGAAGGTTTCACCAATCTGTATCAGGTTAGCAAAACCCTGCGTTTTGAACTGATTCCG
CAGGGTAAAACCCTGAAACATATTCAAGAACAGGGCTTCATCGAAGAGGATAAAGCACGTAACGATC
ACTACAAAGAACTGAAACCGATTATCGACCGCATCTATAAAACCTATGCAGATCAGTGTCTGCAGCTG
GTTCAGCTGGATTGGGAAAATCTGAGCGCAGCAATTGATAGTTATCGCAAAGAAAAAACGGAGAAAA
CCCGTAATGCACTGATTGAAGAACAGGCAACCTATCGTAATGCCATCCATGATTATTTCATTGGTCGTA
CCGATAATCTGACCGATGCAATTAACAAACGTCACGCCGAAATCTATAAAGGCCTGTTTAAAGCCGAA
CTGTTTAATGGCAAAGTTCTGAAACAGCTGGGCACCGTTACCACCACCGAACATGAAAATGCACTGCT
GCGTAGCTTTGATAAATTCACCACCTATTTCAGCGGCTTTTATGAGAATCGCAAAAACGTGTTTAGCGC
AGAAGATATTAGCACCGCAATTCCGCATCGTATTGTGCAGGATAATTTCCCGAAATTCAAAGAGAACT
GCCACATTTTTACCCGTCTGATTACCGCAGTTCCGAGCCTGCGTGAACATTTTGAAAACGTTAAAAAAG
CCATCGGCATCTTTGTTAGCACCAGCATTGAAGAAGTTTTTAGCTTCCCGTTTTACAATCAGCTGCTGA
CCCAGACCCAGATTGATCTGTATAACCAACTGCTGGGTGGTATTAGCCGTGAAGCAGGCACCGAAAAA
ATCAAAGGTCTGAATGAAGTGCTGAATCTGGCCATTCAGAAAAATGATGAAACCGCACATATTATTGC
AAGCCTGCGCGATCATCGTTTTATTCCGCTGTTCAAACAAATTCTGAGCGATCGTAATACCCTGAGCTTTAT
TCTGGAAGAATTCAAATCCGATGAAGAGGTGATTCAGAGCTTTTGCAAATACAAACGCTGCTGCGCA
ATGAAAATGTTCTGGAAACTGCGAAGCACTGTTTAACGAACTGAATAGCATTGATCTGACCCACATC
TTTATCAGCCACAAAAACTGGAAACCATTTCAAGCGCACTGTGTGATCATTGGGATACCCTGCGTAA
TGCCCTGTATGAACGTCGTATTAGCGAACTGACCGGTAAAATTACCAAAAGCGCGAAAGAAAAAGTTC
AGCGCAGTCTGAAACATGAGGATATTAATCTGCAAGAGATTATTAGCGCAGCCGGTAAAGAACTGTCA
GAAGCATTTAAACAGAAAACCAGCGAAATTCTGTCACATGCACATGCAGCACTGGATCAGCCGCTGCC
GACCACCCTGAAAAAACAAGAAGAAAAAGAAATCCTGAAAAGCCAGCTGGATAGCCTGCTGGGTCTG
TATCATCTGCTGGACTGGTTTGCAGTTGATGAAAGCAATGAAGTTGATCCGGAATTTAGCGCACGTCT
GACCGGCATTAAACTGGAAATGGAACCGAGCCTGAGCTTTTATAACAAAGCCCGTAATTATGCCACCA
AAAAACCGTATAGCGTCGAAAAATTCAAACTGAACTTTCAGCGTCCGACCCTGGCAAGCGGTTGGGAT
GTTAATAAAGAAAAAAACAACGGTGCCATCCTGTTCGTGAAAAATGGCCTGTATTATCTGGGTATTAT
GCCGAAACAGAAAGGTCGTTATAAAGCGCTGAGCTTTGAACCGACGGAAAAAACCAGTGAAGGTTTT
GATAAAATGTACTACGACTATTTTCCGGATGCAGCCAAAATGATTCCGAAATGTAGCACCCAGCTGAA
AGCAGTTACCGCACATTTTCAGACCCATACCACCCCGATTCTGCTGAGCAATAACTTTATTGAACCGCT
GGAAATCACCAAAGAGATCTACGATCTGAATAACCCGGAAAAAGAGCCGAAAAAATTCCAGACCGCA
TATGCCAAAAAAAACCGGTGATCAGAAAGGTTATCGTGAAGCGCTGTGTAAATGGATTGATTTCACCCG
TGATTTTCTGAGCAAATACACCAAAACCACCAGTATCGATCTGAGCAGCCTGCGTCCGAGCAGCCAGT
ATAAAGATCTGGGCGAATATTATGCAGAACTGAATCCGCTGCTGTATCATATTAGCTTTCAGCGTATTG
CCGAGAAAGAAATCATGGACGCAGTTGAAACCGGTAAACTGTACCTGTTCCAGATCTACAATAAAGAT
TTTGCCAAAGGCCATCATGGCAAACCGAATCTGCATACCCTGTATTGGACCGGTCTGTTTAGCCCTGAA
AATCTGGCAAAAACCTCGATTAAACTGAATGGTCAGGCGGAACTGTTTTATCGTCCGAAAAGCCGTAT
GAAACGTATGGCAGCTCGTCTGGGTGAAAAAATGCTGAACAAAAAACTGAAAGACCAGAAAACCCCG
ATCCCGGATACACTGTATCAAGAACTGTATGATTATGTGAACCATCGTCTGAGCCATGATCTGAGTGA
TGAAGCACGTGCCCTGCTGCCGAATGTTATTACCAAAGAAGTTAGCCACGAGATCATTAAAGATCGTC
GTTTTACCAGCGACAAATTCCTGTTTCATGTGCCGATTACCCTGAATTATCAGGCAGCAAATAGCCCGA
GCAAATTTAACCAGCGTGTTAATGCATATCTGAAAGAACATCCAGAAACGCCGATTATTGGTATTGAT
CGTGGTGAACGTAACCTGATTTATATCACCGTTATTGATAGCACCGGCAAAATCCTGGAACAGCGTAG
CCTGAATACCATTCAGCAGTTTGATTACCAGAAAAACTGGATAATCGCGAGAAAGAACGTGTTGCAG
ACGTCAGGCATGGTCAGTTGTTGGTACAATTAAAGACCTGAAACAGGGTTATCTGAGCCAGGTTATT
CATGAAATTGTGGATCTGATGATTCACTATCAGGCCGTTGTTGTGCTGGAAAACCTGAATTTTGGCTTT
AAAAGCAAACGTACCGGCATTGCAGAAAAAGCAGTTTATCAGCAGTTCGAGAAAATGCTGATTGACA
AACTGAATTGCCTGGTGCTGAAAGATTATCCGGCTGAAAAAGTTGGTGGTGTTCTGAATCCGTATCAG
CTGACCGATCAGTTTACCAGCTTTGCAAAAATGGGCACCCAGAGCGGATTTCTGTTTTATGTTCCGGCA
CCGTATACGAGCAAAATTGATCCGCTGACCGGTTTTGTTGATCCGTTTGTTTGGAAAACCATCAAAAAC
CATGAAAGCCGCAAACATTTTCTGGAAGGTTTCGATTTTCTGCATTACGACGTTAAAACGGGTGATTTC
ATCCTGCACTTTAAAATGAATCGCAATCTGAGTTTTCAGCGTGGCCTGCCTGGTTTTATGCCTGCATGG
GATATTGTGTTTGAGAAAACGAAACACAGTTCGATGCAAAGGCACCCCGTTTATTGCAGGTAAACG
TATTGTTCCGGTGATTGAAAATCATCGTTTCACCGGTCGTTATCGCGATCTGTATCCGGCAAATGAACT
GATCGCACTGCTGGAAGAGAAAGGTATTGTTTTTCGTGATGGCTCAAACATTCTGCCGAAACTGCTGG
AAAATGATGATAGCCATGCAATTGATACCATGGTTGCACTGATTCGTAGCGTTCTGCAGATGCGTAAT

【図６２－７】

AGCAATGCAGCAACCGGTGAAGATTACATTAATAGTCCGGTTCGTGATCTGAATGGTGTTTGTTTTGAT
AGCCGTTTTCAGAATCCGGAATGGCCGATGGATGCAGATGCAAATGGTGCATATCATATTGCACTGAA
AGGACAGCTGCTGCTGAACCACCTGAAAGAAAGCAAAGATCTGAAACTGCAAAACGGCATTAGCAAT
CAGGATTGGCTGGCATATATCCAAGAACTGCGTAACGGTCGT**AGCAGTGATGATGAAGCAACCGCA**
GATAGCCAGCATGCAGCACCGCCTAAAAAGAAACGTAAAGTTGGTGGTAGCGGTGGTTCAGGTGG
TAGTGGCGGTAGTGGTGGCTCAGGGGGTTCTGGTGGCTCTGGTGGTAGCCTCGAGCACCACCACCACC
ACCAC

Cpf1-4 アミノ酸配列(配列番号1097)

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLD
WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLK
QLGTVTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSL
REHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETA
HIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHK
KLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEIL
SHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYN
KARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEK
TSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTA
YAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEI
MDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAH
RLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFH
VPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDN
REKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFE
KMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWK
TIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAG
KRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWL
AYIQELRNGR**SSDDEATADSQHAAPPKKKRKV**

【図６２－８】

GCCGAAACAGAAAGGTCGTTATAAAGCGCTGAGCTTTGAACCGACGGAAAAAACCAGTGAAGGTTTT
GATAAAATGTACTACGACTATTTTCCGGATGCAGCCAAAATGATTCCGAAATGTAGCACCCAGCTGAA
AGCAGTTACCGCACATTTTCAGACCCATACCACCCCGATTCTGCTGAGCAATAACTTTATTGAACCGCT
GGAAATCACCAAAGAGATCTACGATCTGAATAACCCGGAAAAAGAGCCGAAAAAATTCCAGACCGCA
TATGCCAAAAAAAACCGGTGATCAGAAAGGTTATCGTGAAGCGCTGTGTAAATGGATTGATTTCACCCG
TGATTTTCTGAGCAAATACACCAAAACCACCAGTATCGATCTGAGCAGCCTGCGTCCGAGCAGCCAGT
ATAAAGATCTGGGCGAATATTATGCAGAACTGAATCCGCTGCTGTATCATATTAGCTTTCAGCGTATTG
CCGAGAAAGAAATCATGGACGCAGTTGAAACCGGTAAACTGTACCTGTTCCAGATCTACAATAAAGAT
TTTGCCAAAGGCCATCATGGCAAACCGAATCTGCATACCCTGTATTGGACCGGTCTGTTTAGCCCTGAA
AATCTGGCAAAAACCTCGATTAAACTGAATGGTCAGGCGGAACTGTTTTATCGTCCGAAAAGCCGTAT
GAAACGTATGGCAGCTCGTCTGGGTGAAAAAATGCTGAACAAAAAACTGAAAGACCAGAAAACCCCG
ATCCCGGATACACTGTATCAAGAACTGTATGATTATGTGAACCATCGTCTGAGCCATGATCTGAGTGA
TGAAGCACGTGCCCTGCTGCCGAATGTTATTACCAAAGAAGTTAGCCACGAGATCATTAAAGATCGTC
GTTTTACCAGCGACAAATTCCTGTTTCATGTGCCGATTACCCTGAATTATCAGGCAGCAAATAGCCCGA
GCAAATTTAACCAGCGTGTTAATGCATATCTGAAAGAACATCCAGAAACGCCGATTATTGGTATTGAT
CGTGGTGAACGTAACCTGATTTATATCACCGTTATTGATAGCACCGGCAAAATCCTGGAACAGCGTAG
CCTGAATACCATTCAGCAGTTTGATTACCAGAAAAACTGGATAATCGCGAGAAAGAACGTGTTGCAG
ACGTCAGGCATGGTCAGTTGTTGGTACAATTAAAGACCTGAAACAGGGTTATCTGAGCCAGGTTATT
CATGAAATTGTGGATCTGATGATTCACTATCAGGCCGTTGTTGTGCTGGAAAACCTGAATTTTGGCTTT
AAAAGCAAACGTACCGGCATTGCAGAAAAAGCAGTTTATCAGCAGTTCGAGAAAATGCTGATTGACA
AACTGAATTGCCTGGTGCTGAAAGATTATCCGGCTGAAAAAGTTGGTGGTGTTCTGAATCCGTATCAG
CTGACCGATCAGTTTACCAGCTTTGCAAAAATGGGCACCCAGAGCGGATTTCTGTTTTATGTTCCGGCA
CCGTATACGAGCAAAATTGATCCGCTGACCGGTTTTGTTGATCCGTTTGTTTGGAAAACCATCAAAAAC
CATGAAAGCCGCAAACATTTTCTGGAAGGTTTCGATTTTCTGCATTACGACGTTAAAACGGGTGATTTC
ATCCTGCACTTTAAAATGAATCGCAATCTGAGTTTTCAGCGTGGCCTGCCTGGTTTTATGCCTGCATGG
GATATTGTGTTTGAGAAAAACGAAACACAGTTCGATGCAAAGGCACCCCGTTTATTGCAGGTAAACG
TATTGTTCCGGTGATTGAAAATCATCGTTTCACCGGTCGTTATCGCGATCTGTATCCGGCAAATGAACT
GATCGCACTGCTGGAAGAGAAAGGTATTGTTTTTCGTGATGGCTCAAACATTCTGCCGAAACTGCTGG
AAAATGATGATAGCCATGCAATTGATACCATGGTTGCACTGATTCGTAGCGTTCTGCAGATGCGTAAT

【図６２－９】

Cpf1-5 ヌクレオチド配列(配列番号1115)

AGCACCCAGTTTGAAGGTTTCACCAATCTGTATCAGGTTAGCAAAACCCTGCGTTTTGAACTGATTCCG
CAGGGTAAAACCCTGAAACATATTCAAGAACAGGGCTTCATCGAAGAGGATAAAGCACGTAACGATC
ACTACAAAGAACTGAAACCGATTATCGACCGCATCTATAAAACCTATGCAGATCAGTGTCTGCAGCTG
GTTCAGCTGGATTGGGAAAATCTGAGCGCAGCAATTGATAGTTATCGCAAAGAAAAAACGGAGAAAA
CCCGTAATGCACTGATTGAAGAACAGGCAACCTATCGTAATGCCATCCATGATTATTTCATTGGTCGTA
CCGATAATCTGACCGATGCAATTAACAAACGTCACGCCGAAATCTATAAAGGCCTGTTTAAAGCCGAA
CTGTTTAATGGCAAAGTTCTGAAACAGCTGGGCACCGTTACCACCACCGAACATGAAAATGCACTGCT
GCGTAGCTTTGATAAATTCACCACCTATTTCAGCGGCTTTTATGAGAATCGCAAAAACGTGTTTAGCGC
AGAAGATATTAGCACCGCAATTCCGCATCGTATTGTGCAGGATAATTTCCCGAAATTCAAAGAGAACT
GCCACATTTTTACCCGTCTGATTACCGCAGTTCCGAGCCTGCGTGAACATTTTGAAAACGTTAAAAAAG
CCATCGGCATCTTTGTTAGCACCAGCATTGAAGAAGTTTTTAGCTTCCCGTTTTACAATCAGCTGCTGA
CCCAGACCCAGATTGATCTGTATAACCAACTGCTGGGTGGTATTAGCCGTGAAGCAGGCACCGAAAAA
ATCAAAGGTCTGAATGAAGTGCTGAATCTGGCCATTCAGAAAAATGATGAAACCGCACATATTATTGC
AAGCCTGCGCGATCATCGTTTTATTCCGCTGTTCAAACAAATTCTGAGCGATCGTAATACCCTGAGCTTTAT
TCTGGAAGAATTCAAATCCGATGAAGAGGTGATTCAGAGCTTTTGCAAATACAAACGCTGCTGCGCA
ATGAAAATGTTCTGGAAACTGCGAAGCACTGTTTAACGAACTGAATAGCATTGATCTGACCCACATC
TTTATCAGCCACAAAAACTGGAAACCATTTCAAGCGCACTGTGTGATCATTGGGATACCCTGCGTAA
TGCCCTGTATGAACGTCGTATTAGCGAACTGACCGGTAAAATTACCAAAAGCGCGAAAGAAAAAGTTC
AGCGCAGTCTGAAACATGAGGATATTAATCTGCAAGAGATTATTAGCGCAGCCGGTAAAGAACTGTCA
GAAGCATTTAAACAGAAAACCAGCGAAATTCTGTCACATGCACATGCAGCACTGGATCAGCCGCTGCC
GACCACCCTGAAAAAACAAGAAGAAAAAGAAATCCTGAAAAGCCAGCTGGATAGCCTGCTGGGTCTG
TATCATCTGCTGGACTGGTTTGCAGTTGATGAAAGCAATGAAGTTGATCCGGAATTTAGCGCACGTCT
GACCGGCATTAAACTGGAAATGGAACCGAGCCTGAGCTTTTATAACAAAGCCCGTAATTATGCCACCA
AAAAACCGTATAGCGTCGAAAAATTCAAACTGAACTTTCAGCGTCCGACCCTGGCAAGCGGTTGGGAT
GTTAATAAAGAAAAAAACAACGGTGCCATCCTGTTCGTGAAAAATGGCCTGTATTATCTGGGTATTAT

【図６２－１０】

GCCGAAACAGAAAGGTCGTTATAAAGCGCTGAGCTTTGAACCGACGGAAAAAACCAGTGAAGGTTTT
GATAAAATGTACTACGACTATTTTCCGGATGCAGCCAAAATGATTCCGAAATGTAGCACCCAGCTGAA
AGCAGTTACCGCACATTTTCAGACCCATACCACCCCGATTCTGCTGAGCAATAACTTTATTGAACCGCT
GGAAATCACCAAAGAGATCTACGATCTGAATAACCCGGAAAAAGAGCCGAAAAAATTCCAGACCGCA
TATGCCAAAAAAAACCGGTGATCAGAAAGGTTATCGTGAAGCGCTGTGTAAATGGATTGATTTCACCCG
TGATTTTCTGAGCAAATACACCAAAACCACCAGTATCGATCTGAGCAGCCTGCGTCCGAGCAGCCAGT
ATAAAGATCTGGGCGAATATTATGCAGAACTGAATCCGCTGCTGTATCATATTAGCTTTCAGCGTATTG
CCGAGAAAGAAATCATGGACGCAGTTGAAACCGGTAAACTGTACCTGTTCCAGATCTACAATAAAGAT
TTTGCCAAAGGCCATCATGGCAAACCGAATCTGCATACCCTGTATTGGACCGGTCTGTTTAGCCCTGAA
AATCTGGCAAAAACCTCGATTAAACTGAATGGTCAGGCGGAACTGTTTTATCGTCCGAAAAGCCGTAT
GAAACGTATGGCACATCGTCTGGGTGAAAAAATGCTGAACAAAAAACTGAAAGACCAGAAAACCCCG
ATCCCGGATACACTGTATCAAGAACTGTATGATTATGTGAACCATCGTCTGAGCCATGATCTGAGTGA
TGAAGCACGTGCCCTGCTGCCGAATGTTATTACCAAAGAAGTTAGCCACGAGATCATTAAAGATCGTC
GTTTTACCAGCGACAAATTCCTGTTTCATGTGCCGATTACCCTGAATTATCAGGCAGCAAATAGCCCGA
GCAAATTTAACCAGCGTGTTAATGCATATCTGAAAGAACATCCAGAAACGCCGATTATTGGTATTGAT
CGTGGTGAACGTAACCTGATTTATATCACCGTTATTGATAGCACCGGCAAAATCCTGGAACAGCGTAG
CCTGAATACCATTCAGCAGTTTGATTACCAGAAAAACTGGATAATCGCGAGAAAGAACGTGTTGCAG
ACGTCAGGCATGGTCAGTTGTTGGTACAATTAAAGACCTGAAACAGGGTTATCTGAGCCAGGTTATT
CATGAAATTGTGGATCTGATGATTCACTATCAGGCCGTTGTTGTGCTGGAAAACCTGAATTTTGGCTTT
AAAAGCAAACGTACCGGCATTGCAGAAAAAGCAGTTTATCAGCAGTTCGAGAAAATGCTGATTGACA
AACTGAATTGCCTGGTGCTGAAAGATTATCCGGCTGAAAAAGTTGGTGGTGTTCTGAATCCGTATCAG
CTGACCGATCAGTTTACCAGCTTTGCAAAAATGGGCACCCAGAGCGGATTTCTGTTTTATGTTCCGGCA
CCGTATACGAGCAAAATTGATCCGCTGACCGGTTTTGTTGATCCGTTTGTTTGGAAAACCATCAAAAAC
CATGAAAGCCGCAAACATTTTCTGGAAGGTTTCGATTTTCTGCATTACGACGTTAAAACGGGTGATTTC
ATCCTGCACTTTAAAATGAATCGCAATCTGAGTTTTCAGCGTGGCCTGCCTGGTTTTATGCCTGCATGG
GATATTGTGTTTGAGAAAAACGAAACACAGTTCGATGCAAAGGCACCCCGTTTATTGCAGGTAAACG
TATTGTTCCGGTGATTGAAAATCATCGTTTCACCGGTCGTTATCGCGATCTGTATCCGGCAAATGAACT
GATCGCACTGCTGGAAGAGAAAGGTATTGTTTTTCGTGATGGCTCAAACATTCTGCCGAAACTGCTGG
AAAATGATGATAGCCATGCAATTGATACCATGGTTGCACTGATTCGTAGCGTTCTGCAGATGCGTAAT

50

【図６２－１０】

AGCAATGCAGCAACCGGTGAAGATTACATTAATAGTCCGGTTCGTGATCTGAATGGTGTTTGTTTTGAT
AGCCGTTTTCAGAATCCGGAATGGCCGATGGATGCAGATGCAAATGGTGCATATCATATTGCACTGAA
AGGACAGCTGCTGCTGAACCACCTGAAAGAAAGCAAAGATCTGAAACTGCAAAACGGCATTAGCAAT
CAGGATTGGCTGGCATATATCCAAGAACTGCGTAACGGTCGT**AGCAGTGATGATGAAGCAACCGCA**
GATAGCCAGCATGCAGCACCGCCTAAAAAGAAACGTAAAGTT

Cpf1-6 アミノ酸配列(配列番号1108)

STQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLD
WENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLK
QLGTVTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSL
REHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETA
HIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHK
KLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEIL
SHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYN
KARNYATKKPYSVEKFKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEK
TSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTA
YAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEI
MDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAH
RLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFH
VPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDN
REKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFE
KMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWK
TIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAG
KRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNA
ATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWL
AYIQELRNGR**SSDDEATADSQHAAPPKKKRKV**GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLFHHHHHH

Cpf1-6 ヌクレオチド配列(配列番号1116)

AGCACCCAGTTTGAAGGTTTCACCAATCTGTATCAGGTTAGCAAAACCCTGCGTTTTGAACTGATTCCG
CAGGGTAAAACCCTGAAACATATTCAAGAACAGGGCTTCATCGAAGAGGATAAAGCACGTAACGATC
ACTACAAAGAACTGAAACCGATTATCGACCGCATCTATAAAACCTATGCAGATCAGTGTCTGCAGCTG
GTTCAGCTGGATTGGGAAAATCTGAGCGCAGCAATTGATAGTTATCGCAAAGAAAAACCGAAGAAA
CCCGTAATGCACTGATTGAAGAACAGGCAACCTATCGTAATGCCATCCATGATTATTTCATTGGTCGTA
CCGATAATCTGACCGATGCAATTAACAAACGTCACGCCGAAATCTATAAAGGCCTGTTTAAAGCCGAA
CTGTTTAATGGCAAAGTTCTGAAACAGCTGGGCACCGTTACCACCACCGAACATGAAAATGCACTGCT
GCGTAGCTTTGATAAATTCACCACCTATTTCAGCGGCTTTTATGAGAATCGCAAAAACGTGTTTAGCGC
AGAAGATATTAGCACCGCAATTCCGCATCGTATTGTGCAGGATAATTTCCCGAAATTCAAAGAGAACT
GCCACATTTTTACCCGTCTGATTACCGCAGTTCCGAGCCTGCGTGAACATTTTGAAAACGTTAAAAAG
CCATCGGCATCTTTGTTAGCACCAGCATTGAAGAAGTTTTTAGCTTCCCGTTTTACAATCAGCTGCTGA
CCCAGACCAGATTGATCTGTATAACCAACTGCTGGGTGGTATTACCAAAAGCGCGAAAGAAAAAGTTC
ATCAAAGGTCTGAATGAAGTGCTGAATCTGGCCATTCAGAAAAATGATGAAACCGCACATATTATTGC
AAGCCTGCCGCATCGTTTTATTCCGCTGTTCAAACAAATTCTGAGCGATCGTAATACCCTGAGCTTTAT
TCTGGAAGAATTCAAATCCGATGAAGAGGTGATTCAGAGCTTTTGCAAATACAAAACGCTGCTGCGCA
ATGAAAATGTTCTGGAAACTGCCGAAGCACTGTTTAACGAACTGAATAGCATTGATCTGACCCACATC
TTTATCAGCCACAAAAAACTGGAAACCATTTCAAGCGCACTGTGTGATCATTGGGATACCCTGCGTAA
TGCCCTGTATGAACGTCGTATTAGCGAACTGACCGGTAAAATTACCAAAAGCGCGAAAGAAAAAGTTC
AGCGCAGTCTGAAACATGAGGATATTAATCTGCAAGAGATTATTAGCGCAGCCGGTAAAGAACTGTCA
GAAGCATTTAAACAGAAAACCAGCGAAATTCTGTCACATGCACATGCAGCACTGGATCAGCCGCTGCC
GACCACCCTGAAAAAACAAGAAGAAAAAGAAATCCTGAAAAGCCAGCTGGATAGCCTGCTGGGTCTG
TATCATCTGCTGGACTGGTTTGCAGTTGATGAAAGCAATGAAGTTGATCCGGAATTTAGCGCACGTCT
GACCGGCATTAAACTGGAAATGGAACCGAGCCTGAGCTTTTATAACAAAGCCCGTAATTATGCCACCA
AAAAACCGTATAGCGTCGAAAAATTCAAACTGAACTTTCAGCGTCCGACCCTGGCAAGCGGTTGGGAT
GTTAATAAAGAAAAAAACAACGGTGCCATCCTGTTCGTGAAAAATGGCCTGTATTATCTGGGTATTAT
GCCGAAACAGAAAGGTCGTTATAAAGCGCTGAGCTTTGAACCGACGGAAAAAACCAGTGAAGGTTTT
GATAAAATGTACTACGACTATTTTCCGGATGCAGCCAAAATGATTCCGAAATGTAGCACCCAGCTGAA

【図６２－１１】

AGCAGTTACCGCACATTTTCAGACCCATACCACCCCGATTCTGCTGAGCAATAACTTTATTGAACCGCT
GGAAATCACCAAAGAGATCTACGATCTGAATAACCCGGAAAAAGAGCCGAAAAAATTCCAGACCGCA
TATGCAAAAAAAACCGGTGATCAGAAAGGTTATCGTGAAGCGCTGTGTAAATGGATTGATTTCACCCG
TGATTTTCTGAGCAAATACACCAAAACCACCAGTATCGATCTGAGCAGCCTGCGTCCGAGCAGCCAGT
ATAAAGATCTGGGCGAATATTATGCAGAACTGAATCCGCTGCTGTATCATATTAGCTTTCAGCGTATTG
CCGAGAAAGAAATCATGGACGCAGTTGAAACCGGTAAACTGTACCTGTTCCAGATCTACAATAAAGAT
TTTGCCAAAGGCCATCATGGCAAACCGAATCTGCATACCCTGTATTGGACCGGTCTGTTTAGCCCTGAA
AATCTGGCAAAAACCTCGATTAAACTGAATGGTCAGGCGGAACTGTTTTATCGTCCGAAAAGCCGTAT
GAAACGTATGGCACATCGTCTGGGTGAAAAAATGCTGAACAAAAAACTGAAAGACCAGAAAACCCCG
ATCCCGGATACACTGTATCAAGAACTGTATGATTATGTGAACCATCGTCTGAGCCATGATCTGAGTGA
TGAAGCACGTGCCCTGCTGCCGAATGTTATTACCAAAGAAGTTAGCCACGAGATCATTAAAGATCGTC
GTTTTACCAGCGACAAATTCCTGTTTCATGTGCCGATTACCCTGAATTATCAGGCAGCAAATAGCCCGA
GCAAATTTAACCAGCGTGTTAATGCATATCTGAAAGAACATCCAGAAACGCCGATTATTGGTATTGAT
CGTGGTGAACGTAACCTGATTTATATCACCGTTATTGATAGCACCGGCAAAATCCTGGAACAGCGTAG
CCTGAATACCATTCAGCAGTTTGATTACCAGAAAAAACTGGATAATCGCGAGAAAGAACGTGTTGCAG
CACGTCAGGCATGGTCAGTTGTTGGTACAATTAAAGACCTGAAACAGGGTTATCTGAGCCAGGTTATT
CATGAAATTGTGGATCTGATGATTCACTATCAGGCCGTTGTTGTGCTGGAAAACCTGAATTTTGGCTTT
AAAAGCAAACGTACCGGCATTGCAGAAAAAGCAGTTTATCAGCAGTTCGAGAAAATGCTGATTGACA
AACTGAATTGCCTGGTGCTGAAAGATTATCCGGCTGAAAAAGTTGGTGGTGTTCTGAATCCGTATCAG
CTGACCGATCAGTTTACCAGCTTTGCAAAAATGGGCACCCAGAGCGGATTTCTGTTTTATGTTCCGGCA
CCGTATACGAGCAAAATTGATCCGCTGACCGGTTTTGTTGATCCGTTTGTTTGGAAAACCATCAAAAAC
CATGAAAGCCGCAAACATTTTCTGGAAGGTTTCGATTTCTGCATTACGACGTTAAAACGGGTGATTTC
ATCCTGCACTTTAAAATGAATCGCAATCTGAGTTTTCAGCGTGGCCTGCCTGGTTTTATGCCTGCATGG
GATATTGTGTTTGAGAAAACGAAACACAGTTCGATGCAAAGGCACCCCGTTTATTGCAGGTAAACG
TATTGTTCCGGTGATTGAAAATCATCGTTTCACCGGTCGTTATCGCGATCTGTATCCGGCAAATGAACT
GATCGCACTGCTGGAAGAGAAAGGTATTGTTTTTCGTGATGGCTCAAACATTCTGCCGAAACTGCTGG
AAAATGATGATAGCCATGCAATTGATACCATGGTTGCACTGATTCGTAGCGTTCTGCAGATGCGTAAT
AGCAATGCAGCAACCGGTGAAGATTACATTAATAGTCCGGTTCGTGATCTGAATGGTGTTTGTTTTGAT
AGCCGTTTTCAGAATCCGGAATGGCCGATGGATGCAGATGCAAATGGTGCATATCATATTGCACTGAA
AGGACAGCTGCTGCTGAACCACCTGAAAGAAAGCAAAGATCTGAAACTGCAAAACGGCATTAGCAAT
CAGGATTGGCTGGCATATATCCAAGAACTGCGTAACGGTCGT**AGCAGTGATGATGAAGCAACCGCA**
GATAGCCAGCATGCAGCACCGCCTAAAAAGAAACGTAAAGTTGGTGGTAGCGGTGGTTCAGGTGG
TAGTGGCGGTAGTGGTGGCTCAGGGGGTTCTGGTGGCTCTGGTGGTAGCCTCGAGCACCACCACCACC
ACCAC

Cpf1-7 アミノ酸配列(配列番号1109)

MGRDPGKPIPNPLLGLDSTAPKKKRKVGIHGVPAATQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEE
DKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFI
GRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSA
EDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLY
NQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFC
KYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKE
KVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHL
LDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEK
NNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQ
THTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSI
DLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLY
WTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRL
SHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGID
RGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIV
DLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFT
SFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNR
NLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFR
DGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADA
NGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN**PKKKRKV**KLAAALEHHHHHH

【図６２－１２】

Cpf1-7 ヌクレオチド配列(配列番号1117)

ATGGGTCGGGATCCAGGTAAACCGATTCCGAATCCGCTGCTGGGTCTGGATAGCACCGCACCGAAAAA
AAAACGTAAAGTTGGTATTCATGGTGTTCCGGCAGCAACCCAGTTTGAAGGTTTCACCAATCTGTATC
AGGTTAGCAAAACCCTGCGTTTTGAACTGATTCCGCAGGGTAAAACCCTGAAACATATTCAAGAACAG
GGCTTCATCGAAGAGGATAAAGCACGTAACGATCACTACAAAGAACTGAAACCGATTATCGACCGCA
TCTATAAAACCTATGCAGATCAGTGTCTGCAGCTGGTTCAGCTGGATTGGGAAAATCTGAGCGCAGCA
ATTGATAGTTATCGCAAAGAAAAAACCGAAGAAACCCGTAATGCACTGATTGAAGAACAGGCAACCT
ATCGTAATGCCATCCATGATTATTTCATTGGTCGTACCGATAATCTGACCGATGCAATTAACAAACGTC
ACGCCGAAATCTATAAAGGCCTGTTTAAAGCCGAACTGTTTAATGGCAAAGTTCTGAAACAGCTGGGC
ACCGTTACCACCACCGAACATGAAAATGCACTGCTGCGTAGCTTTGATAAATTCACCACCTATTTCAGC
GGCTTTTATGAGAATCGCAAAAACGTGTTTAGCGCAGAAGATATTAGCACCGCAATTCCGCATCGTAT
TGTGCAGGATAATTTCCCGAAATTCAAAGAGAACTGCCACATTTTTACCCGTCTGATTACCGCAGTTCC
GAGCCTGCGTGAACATTTTGAAAACGTTAAAAAAGCCATCGGCATCTTTGTTAGCACCAGCATTGAAG
AAGTTTTTAGCTTCCCGTTTTACAATCAGCTGCTGACCCAGACCCAGATTGATCTGTATAACCAACTGC
TGGGTGGTATTAGCCGTGAAGCAGGCACCGAAAAAATCAAAGGTCTGAATGAAGTGCTGAATCTGGC
CATTCAGAAAAATGATGAAACCGCACATATTATTGCAAGCCTGCCGCATCGTTTTATTCCGCTGTTCAA
ACAAATTCTGAGCGATCGTAATACCCTGAGCTTTATTCTGGAAGAATTCAAATCCGATGAAGAGGTGA
TTCAGAGCTTTTGCAAATACAAAACGCTGCTGCGCAATGAAAATGTTCTGGAAACTGCCGAAGCACTG
TTTAACGAACTGAATAGCATTGATCTGACCCACATCTTTATCAGCCACAAAAAACTGGAAACCATTTC
AAGCGCACTGTGTGATCATTGGGATACCCTGCGTAATGCCCTGTATTGAACGTCGTATTAGCGAACTGA
CCGGTAAAATTACCAAAAGCGCGAAAGAAAAAGTTCAGCGCAGTCTGAAACATGAGGATATTAATCT
GCAAGAGATTATTAGCGCAGCCGGTAAAGAACTGTCAGAAGCATTTAAACAGAAAACCAGCGAAATT
CTGTCACATGCACATGCAGCACTGGATCAGCCGCTGCCGACCACCCTGAAAAAACAAGAAGAAAAAG
AAATCCTGAAAAGCCAGCTGGATAGCCTGCTGGGTCTGTATCATCTGCTGGACTGGTTTGCAGTTGAT
GAAAGCAATGAAGTTGATCCGGAATTTAGCGCACGTCTGACCGGCATTAAACTGGAAATGGAACCGA
GCCTGAGCTTTTATAACAAAGCCCGTAATTATGCCACCAAAAAACCGTATAGCGTCGAAAAATTCAAA
CTGAACTTTCAGATGCCGACCCTGGCAAGCGGTTGGGATGTTAATAAAGAAAAAACAACGGTGCCAT
CCTGTTCGTGAAAAATGGCCTGTATTATCTGGGTATTATGCCGAAACAGAAAGGTCGTTATAAAGCGC
TGAGCTTTGAACCGACGGAAAAAACCAGTGAAGGTTTTGATAAAATGTACTACGACTATTTTCCGGAT
GCAGCCAAAATGATTCCGAAATGTAGCACCCAGCTGAAAGCAGTTACCGCACATTTTCAGACCCATAC
CACCCCGATTCTGCTGAGCAATAACTTTATTGAACCGCTGGAAATCACCAAAGAGATCTACGATCTGA
ATAACCCGGAAAAAGAGCCGAAAAAATTCCAGACCGCATATGCAAAAAAAACCGGTGATCAGAAAG
GTTATCGTGAAGCGCTGTGTAAATGGATTGATTTCACCCGTGATTTTCTGAGCAATACACCAAAACC
ACCAGTATCGATCTGAGCAGCCTGCGTCCGAGCAGCCAGTATAAAGATCTGGGCGAATATTATGCAGA
ACTGAATCCGCTGCTGTATCATATTAGCTTTCAGCGTATTGCCGAGAAAGAAATCATGGACGCAGTTG
AAACCGGTAAACTGTACCTGTTCCAGATCTACAATAAAGATTTTGCCAAAGGCCATCATGGCAAACCG
AATCTGCATACCCTGTATTGGACCGGTCTGTTTAGCCCTGAAAATCTGGCAAAAACCTCGATTAAACTG
AATGGTCAGGCGGAACTGTTTTATCGTCCGAAAAGCCGTATGAAACGTATGGCACATCGTCTGGGTGA
AAAAATGCTGAACAAAAAACTGAAAGACCAGAAAACCCCGATCCCGGATACACTGTATCAAGAACTG
TATGATTATGTGAACCATCGTCTGAGCCATGATCTGAGTGATGAAGCACGTGCCCTGCTGCCGAATGTT
ATTACCAAAGAAGTTAGCCACGAGATCATTAAAGATCGTCGTTTTACCAGCGACAAATTCTTTTTTCAT
GTGCCGATTACCCTGAATTATCAGGCAGCAAATAGCCCGAGCAAATTTAACCAGCGTGTTAATGCATA
TCTGAAAGAACATCCAGAAACGCCGATTATTGGTATTGATCGTGGTGAACGTAACCTGATTTATATCA
CCGTTATTGATAGCACCGGCAAAATCCTGGAACAGCGTAGCCTGAATACCATTCAGCAGTTTGATTAC
CAGAAAAAACTGGATAATCGCGAGAAAGAACGTGTTGCAGCACGTCAGGCATGGTCAGTTGTTGGTA
CAATTAAAGACCTGAAACAGGGTTATCTGAGCCAGGTTATTCATGAAATTGTGGATCTGATGATTCAC
TATCAGGCCGTTGTTGTGCTGGAAAACCTGAATTTTGGCTTTAAAAGCAAACGTACCGGCATTGCAGA
AAAAGCAGTTTATCAGCAGTTCGAGAAAATGCTGATTGACAAACTGAATTGCCTGGTGCTGAAAGATT
ATCCGGCTGAAAAAGTTGGTGGTGTTCTGAATCCGTATCAGCTGACCGATCAGTTTACCAGCTTTGCAA
AAATGGGCACCCAGAGCGGATTTCTGTTTTATGTTCCGGCACCGTATACGAGCAAAATTGATCCGCTG
ACCGGTTTTGTTGATCCGTTTGTTTGGAAAACCATCAAAAACCATGAAAGCCGCAAACATTTTCTGGA
AGGTTTCGATTTTCTGCATTACGACGTTAAAACGGGTGATTTCATCCTGCACTTTAAAATGAATCGCAA
TCTGAGTTTTCAGCGTGGCCTGCCTGGTTTTATGCCTGCATGGGATATTGTGTTTGAGAAAACGAAAC
ACAGTTCGATGCAAAAGGCACCCCGTTTATTGCAGGTAAACGTATTGTTCCGGTGATTGAAAATCATC
GTTTCACCGGTCGTTATCGCGATCTGTATCCGGCAAATGAACTGATCGCACTGCTGGAAGAGAAAGGT

【図６２－１３】

ATTGTTTTTCGTGATGGCTCAAACATTCTGCCGAAACTGCTGGAAAATGATGATAGCCATGCAATTGAT
ACCATGGTTGCACTGATTCGTAGCGTTCTGCAGATGCGTAATAGCAATGCAGCAACCGGTGAAGATTA
CATTAATAGTCCGGTTCGTGATCTGAATGGTGTTTGTTTTGATAGCCGTTTTCAGAATCCGGAATGGCC
GATGGATGCAGATGCAAATGGTGCATATCATATTGCACTGAAAGGACAGCTGCTGCTGAACCACCTGA
AAGAAAGCAAAGATCTGAAACTGCAAAACGGCATTAGCAATCAGGATTGGCTGGCATATATCCAAGA
ACTGCGTAA**CCTAAAAAAAAACGCAAAGTG**AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCAC
CAC

【配列表】
0007706888000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類　　ＦＩ
Ｃ１２Ｎ　5/10 (2006.01)　　Ｃ１２Ｎ　5/10

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/773,073
(32)優先日　平成30年11月29日(2018.11.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
前置審査

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州　０２１１４、ボストン、ピンクニー・ストリート　１２３
(72)発明者　ヒース、ジャック
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州　０１８９０、ウィンチェスター、ワイルドウッド・ストリート　１
(72)発明者　ズリス、ジョン・アンソニー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州　０２１２２、ボストン、マンレイ・ストリート　８、ユニット　２
(72)発明者　チャン、カイシン
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州　０２０５２、メドフィールド、ウッド・エンド・レーン　１１３

審査官　平林　由利子

(56)参考文献　国際公開第２０１７／１６０８９０（WO，Ａ１）
中国特許出願公開第１０６２４４５９１（ＣＮ，Ａ）
Genome Biol, 2015 Dec 15, vol. 16, article no. 280 (pp. 1-10)

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｐ　１／００－４１／００
Ａ６１Ｋ　３８／００－３８／５８
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）