

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-536782

(P2019-536782A)

(43) 公表日 令和1年12月19日 (2019. 12. 19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02 1 0 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	4 C 0 8 7
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-528478 (P2019-528478)	(71) 出願人	508152917
(86) (22) 出願日	平成29年11月28日 (2017. 11. 28)		ザ ボード オブ リージェンツ オブ
(85) 翻訳文提出日	令和1年7月23日 (2019. 7. 23)		ザ ユニバーシティー オブ テキサス
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/063468		システム
(87) 国際公開番号	W02018/098480		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス州
(87) 国際公開日	平成30年5月31日 (2018. 5. 31)		オースティン ウェスト 第七 ストリート 2 0 1
(31) 優先権主張番号	62/426, 853		2 0 1 West 7 th Street
(32) 優先日	平成28年11月28日 (2016. 11. 28)		, Austin, TX 7 8 7 0 1, Un
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		ited States of Amer
		(74) 代理人	ica
			100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CRISPR/Cpf1 媒介性遺伝子編集による筋ジストロフィーの予防

(57) 【要約】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、筋線維の完全性に必要なタンパク質であるジストロフィンコードする遺伝子の変異によって引き起こされる遺伝性のX連鎖疾患である。本開示は、CRISPR/Cpf1による遺伝子編集 (筋編集) が、DMDのモデルであるmdxマウスにおけるジストロフィン遺伝子変異の修正に有効であることを報告する。さらに、本開示は、変異体エクソンの永続的スキッピングを設計することによってmdxマウスの生殖系列の編集を最適化すること、およびアデノ随伴ウイルス (AAV) の出生後送達によってエクソンスキッピングを延長することにより疾患を修正することも報告する。AAVを介した筋編集は、インビボでmdxマウスにおけるジストロフィンのリーディングフレームを効率的に回復させることができる。本開示は、筋編集によるエクソンスキッピング手段を、マウスにおける体細胞組織からヒトDMD患者由来のiPSC (人工多能性幹細胞) まで進展させることに成功したことを報告する。異なる変異を有する患者に由来するiPSCでカスタム筋編集を実施し、iPSC由来心筋細胞における全ての変異についてジストロフィンタンパク質発現を回復させることに成功した。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

Cpf1ポリペプチドをコードする配列およびDMDガイドRNA (gRNA) をコードする配列を含む組成物であって、DMD gRNAがジストロフィンスプライス部位を標的とし、かつ、DMD gRNAがSEQ ID No.448~770のいずれか1つを含む、組成物。

【請求項 2】

Cpf1ポリペプチドをコードする配列が、ラクノスピラ科 (Lachnospiraceae) のCpf1ポリペプチドをコードする配列から単離されるかまたはそれに由来する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

Cpf1ポリペプチドをコードする配列が、アシダミノコッカス (Acidaminococcus) のCpf1ポリペプチドをコードする配列から単離されるかまたはそれに由来する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

Cpf1ポリペプチドをコードする配列またはDMD gRNAをコードする配列が、RNA配列を含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

RNA配列がmRNA配列である、請求項4に記載の組成物。

【請求項 6】

RNA配列が、少なくとも1つの化学的に修飾されたヌクレオチドを含む、請求項4または5に記載の組成物。

【請求項 7】

Cpf1ポリペプチドをコードする配列がDNA配列を含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

第一のベクターが、Cpf1ポリペプチドをコードする配列を含み、第二のベクターが、DMD gRNAをコードする配列を含む、請求項1~7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

第一のベクターまたはCpf1ポリペプチドをコードする配列が、第一のポリA配列をさらに含む、請求項8に記載の組成物。

【請求項 10】

第二のベクターまたはDMD gRNAをコードする配列が、第二のポリA配列をさらに含む、請求項8に記載の組成物。

【請求項 11】

第一のベクターまたはCpf1ポリペプチドをコードする配列が、第一のプロモーター配列をさらに含む、請求項8~10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

第二のベクターまたはDMD gRNAをコードする配列が、第二のプロモーター配列をさらに含む、請求項8~10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

第一のプロモーター配列および第二のプロモーター配列が同一である、請求項11または12に記載の組成物。

【請求項 14】

第一のプロモーター配列および第二のプロモーター配列が同一ではない、請求項11または12に記載の組成物。

【請求項 15】

第一のプロモーター配列または第二のプロモーター配列が構成的プロモーターを含む、請求項11~14のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

第一のプロモーター配列または第二のプロモーター配列が誘導性プロモーターを含む、

10

20

30

40

50

請求項11～14のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項17】

第一のプロモーター配列または第二のプロモーター配列が筋細胞特異的プロモーターを含む、請求項11～16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項18】

筋細胞特異的プロモーターが、ミオシン軽鎖-2プロモーター、 α -アクチンプロモーター、トロポニン1プロモーター、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体プロモーター、ジストロフィンプロモーター、 γ インテグリンプロモーター、脳性ナトリウム利尿ペプチドプロモーター、 β -クリスタリン/低分子量熱ショックタンパク質プロモーター、 β -ミオシン重鎖プロモーター、またはANFプロモーターである、請求項17に記載の組成物。

10

【請求項19】

筋細胞特異的プロモーターがジストロフィンプロモーターである、請求項17に記載の組成物。

【請求項20】

筋細胞特異的プロモーターが β -ミオシン重鎖プロモーターである、請求項17に記載の組成物。

【請求項21】

第一のベクターまたは第二のベクターが、検出可能マーカーをコードする配列をさらに含む、請求項8～20のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項22】

検出可能マーカーが蛍光マーカーである、請求項21に記載の組成物。

20

【請求項23】

第一のベクターまたは第二のベクターが、2A様自己切断ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項8～22のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項24】

2A様自己切断ドメインをコードする配列が、TaV-2Aペプチドを含む、請求項23に記載の組成物。

【請求項25】

ベクターが、Cpf1ポリペプチドをコードする配列およびDMD gRNAをコードする配列を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項26】

ベクターがポリA配列をさらに含む、請求項25に記載の組成物。

【請求項27】

ベクターがプロモーター配列をさらに含む、請求項25または26に記載の組成物。

【請求項28】

プロモーター配列が構成的プロモーターを含む、請求項27に記載の組成物。

【請求項29】

プロモーター配列が誘導性プロモーターを含む、請求項27に記載の組成物。

【請求項30】

プロモーター配列が筋細胞特異的プロモーターを含む、請求項28または29に記載の組成物。

40

【請求項31】

筋細胞特異的プロモーターが、ミオシン軽鎖-2プロモーター、 α -アクチンプロモーター、トロポニン1プロモーター、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体プロモーター、ジストロフィンプロモーター、 γ インテグリンプロモーター、脳性ナトリウム利尿ペプチドプロモーター、 β -クリスタリン/低分子量熱ショックタンパク質プロモーター、 β -ミオシン重鎖プロモーター、またはANFプロモーターである、請求項30に記載の組成物。

【請求項32】

筋細胞特異的プロモーターがジストロフィンプロモーターである、請求項30に記載の組成物。

50

【請求項 33】

筋細胞特異的プロモーターが -ミオシン重鎖プロモーターである、請求項30に記載の組成物。

【請求項 34】

第一のベクターまたは第二のベクターが、検出可能マーカークをコードする配列をさらに含む、請求項25～33のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 35】

検出可能マーカークが蛍光マーカークである、請求項34に記載の組成物。

【請求項 36】

第一のベクターまたは第二のベクターが、2A様自己切断ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項25～35のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 37】

2A様自己切断ドメインをコードする配列がTaV-2Aペプチドを含む、請求項36に記載の組成物。

【請求項 38】

哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化された配列を含む、請求項1～37のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 39】

ヒト細胞における発現のためにコドン最適化された配列を含む、請求項1～38のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 40】

Cpf1ポリペプチドをコードする配列が、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項39に記載の組成物。

【請求項 41】

スプライス部位がスプライスドナー部位である、請求項1～40のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 42】

スプライス部位がスプライスアクセプター部位である、請求項1～40のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 43】

第一のベクターまたは第二のベクターが非ウイルスベクターである、請求項8～24のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 44】

非ウイルスベクターがプラスミドである、請求項43に記載の組成物。

【請求項 45】

リボソームまたはナノ粒子が、第一のベクターまたは第二のベクターを含む、請求項43または44に記載の組成物。

【請求項 46】

ベクターが非ウイルスベクターである、請求項25～37のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 47】

非ウイルスベクターがプラスミドである、請求項46に記載の組成物。

40

【請求項 48】

リボソームまたはナノ粒子がベクターを含む、請求項46または47に記載の組成物。

【請求項 49】

第一のベクターまたは第二のベクターがウイルスベクターである、請求項8～24のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 50】

ベクターがウイルスベクターである、請求項25～37のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 51】

ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、請求項49または50に

50

記載の組成物。

【請求項 5 2】

AAVベクターが、複製欠損体または条件付き複製欠損性である、請求項51に記載の組成物。

【請求項 5 3】

AAVベクターが組換えAAVベクターである、請求項51または52に記載の組成物。

【請求項 5 4】

AAVベクターが、血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、またはそれらの任意の組み合わせのAAVベクターから単離されるかまたはそれに由来する配列を含む、請求項51～53のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 5 5】

一本鎖DMDオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項1～54のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 6】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項1～55のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 7】

請求項1～56のいずれか一項に記載の組成物を含む、細胞。

【請求項 5 8】

筋細胞、衛星細胞、またはその前駆体である、請求項57に記載の細胞。

20

【請求項 5 9】

iPSCまたはiCMである、請求項57に記載の細胞。

【請求項 6 0】

請求項57～59のいずれか一項に記載の細胞を含む、組成物。

【請求項 6 1】

細胞と請求項1～59のいずれか一項に記載の組成物とを、Cpf1ポリペプチドおよびgRNAの発現に適した条件下で接触させる工程を含む、ジストロフィン遺伝子欠損を修正する方法であって、Cpf1ポリペプチドがジストロフィンスプライス部位を破壊し、スプライス部位の破壊が変異体DMDエクソンの選択的スキッピングをもたらす、方法。

【請求項 6 2】

変異体DMDエクソンがエクソン23である、請求項61に記載の方法。

30

【請求項 6 3】

変異体DMDエクソンがエクソン51である、請求項61に記載の方法。

【請求項 6 4】

細胞が、インビボ、エクスビボ、インビトロ、またはインサイチューにある、請求項61～63のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

請求項61～64のいずれか一項に記載の方法によって生産される、細胞。

【請求項 6 6】

請求項65に記載の細胞を含む、組成物。

40

【請求項 6 7】

請求項1～56、60、または66のいずれか一項に記載の組成物の治療有効量を対象に投与する工程を含む、その必要のある対象における筋ジストロフィーを処置する方法。

【請求項 6 8】

組成物が局所投与される、請求項67に記載の方法。

【請求項 6 9】

組成物が筋組織に直接投与される、請求項67または68に記載の方法。

【請求項 7 0】

組成物が、筋肉内注入または注射によって投与される、請求項69に記載の方法。

【請求項 7 1】

筋組織が、前脛骨筋組織、大腿四頭筋組織、ヒラメ筋組織、隔膜組織、または心組織を

50

含む、請求項69または70に記載の方法。

【請求項 7 2】

組成物が、静脈内注入または注射などによって全身投与される、請求項67に記載の方法。

【請求項 7 3】

組成物の投与後に、対象が、正常なジストロフィン陽性筋線維、および中心核を含有するモザイクジストロフィン陽性筋線維、またはそれらの組み合わせを示す、請求項67～72のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 4】

組成物の投与前の正常なジストロフィン陽性筋線維の非存在またはその存在量のレベルと比較して、組成物の投与後に、対象が、正常なジストロフィン陽性筋線維の出現またはその存在量のレベルの増加を示す、請求項67～72のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 7 5】

組成物の投与前の中心核を含有するモザイクジストロフィン陽性筋線維の非存在またはその存在量のレベルと比較して、組成物の投与後に、対象が、中心核を含有するモザイクジストロフィン陽性筋線維の出現またはその存在量のレベルの増加を示す、請求項67～72のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

組成物の投与前の血清CKレベルと比較して、組成物の投与後に、対象が、減少した血清CKレベルを示す、請求項67～72のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 7 7】

組成物の投与前の握力と比較して、組成物の投与後に、対象が、改善された握力を示す、請求項67～72のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

請求項60または66に記載の組成物の治療有効量を投与する工程を含み、細胞が自己由来である、請求項67～77のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 9】

請求項60または66に記載の組成物の治療有効量を投与する工程を含み、細胞が同種異系である、請求項67～77のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 0】

対象が、新生児、幼児、子供、若年成人、または成人である、請求項67～79のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 8 1】

対象が、筋ジストロフィーを有する、請求項67～80のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 2】

対象が、筋ジストロフィーの遺伝的保因者である、請求項67～80のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 3】

対象が男性である、請求項67～82のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

対象が女性である、請求項67～82のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 8 5】

対象が、無症候性であるように見え、遺伝子診断が、DMD遺伝子産物の機能を損なうDMD遺伝子の一方または両方のコピーにおける変異を明らかにする、請求項67～84のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 6】

対象が、筋ジストロフィーの初期の徴候または症状を呈する、請求項67～84のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 7】

筋ジストロフィーの初期の徴候または症状が、筋肉量の損失または近位筋衰弱を含む、 50

請求項86に記載の方法。

【請求項 8 8】

筋肉量の損失または近位筋衰弱が、一方もしくは両方の足および/または骨盤、続いて、1つまたは複数の上体筋に起こる、請求項87に記載の方法。

【請求項 8 9】

筋ジストロフィーの初期の徴候または症状が、仮性肥大、低持久力、起立困難、歩行困難、階段を上ることが困難、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項86に記載の方法。

【請求項 9 0】

対象が、筋ジストロフィーの進行性の徴候または症状を呈する、請求項67～84のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 9 1】

筋ジストロフィーの進行性の徴候または症状が、筋組織消耗、筋組織が脂肪で置き換えられること、または筋組織が線維性組織で置き換えられることを含む、請求項90に記載の方法。

【請求項 9 2】

対象が、筋ジストロフィーの後期の徴候または症状を呈する、請求項67～84のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 3】

筋ジストロフィーの後期の徴候または症状が、異常な骨発達、脊柱湾曲、運動の消失、および麻痺を含む、請求項92に記載の方法。

20

【請求項 9 4】

対象が、筋ジストロフィーの神経学的な徴候または症状を呈する、請求項67～84のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 5】

筋ジストロフィーの神経学的徴候または症状が、知的障害および麻痺を含む、請求項94に記載の方法。

【請求項 9 6】

対象が筋ジストロフィーの進行性の、後期の、または神経学的な徴候または症状の1つまたは複数を呈する前に、組成物の投与を行う、請求項67～95のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9 7】

対象が10歳未満である、請求項67～96のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 8】

対象が5歳未満である、請求項97に記載の方法。

【請求項 9 9】

対象が2歳未満である、請求項97に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

その必要のある対象における筋ジストロフィーを処置するための、請求項1～56、60、または66のいずれか一項に記載の組成物の治療有効量の使用。

40

【請求項 1 0 1】

細胞が自己由来である、その必要のある対象における筋ジストロフィーを処置するための請求項60または66に記載の組成物の治療有効量の使用。

【請求項 1 0 2】

細胞が同種異系である、その必要のある対象における筋ジストロフィーを処置するための請求項60または66に記載の組成物の治療有効量の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

優先権の主張

50

本出願は、2016年11月28日に出願された表題「Prevention of Muscular Dystrophy by CRISPR/Cpf1-Mediated Gene Editing」の米国仮特許出願第62/426,853号の優先権を主張するものであり、その開示は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

連邦政府資金支援条項

本発明は、米国立衛生研究所によって授与されたDK-099653およびU54-HD 087351の下で政府支援によってなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子提出された配列表を含み、これは、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。2017年11月28日に作成されたこのASCIIコピーは、UTFD_3124WO.txtという名称が付けられており、189,059バイトサイズである。

10

【0004】

開示の分野

本開示は、分子生物学、医学、および遺伝学の分野に関する。より詳細には、本開示は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）を処置するためのゲノム編集の使用に関する。

【背景技術】

【0005】

背景

20

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、筋細胞膜の完全性に不可欠な大きい細胞骨格タンパク質であるジストロフィンにコードする遺伝子の変異によって引き起こされるX連鎖劣性疾患である。DMDは、進行性の筋衰弱を引き起こし、30歳までに若年死（一般的には心筋症から）に至る。この疾患には有効な処置法がない。組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）による短縮型ジストロフィンまたはユートロフィンの送達ならびにアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび低分子を用いた変異体エクソンのスキッピングを含め、DMDにおけるジストロフィン発現を回復させるための数多くのアプローチが試みられている。しかしながら、これらのアプローチは、DMD変異を修正すること、ジストロフィン発現を永続的に回復させることもできない。したがって、DMD変異を修正してこの疾患の根本原因に対処し、それによってジストロフィン発現を永続的に回復させる、DMDを処置するための組成物および方法が当技術分野において必要とされている。

30

【発明の概要】

【0006】

概要

本開示は、Cpf1ポリペプチドをコードする配列およびDMDガイドRNA（gRNA）をコードする配列を含む組成物であって、DMD gRNAがジストロフィンスプライス部位を標的とし、かつ、DMD gRNAがSEQ ID No.448~770のいずれか1つを含む、組成物を提供する。いくつかの態様において、Cpf1ポリペプチドをコードする配列は、ラクノスピラ科（Lachnospiraceae）のCpf1ポリペプチドをコードする配列から単離されるかまたはそれに由来する。いくつかの態様において、Cpf1ポリペプチドをコードする配列は、アシダミノコッカス（*Acidaminococcus*）のCpf1ポリペプチドをコードする配列から単離されるかまたはそれに由来する。いくつかの態様において、Cpf1ポリペプチドをコードする配列またはDMD gRNAをコードする配列は、RNA配列を含む。いくつかの態様において、RNA配列は、mRNA配列である。いくつかの態様において、RNA配列は、少なくとも1つの化学的に修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、Cpf1ポリペプチドをコードする配列は、DNA配列を含む。

40

【0007】

いくつかの態様において、第一のベクターが、Cpf1ポリペプチドをコードする配列を含み、第二のベクターが、DMD gRNAをコードする配列を含む。いくつかの態様において、第一のベクターまたはCpf1ポリペプチドをコードする配列は、第一のポリA配列をさらに含

50

む。いくつかの態様において、第二のベクターまたはDMD gRNAをコードする配列は、第二のポリA配列をさらに含む。いくつかの態様において、第一のベクターまたは第二のベクターは、検出可能マーカをコードする配列をさらに含む。いくつかの態様において、検出可能マーカは、蛍光マーカである。

【0008】

いくつかの態様において、第一のベクターまたはCpf1ポリペプチドをコードする配列は、第一のプロモーター配列をさらに含む。いくつかの態様において、第二のベクターまたはDMD gRNAをコードする配列は、第二のプロモーター配列をさらに含む。いくつかの態様において、第一のプロモーター配列および第二のプロモーター配列は、同一である。いくつかの態様において、第一のプロモーター配列および第二のプロモーター配列は、同一ではない。いくつかの態様において、第一のプロモーター配列または第二のプロモーター配列は、構成的プロモーターを含む。いくつかの態様において、第一のプロモーター配列または第二のプロモーター配列は、誘導性プロモーターを含む。いくつかの態様において、第一のプロモーター配列または第二のプロモーター配列は、筋細胞特異的プロモーターを含む。いくつかの態様において、筋細胞特異的プロモーターは、ミオシン軽鎖-2プロモーター、 α -アクチンプロモーター、トロポニン1プロモーター、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体プロモーター、ジストロフィンプロモーター、 α 7インテグリンプロモーター、脳性ナトリウム利尿ペプチドプロモーター、B-クリスタリン/低分子量熱ショックタンパク質プロモーター、 β -ミオシン重鎖プロモーター、またはANFプロモーターである。

10

20

【0009】

いくつかの態様において、第一のベクターまたは第二のベクターは、2A様自己切断ドメインをコードする配列をさらに含む。いくつかの態様において、2A様自己切断ドメインをコードする配列は、TaV-2Aペプチドを含む。

【0010】

いくつかの態様において、ベクターは、Cpf1ポリペプチドをコードする配列およびDMD gRNAをコードする配列を含む。複数の態様において、ベクターは、ポリA配列をさらに含む。複数の態様において、ベクターは、プロモーター配列をさらに含む。複数の態様において、プロモーター配列は、構成的プロモーターを含む。さらなる態様において、プロモーター配列は、誘導性プロモーターを含む。複数の態様において、プロモーター配列は、筋細胞特異的プロモーターを含む。いくつかの態様において、筋細胞特異的プロモーターは、ミオシン軽鎖-2プロモーター、 α -アクチンプロモーター、トロポニン1プロモーター、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体プロモーター、ジストロフィンプロモーター、 α 7インテグリンプロモーター、脳性ナトリウム利尿ペプチドプロモーター、B-クリスタリン/低分子量熱ショックタンパク質プロモーター、 β -ミオシン重鎖プロモーター、またはANFプロモーターである。

30

【0011】

複数の態様において、組成物は、哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化された配列を含む。さらなる態様において、組成物は、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化された配列を含む。複数の態様において、Cpf1ポリペプチドをコードする配列は、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化される。

40

【0012】

いくつかの態様において、スプライス部位は、スプライスドナー部位である。いくつかの態様において、スプライス部位は、スプライスアクセプター部位である。

【0013】

さらなる態様において、第一のベクターまたは第二のベクターは、非ウイルスベクターである。複数の態様において、非ウイルスベクターは、プラスミドである。複数の態様において、リボソームまたはナノ粒子は、第一のベクターまたは第二のベクターを含む。

【0014】

複数の態様において、第一のベクターまたは第二のベクターは、ウイルスベクターである。複数の態様において、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターで

50

ある。複数の態様において、AAVベクターは、複製欠損体または条件付き複製欠損性である。複数の態様において、AAVベクターは、組換えAAVベクターである。いくつかの態様において、AAVベクターは、血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、またはそれらの任意の組み合わせのAAVベクターから単離されるかまたはそれに由来する配列を含む。

【0015】

いくつかの態様において、組成物は、一本鎖DMDオリゴヌクレオチドをさらに含む。いくつかの態様において、組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。

【0016】

また、本開示の組成物を含む細胞も提供される。複数の態様において、細胞は、筋細胞、衛星細胞、またはその前駆体である。いくつかの態様において、細胞は、iPSCまたはiCMである。

【0017】

また、本開示の細胞を含む組成物も提供される。

【0018】

また、細胞と本開示の組成物とをCpf1ポリペプチドおよびgRNAの発現に適した条件下で接触させる工程を含むジストロフィン遺伝子欠損を修正する方法であって、Cpf1ポリペプチドがジストロフィンスプライス部位を破壊し、スプライス部位の破壊が変異体DMDエクソンの選択的スキッピングをもたらす方法も提供される。いくつかの態様において、変異体DMDエクソンは、エクソン23である。いくつかの態様において、変異体DMDエクソンは、エクソン51である。複数の態様において、細胞は、インビボ、エクスビボ、インビトロ、またはインサイチューにある。

【0019】

本開示はまた、その必要のある対象における筋ジストロフィーを処置する方法であって、対象に本開示に係る組成物の治療有効量を投与する工程を含む方法も提供する。複数の態様において、組成物は、局所投与される。複数の態様において、組成物は、筋組織に直接投与される。複数の態様において、組成物は、筋肉内注入または注射によって投与される。複数の態様において、筋組織は、前脛骨筋組織、大腿四頭筋組織、ヒラメ筋組織、隔膜組織、または心組織を含む。いくつかの態様において、組成物は、全身投与される。いくつかの態様において、組成物は、静脈内注入または注射によって投与される。

【0020】

複数の態様において、組成物の投与後に、対象は、正常なジストロフィン陽性筋線維、および中心核を含有するモザイクジストロフィン陽性筋線維、またはそれらの組み合わせを示す。いくつかの態様において、組成物の投与後に、対象は、組成物の投与前の正常なジストロフィン陽性筋線維の非存在またはその存在量のレベルと比較して、正常なジストロフィン陽性筋線維の出現またはその存在量のレベルの増加を示す。いくつかの態様において、組成物の投与後に、対象は、組成物の投与前の中心核を含有するモザイクジストロフィン陽性筋線維の非存在またはその存在量のレベルと比較して、中心核を含有するモザイクジストロフィン陽性筋線維の出現またはその存在量のレベルの増加を示す。いくつかの態様において、対象は、組成物の投与前の血清CKレベルと比較して、減少した血清CKレベルを示す。複数の態様において、組成物の投与後に、対象は、組成物の投与前の握力と比較して、改善された握力を示す。

【0021】

いくつかの態様において、方法は、本明細書に開示の組成物の治療有効量を投与する工程を含み、細胞は自己由来である。いくつかの態様において、この方法は、組成物の治療有効量を投与する工程を含み、細胞は同種異系である。

【0022】

複数の態様において、対象は、新生児、幼児、子供、若年成人、または成人である。複数の態様において、対象は、筋ジストロフィーを有する。複数の態様において、対象は、筋ジストロフィーの遺伝的保因者である。いくつかの態様において、対象は、男性である

。いくつかの態様において、対象は、女性である。いくつかの態様において、対象は、無症候性であるように見え、遺伝子診断が、DMD遺伝子産物の機能を損なうDMD遺伝子の一方または両方のコピーにおける変異を明らかにする。いくつかの態様において、対象は、筋ジストロフィーの初期の徴候または症状を呈する。いくつかの態様において、筋ジストロフィーの初期の徴候または症状は、筋肉量の損失または近位筋衰弱を含む。複数の態様において、筋肉量の損失または近位筋衰弱は、一方もしくは両方の足および/または骨盤、続いて、1つまたは複数の上体筋に起こる。複数の態様において、筋ジストロフィーの初期の徴候または症状は、仮性肥大、低持久力、起立困難、歩行困難、および/もしくは階段を上ることが困難、またはそれらの組み合わせをさらに含む。複数の態様において、対象は、筋ジストロフィーの進行性の徴候または症状を呈する。複数の態様において、筋ジストロフィーの進行性の徴候または症状は、筋組織消耗、筋組織が脂肪で置き換えられること、または筋組織が線維性組織で置き換えられることを含む。複数の態様において、対象は、筋ジストロフィーの後期の徴候または症状を呈する。いくつかの態様において、筋ジストロフィーの後期の徴候または症状は、異常な骨発達、脊柱湾曲、運動の消失、および麻痺を含む。複数の態様において、対象は、筋ジストロフィーの神経学的な徴候または症状を呈する。複数の態様において、筋ジストロフィーの神経学的な徴候または症状は、知的障害および麻痺を含む。複数の態様において、組成物の投与は、対象が筋ジストロフィーの1つまたは複数の進行性、後期または神経学的な徴候または症状を呈する前に行う。いくつかの態様において、対象は、10歳未満である。いくつかの態様において、対象は、5歳未満である。いくつかの態様において、対象は、2歳未満である。

10

20

【0023】

本開示はまた、その必要のある対象における筋ジストロフィーを処置するための組成物の治療有効量の使用を提供する。

【0024】

本明細書に記載の任意の方法または組成物を、本明細書に記載の任意の他の方法または組成物に関して遂行できることが想定される。

【0025】

本開示の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本開示の精神および範囲内の様々な変更および改変がこの詳細な説明から当業者に明らかになるので、詳細な説明および具体例は、本開示の具体的な態様を示しながらも、例証の目的で与えられているにすぎないものと理解されるべきである。

30

【図面の簡単な説明】

【0026】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本開示のある特定の局面をさらに実証するために含まれる。本開示は、本明細書に提示される具体的な態様の詳細な説明と組み合わせるこれらの図面の1つまたは複数を参照することによってさらによく理解されるであろう。

【図1】図1A~E. Cpf1媒介性ゲノム編集によるDMD変異の修正。(図1A)エクソン48~50のDMD欠失は、エクソン47~51のスプライシングをもたらす、ジストロフィンのアウトオブフレーム変異を発生させる。Cpf1によるジストロフィン発現の回復のために2つの戦略を使用した。「リフレーミング」戦略では、エクソン51における小さいINDELが、ジストロフィンのタンパク質リーディングフレームを回復させる。「エクソスキッピング」戦略は、エクソン51のスプライスアクセプターの破壊によって達成され、これによって、エクソン47~52のスプライシングおよびタンパク質リーディングフレームの回復をもたらされる。(図1B)イントロンの3'端は、トリッチであり、これがCpf1によるゲノム切断を可能にするCpf1 PAM配列を生成する。(図1C)DMDエクソン51を標的とするCpf1 gRNAの図示。トリッチPAM(赤線)は、スプライスアクセプター部位近くのエクソン51の上流に位置する。エクソン51を標的とするCpf1 g1 gRNAの配列を示し、相補的ヌクレオチドを青色で強調している。Cpf1切断は、PAM部位より遠位の突出末端を生じる(赤色の矢印によって区切られている)。エクソン51の5'領域を明るい青色で網掛けしている。エクソン配列は大

40

50

文字である。イントロン配列は小文字である。(図1D)核局在化シグナル(NLS)および2A-GFPを有するヒトコドン最適化Cpf1(hCpf1)をコードするプラスミドの図示。プラスミドは、U6プロモーターによって駆動されるCpf1 gRNAもコードする。このプラスミドをトランスフェクトした細胞は、GFPを発現し、これによってFACSによるCpf1発現細胞の選択が可能になる。(図1E)LbCpf1またはAsCpf1、gRNA、およびGFPを発現するプラスミドをトランスフェクトしたヒト293T細胞またはDMD iPSC(RIKEN51)を使用したT7E1アッセイは、DMDエクソン51でのゲノム切断を示す。赤色の矢印は切断産物を指す。M、マーカー。

【図2】図2A~I. DMD iPSC由来心筋細胞は、リフレーミングによるCpf1媒介性ゲノム編集後にジストロフィンを発現する。(図2A)DMD皮膚線維芽細胞由来iPSCを、gRNAを使用してCpf1によって編集し(修正されたDMD-iPSC)、次いで、DMD変異の遺伝子修正の分析のために心筋細胞へと分化させた(修正された心筋細胞)。(図2B)エクソン48~50のDMD欠失は、エクソン47~51のスプライシングをもたらし、ジストロフィンのアウトオブフレーム変異を発生させる。エクソン47を標的とするフォワードプライマー(F)およびエクソン52を標的とするリバースプライマー(R)をRT-PCRにおいて使用して、心筋細胞におけるCpf1媒介性ゲノム編集によるリフレーミング戦略を確認した。未修正の心筋細胞は、エクソン48~50を欠いている。対照的に、リフレーミング後、エクソン51は、エクソン47とインフレームに戻る。(図2C)代表的なRT-PCR産物の配列決定は、未修正のDMD iPSC由来心筋細胞が、エクソン51に、ナンセンス変異を生じる中途停止コドンをもつことを示す。Cpf1媒介性リフレーミング後、ジストロフィンのORFが回復する。赤色の破線はエクソン境界を表す。(図2D)ウエスタンブロット分析は、LbCpf1またはAsLpf1とg1 gRNAでのリフレーミングによって編集されたDMD iPSC由来心筋細胞の混合物におけるジストロフィン発現を示す。クローン選択なしでも、Cpf1媒介性リフレーミングは、心筋細胞混合物においてジストロフィン発現を回復させるのに効率的かつ十分である。MHCはローディングコントロールである。(図2E)免疫細胞化学は、LbCpf1またはAsCpf1媒介性リフレーミング後のiPSC由来心筋細胞(CM)混合物におけるジストロフィン発現を示す。ジストロフィン染色(赤色);トロポニンI染色(緑色)。スケールバー=100ミクロン。(図2F)ウエスタンブロット分析は、LbCpf1媒介性リフレーミング後のクローン選択に続くiPSC由来心筋細胞の単一クローン(#2および#5)におけるジストロフィン発現を示す。MHCはローディングコントロールである。(図2G)クローン#2のLbCpf1編集iPSC由来心筋細胞におけるジストロフィン発現を示す免疫細胞化学。スケールバー=100ミクロン。(図2H)LbCpf1編集iPSC由来心筋細胞の単一クローン(#2および#5)におけるミトコンドリアDNAのコピー数の定量。データを平均±SEM(n=3)として表す。(&)P<0.01; (#)P<0.005; (ns)有意でない。(図2I)LbCpf1編集iPSC由来心筋細胞の単一クローン(#2および#5)の基礎酸素消費率(OCR)、ならびに、細胞数に対して正規化された、オリゴマイシン、FCCP、ならびにロテノンおよびアンチマイシンAに反応するOCR(各試験につき左から右への順序は、図2Hと同じである)。データを平均±SEM(n=5)として表す。(*)P<0.05; (&)P<0.01; (#)P<0.005; (ns)有意でない。

【図3】図3A~H. DMD iPSC由来心筋細胞は、Cpf1媒介性エクソンスキッピング後にジストロフィンを発現する。(図3A)イントロン50を標的とする2つのgRNA:いずれかのgRNA(g2またはg3)、およびエクソン51を標的とする他のもの(g1)を使用して、エクソン51スプライスアクセプター部位のCpf1媒介性除去を指示した。(図3B)LbCpf1およびgRNA2(g2)またはgRNA3(g3)をトランスフェクトした293T細胞を使用したT7E1アッセイは、イントロン50でのDMD遺伝子座の切断を示す。赤色の矢印は切断産物を表す。M、マーカー。(図3C)LbCpf1、g1+g2、およびGFPを発現するプラスミドをトランスフェクトしたDMD-iPSCから単離されたゲノムDNAのPCR産物。下方のバンド(赤色の矢印)は、エクソン51スプライスアクセプター部位の除去を示す。(図3D)パネルcからの下方のPCRバンドの配列は、イントロン50の3'端からエクソン51の5'端に及ぶ200bpの欠失を示す。このことは、エクソン51の「ag」スプライスアクセプターの除去を裏付ける。未修正の対立遺伝子の配列を、LbCpf1編集対立遺伝子の配列の上に示す。(図3E)図2Bに記載のプライマーセットを使用したiPSC由来心筋細胞のRT-PCR。WTレーンにおける700bpバンドは、エクソン47~52か

らのジストロフィン転写物であり；未修正レーンにおける300bpバンドは、エクソン48～50が欠失したエクソン47～52からのジストロフィン転写物であり；g1+g2混合物レーン（LbCpf1によって編集された）における下方のバンドは、エクソン51スキッピングを示す。（図3F）パネルeからの下方のバンド（g1+g2混合物レーン）の配列は、DMD ORFをリフレーミングしたエクソン51のスキッピングを裏付ける。（図3G）ウエスタンブロット分析は、g1+g2を用いたLbCpf1によるエクソン51スキッピング後のiPSC由来心筋細胞混合物におけるジストロフィンタンパク質発現を示す。MHCはローディングコントロールである。（図3H）免疫細胞化学は、g1+g2 gRNAを用いたCpf1媒介性エクソンスキッピング後のiPSC由来心筋細胞混合物（CM）におけるジストロフィン発現をWTおよび未修正CMと比較して示す。ジストロフィン染色（赤色）。トロポニンI染色（緑色）。スケールバー=100ミクロン。

10

【図4】図4A～D. マウスDMD遺伝子のエクソン23のCRISPR-Cpf1媒介性編集。（図4A）エクソン23での変異を強調したマウスDmd遺伝子座の図示。配列は、中途停止コドンを生み出すCからTへの転換によって引き起こされるナンセンス変異を示す。（図4B）Dmd遺伝子のエクソン23上のgRNA（g1、g2、およびg3）の標的位置（明るい青色で示される）の図示。赤線はLbCpf1 PAMを表す。（図4C）エクソン23を標的とする異なるgRNA（g1、g2、またはg3）と共にLbCpf1またはAsCpf1をトランスフェクトしたマウス10T1/2細胞を使用したT7E1アッセイは、LbCpf1およびAsCpf1がDmdエクソン23遺伝子座で異なる切断効率を有することを示す。赤色の矢印は、ゲノム編集の切断産物を示す。M、マーカー。（図4D）Dmdエクソン23を標的とするLbCpf1媒介性gRNA（g2）の図示。赤色の矢印は切断部位を示す。ssODN HDR鋳型は、mdx修正、4つのサイレント変異（緑色）、およびTseI制限部位（下線）を含有する。

20

【図5】図5A～F. mdxマウスにおけるCRISPR-LbCpf1媒介性Dmd修正。（図5A）LbCpf1媒介性の生殖細胞系の編集によるmdxマウスにおける遺伝子修正戦略。mdx親の交雑受精由来の接合体に、遺伝子編集成分（LbCpf1 mRNA、g2 gRNA、およびssODN）を注射し、偽妊娠母体に再移植し、それが遺伝子修正（mdx-C）を持つ仔を生んだ。（図5B）HDRまたはNHEJによるmdx対立遺伝子のLbCpf1修正の図示。（図5C）LbCpf1編集mdxマウスのジェノタイピング結果。上部パネルは、T7E1アッセイを示す。青色の矢印は、切断されていないDNAを表し、赤色の矢印は、T7E1切断されたDNAを示す。下部パネルは、TseI RFLPアッセイを示す。青色の矢印は、未修正DNAを表す。赤色の矢印は、HDR修正を示すTseI切断を指す。mdx-C1～C5は、LbCpf1編集mdxマウスを表す。（図5D）上部パネルは、WT Dmdエクソン23の配列を示す。中央のパネルは、停止コドンを生み出すCからTへの変異を有するmdx Dmdエクソン23の配列を示す。下部パネルは、LbCpf1媒介性編集によるHDR修正を有するDmdエクソン23の配列を示す。黒色の矢印は、ssODN HDR鋳型によって導入されたサイレント変異を指す。（図5E）WT、mdxおよびLbCpf1編集マウス（mdx-C）由来の前脛骨筋（TA）および腓腹筋/足底筋（G/P）のH&E。（図5F）ジストロフィン（赤色）に対する抗体を使用した、WT、mdx、およびLbCpf1編集マウス（mdx-C）由来のTA筋肉およびG/P筋肉の免疫組織化学。mdx筋肉は線維化および炎症性浸潤を示したが、mdx-C筋肉は正常な筋肉構造を示した。

30

【図6】図6A～C. LbCpf1またはAsCpf1によるDMDエクソン51でのゲノム編集。（図6A）g1を使用してLbCpf1またはAsCpf1によって編集されたDMD患者（RIKEN 51）皮膚線維芽細胞由来iPSCの混合物からのDMDエクソン51のDNA配列決定。個々の編集されたDMD対立遺伝子の配列を、未修正のDMD対立遺伝子の下に示す。はヌクレオチド欠失を表す。（図6B）g1を使用してLbCpf1またはAsCpf1によって編集されたDMD患者皮膚線維芽細胞由来iPSCの単一クローンからのDMDエクソン51のDNA配列決定。（図6C）g2またはg3を用いたLbCpf1編集後の10T1/2細胞のPCR産物のDNA配列決定。WT配列は上部にあり、INDEL配列は下部にある。

40

【図7】図7A～B. WT、mdx、およびLbCpf1編集マウス（mdx-C）由来の筋肉の組織学的分析。（図7A）前脛骨筋（TA）全体の免疫組織化学およびH&E染色。ジストロフィン染色は赤色である。（図7B）腓腹筋/足底筋（G/P）全体の免疫組織化学およびH&E染色。ジストロフィン染色は赤色である。

50

【発明を実施するための形態】

【0027】

詳細な説明

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、遺伝的原因による他の多くの疾患と同様に、困難な治療シナリオを提示する。CRISPR-Casシステムは、多様な遺伝的欠陥の修正のためのアプローチを示す。CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復) システムは、ファージ感染を防御する細菌および古細菌の適応免疫系として機能する。このシステムでは、単一ガイドRNA (sgRNA) によってエンドヌクレアーゼが特異的なゲノム配列にガイドされ、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列の近くのDNA切断をもたらす。以前は、CRISPR-Cas9を使用して、マウスおよびヒト細胞においてDMD変異を修正していた。しかしながら、多くの課題が対処されずに残っている。例えば、これまで最も広く使用されてきたCas9エンドヌクレアーゼである化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) のCas9 (SpCas9) は、ATリッチ領域のゲノム編集を許容しないGリッチPAM要件 (NGG) を有する。加えて、SpCas9の大きなサイズは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターなどの小容量ウイルスベクターへのパッケージングおよび送達の効率を低減する。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由来のCas9エンドヌクレアーゼ (SaCas9) は、SpCas9よりもサイズは小さいが、より長くかつより複雑なPAM配列 (NNGRRT) を有し、したがって、そのゲノム標的の範囲を制限している (Ran et al., 2015)。認識配列の柔軟性がより大きくかつ切断効率が同程度のより小さいCRISPR酵素が、とりわけ翻訳用途に対して、正確な遺伝子編集を容易にするであろう。

10

20

【0028】

本開示によって実証される通り、Cpf1 (CRISPR from *Prevotella* and *Francisella* 1、プレボテラおよびフランシセラ1由来のCRISPR) と呼ばれるRNAガイドエンドヌクレアーゼは、哺乳動物のゲノム切断に有効である。Cpf1は、Cas9と比べて、そのゲノム編集潜在性を引き出すいくつかのユニークな特徴を有する：Cpf1媒介性切断は、単一で短いcrRNA (gRNAと略される) によってガイドされるが、Cas9媒介性切断は、CRISPR RNA (crRNA) と長いトランス活性化crRNA (tracrRNA) のハイブリッドによってガイドされる。Cpf1は、プロトスペーサーの5'端のトリッチPAMを好む一方で、Cas9は、標的配列の3'端のGリッチPAMを必要とする。Cpf1媒介性切断は、PAM部位より遠位の付着末端を生じ、これがDNA修復機構を活性化するが、Cas9切断は平滑末端を生じる。Cpf1はまた、前駆体crRNAをプロセシングしてcrRNAへと成熟させることができるRNase活性を有する。Cas9と同じく、Cpf1は、標的とするゲノム部位に結合して、二本鎖切断 (DSB) を生じ、これが次いで、非相同末端結合 (NHEJ) によって、または外因性鋳型が提供される場合には相同組換え修復 (HDR) によって修復される。本開示よりも前に、Cas9を超えるCpf1の有意性が認められたことも、疾患の哺乳動物細胞および動物モデルにおける遺伝子変異の修正にCpf1の使用が実証されたこともない。ここで、本発明者らは、Cpf1が、異なる戦略によってDMD変異を永続的に修正し、それによってジストロフィン発現を回復してこの疾患の進行を防止する、堅固で効率的なRNAガイドゲノム編集システムを提供することを示す。これらの知見は、ヒト遺伝子変異の永続的な修正のための新たなアプローチを提供する。本開示のこれらのおよび他の局面を以下に再現する。

30

40

【0029】

I. デュシェンヌ型筋ジストロフィー

A. 背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、男児のおよそ3,500人に1人が罹患する、筋肉変性および早期死亡をもたらす劣性X連鎖型の筋ジストロフィーである。この障害は、以下に再現する配列のタンパク質ジストロフィン (GenBankアクセッション番号AAA53189; SEQ ID NO.383) をコードする、ヒトX染色体上に位置する遺伝子ジストロフィン (GenBankアクセッション番号NC_000023.11を参照のこと) の変異によって引き起こされる。

```

1  mlwweevedc yeredvqkkt ftkwvnaqfs kfgkqhienl fsdlqdgrrl ldlllegltgq
61 klpkekqgstr vhalnnvnka lrvlqnnnvd lvnigstdiv dgnhkltlgl iwniilhwqv
121 knvmknimag lqqttnsekil lswvrqstrn ypqvvninft tswsdglaln alihshrpdl
181 fdwnsvvcqg satqrlehaf niaryqlgie klldpedvdt typdkksilm yitslfqvlp
241 qqvsieaige vemlrpppkv tkeehfqlhh qmhysqqitv slaqgyerts spkprfksya
301 ytqaayvtts dpttrspfpsq hleapedksf gsslmesevn ldryqtalee vlswwllsaed
361 tlqaaggeisn dvevvdqfth thegyimldt ahqgrvgnil qlgskligtg klsedeetev
421 qeqmnlinsr weclrvasme kqsnlhrvml dlqnqklkel ndwltkter trkmeeeplg
481 pdledlkrqv qqhkvqlqdl egeqvrnsnl thmvvvvdes sgdhataale eqklvlgdrw
541 anicrwtedr wvllqdillk wqrlteeqcl fsawlseked avnkihttgf kdqnemlssl
601 qklavlkadl ekkkqsmgkl yslkqdllst lknksvtqkt eawldnfarc wdnlvqklek
661 staqisqavt ttqpsltqtt vmetvttvtv reqilvkhaq eelpppppqk krqitvdsei
721 rkrlldvdite lhwitrsea vlqspfaif rkegnfsdlk ekvnaierk aekfrklqda
781 srsaqalveg mvnegvnads ikqaseqlns rwiefcqls erlnwleyqn niiafynqlq
841 qlqemtttae nwlkiqpttp septaiksqli kickdevnrl sglqpqierl kigsialkek
901 gggpmfldad fvaftnhfkq vfsdvqarek elqtifdtlp pmryqetmsa irtwvqqset
961 klsipqlsvt dyeimeqrlg elqalqsslq eqqsglyyls ttvkemskka pseisrkyqs
1021 efeeiegrwk klssqlvehc qkleeqmnlk rkiqnhiqtl kkwwaevdvf lkeewpalgd
1081 seilkkqlkq crllvsdiqt iqpslnsvne ggqkikneae pefasrlete lkelntqwdh
1141 mcqqvyarke alkqglektv slqkdlseml ewmtqaeey lerdfeyktp delqkaveem
1201 krakeeaqqk eakvklites vnsviaqapp vagealkkel etlttnyqwl ctrlngkckt
1261 leevwacwhe llsylekank wlnevefklk ttenipggae eisevldsle nlmrhsednp
1321 nqirilaqtl tdggvmdeli neeletfnsr wrelheeavr rqklleqsiq saqeteeslh
1381 lqeslftfid kqlaayiadk vdaaqmpqea qkqsdlts h eisleemkhh nqgkkaaqr
1441 lsqidvaqkk lqdvsmkfrl fqkpanfelr lqeskmilde vkmhlpalet ksveqevvqs
1501 qlnhcvnlyk slsevkseve mviktgrqiv qkkqtenpke ldervtalkl hynelgakvt
1561 erkqqlekcl klsrkmrkem nvltewlaat dmeltkrsav egmpsnldse vawgkatqke
1621 iekqkvhlks itevgealkt vlqkktlve dksllnsnw iavtsraeew lnlileyqkh
1681 metfdqnvdh itkwiiqadt lldesekkkp qkqevlkr l kaelndirpk vdstrdqaan
1741 lmanrgdhcr klvepqisel nhrfaaishr iktgkasipl keleqfnsdi qkllepleae
1801 iqggvnkee dfnkdmnedn egtvkellqr gdnlqqritd erkreeikik qqlqltkhna
1861 lkdlrsqrk kaleishqwy qykrqadll kclddiekl aslpeprder kikeidrelq
1921 kkeeklnavr raeaglsedg aamaveptqi qlskrwreie skfaqfrln faqihntvree
1981 tmmvmtedmp leisyvpsty lteithvsqa lleveqllna pdlcakdfed lfkeeslkn
2041 ikdslqqssg ridihskkk aalqsatpve rvklqealsq ldfqwekvk mykdrqgrfd
2101 rsvekwrrfh ydikifnqwl teaeqflrkt qipenwehak ykwylkelqd gigqrqtvv
2161 tlnatgeeii qqssktasi lqeklgslnl rwqevckqls drkkrlleeq nilsefqrld
2221 nefvlwleea dniasiplep gkeqqlkek elqkllveel plrqgilkql netgppvlvs
2281 apispeegek lenklkqtnl qwikvsralp ekqgeieaqi kdlgqlekkl edleeqlnhl
2341 llwlspirng leiynqpqge gpfdvqetei avqakqpde eilskgqhly kekpatqpvk
2401 rkledlssew kavnrllqel rakqpdlapg lttigasptq tvtlvtqpvv tketaiskle
2461 mpsslmlevp aladfnrawt eltdwlslld qvksqrvmv gdledinemi ikqkatmqdl
2521 eqrrpgleel itaaqnlknk tsnqeartii tdrieriqnq wdevqehlqn rrqqlnemlk
2581 dstqwleake eaeqvlqgar akleswkegp ytvdaikki tetkqlakdl rqwqtnvdva
2641 ndlalklld ysaddtrkvh miteninasw rsihkrvser eaaleethrl lqqfpldlek
2701 flawlteaet tanvlqdatr kerlledskg vkelmkqwqd lqgeieahd vyhnlensq
2761 kilrslegsd davllqrrld nmnfkwse l kkslnirshl eassdqwkrl hlsllqellvw
2821 lqlkddelsr qapiggdfpa vqkqndvhra fkrelktkep vimstletvr iflteqpleg
2881 leklyqepre lppeeraqnv trllrkqae vnteweklnl hsadwqrkid etlerlqelq
2941 eatdeldkl rqaevikgsd qpvgdllids lqdhlekva lrgeiaplke nvshvndlar
3001 qlttlgiqls pynlstledl ntrwkllqva vedrvqlhe ahrdfgpasq hflstsvqgp
3061 weraispnkv pyyinhetqt tcwdhpkmtc lyqsladlnn vrfsayrtam klrrlqkalc
3121 ldllslsaac daldqhnkq ndqpmdilqi incltitydr leqehnnlvn vplcvdmcln
3181 wllnvdytgr tgrirvlsfk tgiislckah ledkyrylfk qvasstgfc qrrlglllhd
3241 siqiprqlge vasfggsnie psvrscfqa nnkpeieaal fldwmrlep smvwlplvhr
3301 vaaaetakhq akcnicecp iigfryrslk hfnydicqsc ffsgrvakgh kmhympveyc
3361 tpttsgedvr dfakvlknkf rtkryfakhp rmgylpvqtv legdnmetpv tlinfwpvds
3421 apasspqlsh ddthsrlehy asrlaemens ngsylndsis pnesiddehl liqhycqsln
3481 qdsplsqprs paqilisles eergeleril adleeenrnl qaeaydrkqg hehkgslplp
3541 sppemtpsp qsprdaelia eakllrqhkg rlearnqile dhnkqlesql hrlrlleqp
3601 qaeakvngtt vsspstslqr sdssqpmllr vvgqtsdsm geedllsppq dtstgleevm
3661 eqlnnsfpss rgrrtpgkpm redtm

```

10

20

30

40

【0030】

ヒトでは、ジストロフィンmRNAは、79のエクソンを含有する。ジストロフィンmRNAは、選択的にスプライシングされ、様々なアイソフォームをもたらすことが知られている。例示的なジストロフィンアイソフォームを表1に列挙する。

50

【 0 0 3 1 】

ヒトでは、ジストロフィンmRNAは、79のエクソンを含有する。ジストロフィンmRNAは、選択的にスプライシングされ、そのタンパク質の様々なアイソフォームをもたらすことが知られている。例示的なジストロフィンアイソフォームを表1に列挙する。

【 0 0 3 2 】

(表1) ジストロフィンアイソフォーム

配列名*	核酸 アクセッション番号*	核酸 SEQ ID NO:	タンパク質 アクセッション番号*	タンパク質 SEQ ID NO:	説明
DMD ゲノム配列	NC_000023.11 (位置 31119219 ~ 33339609)	なし	なし	なし	アセンブリGRCh38. p7 (GCF_000001405.33) からの ヒトX染色体由来の 配列 (位置Xp21.2~ p21.1)
ジストロフィン Dp427c アイソフォーム	NM_000109.3	384	NP_000100.2	385	転写物バリエーション: 転写物Dp427cは、 皮質のニューロンおよび 海馬のCA領域で 優位に発現される。

配列名 *	核酸 アクセッション番号*	核酸 SEQ ID NO:	タンパク質 アクセッション番号*	タンパク質 SEQ ID NO:	説明
					それは、Dp427m転写物 プロモーターの 約130kb上流に位置する ユニークな プロモーター/エクソン1 を使用する。転写物は、 転写物Dp427mの 共通エクソン2を含み、 14 kbの同様の長さを 有する。Dp427c アイソフォームは、 アイソフォームDp427mの MLWWEVEDCY (SEQ ID NO:3) 配列の 代わりに、ユニークな N末端MED配列を 含有する。 アイソフォームDp427cの 残部は、アイソフォーム Dp427mと同一である。
ジストロフィン Dp427m アイソフォーム	NM_004006.2	386	NP_003997.1	387	転写物バリエーション： 転写物Dp427mは、 筋肉に見いだされる 主要ジストロフィン タンパク質をコードする。 代替プロモーターの 使用の結果として、 エクソン1は、 ユニークなN末端 MLWWEVEDCY (SEQ ID NO:3) aa配列 をコードする。
ジストロフィン Dp427p1 アイソフォーム	NM_004009.3	388	NP_004000.1	389	転写物バリエーション： 転写物Dp427p1は、 転写物Dp427mの最初の イントロンに 対応するものに位置する ユニークな プロモーター/エクソン1 から開始する。 転写物は、Dp427mの 共通エクソン2を加え、 同様の長さ(14kb) を有する。Dp427p1 アイソフォームは、 MLWWEVEDCY (SEQ ID NO:3)-Dp427mの 開始を、ユニークな N末端MSEVSSD (SEQ ID NO:8) aa配列 と置き換える。
ジストロフィン Dp260-1 アイソフォーム	NM_004011.3	390	NP_004002.2	391	転写物バリエーション： 転写物Dp260-1は、 エクソン30～79を 使用し、

10

20

30

40

配列名*	核酸 アクセッション番号*	核酸 SEQ ID NO:	タンパク質 アクセッション番号*	タンパク質 SEQ ID NO:	説明
					ジストロフィン遺伝子のイントロン29に位置するプロモーター/エクソン1配列から生じる。結果として、Dp260-1は、完全長ジストロフィン産物 (Dp427mアイソフォーム) のアミノ酸1~1357と置き換わるユニークなN末端16 aa MTEILLIFFPAYFLN配列をコードする95bpエクソン1を含有する。
ジストロフィン Dp260-2 アイソフォーム	NM_004012.3	392	NP_004003.1	393	転写物バリエーション：転写物Dp260-2は、選択的にスプライシングされ、完全長ジストロフィン (Dp427mアイソフォーム) のN末端アミノ酸1~1357を欠いている。ジストロフィン遺伝子のイントロン29に位置するプロモーター/エクソン1配列から開始する、エクソン30~79を使用する。Dp260-2転写物は、ユニークなN末端MSARKLRNLSYKK配列をコードする。
ジストロフィン Dp140 アイソフォーム	NM_004013.2	394	NP_004004.1	395	転写物バリエーション：Dp140転写物は、イントロン44に位置するプロモーター/エクソン1で開始するエクソン45~79を使用する。Dp140転写物は、エクソン51 (ジストロフィンのaa 2461に対応する) で翻訳が開始されるので、長い(1kb)5' UTRを有する。代替プロモーターおよびエクソン1に加えて、エクソン71~74および78の差次的スプライシングにより、少なくとも5つのDp140アイソフォームが生じる。これらのうち、この転写物 (Dp140) は、それらのエクソン全てを含有する。
ジストロフィン Dp116 アイソフォーム	NM_004014.2	396	NP_004005.1	397	転写物バリエーション：転写物Dp116は、イントロン55内のプロモーター/エクソン1から開始するエクソン56~79を使用する。

10

20

30

40

配列名*	核酸 アクセッション番号*	核酸 SEQ ID NO:	タンパク質 アクセッション番号*	タンパク質 SEQ ID NO:	説明
					結果として、Dp116 アイソフォームは、 ジストロフィンのaa 1～ 2739の代わりに、 ユニークなN末端 MLHRKTYHVK aa配列を 含有する。差次的 スプライシングにより、 いくつかのDp116サブ タイプが生じる。Dp116 アイソフォームはまた、 S-ジストロフィンまたは apo-ジストロフィン-2 としても知られる。
ジストロフィン Dp71 アイソフォーム	NM_004015.2	398	NP_004006.1	399	転写物バリエーション: Dp71 転写物は、17ntの新たな コード配列のためのATG 開始部位を含有する 新規の80～100ntエクソン と共にエクソン63～79を 使用する。短いコード 配列は、エクソン63 からの連続的な ジストロフィン配列と インフレームにある。 エクソン71および78の 差次的スプライシング により、少なくとも4つの Dp71アイソフォームが 生じる。これらのうち、 この転写物 (Dp71) は、 エクソン71および78の 両方を含む。
ジストロフィン Dp71b アイソフォーム	NM_004016.2	400	NP_004007.1	401	転写物バリエーション: Dp71 転写物は、17ntの新たな コード配列のためのATG 開始部位を含有する 新規の80～100nt エクソンと共にエクソン 63～79を使用する。 短いコード配列は、 エクソン63からの 連続的なジストロフィン 配列とインフレーム にある。エクソン71 および78の差次的 スプライシングにより、 少なくとも4つのDp71 アイソフォームが生じる。 これらのうち、この 転写物 (Dp71b) は、 エクソン78を欠いており、 Dp71およびDp71a アイソフォームとは 異なるC末端を有する タンパク質をコードする。
ジストロフィン Dp71a アイソフォーム	NM_004017.2	402	NP_004008.1	403	転写物バリエーション:

10

20

30

40

配列名 *	核酸 アクセッション番号*	核酸 SEQ ID NO:	タンパク質 アクセッション番号*	タンパク質 SEQ ID NO:	説明
					Dp71転写物は、17ntの新たなコード配列のためのATG開始部位を含有する新規の80～100ntエクソンと共にエクソン63～79を使用する。短いコード配列は、エクソン63からの連続的なジストロフィン配列とインフレームにある。エクソン71および78の差次的スプライシングにより、少なくとも4つのDp71アイソフォームが生じる。これらのうち、この転写物 (Dp71a) は、エクソン71を欠く。
ジストロフィン Dp71ab アイソフォーム	NM_004018.2	404	NP_004009.1	405	転写物バリエーション: Dp71 転写物は、17ntの新たなコード配列のためのATG開始部位を含有する新規の80～100ntエクソンと共にエクソン63～79を使用する。短いコード配列は、エクソン63からの連続的なジストロフィン配列とインフレームにある。エクソン71および78の差次的スプライシングにより、少なくとも4つのDp71アイソフォームが生じる。これらのうち、この転写物 (Dp71ab) は、エクソン71および78の両方を欠いており、アイソフォームDp71bのようなC末端を有するタンパク質をコードする。
ジストロフィン Dp40 アイソフォーム	NM_004019.2	406	NP_004010.1	407	転写物バリエーション: 転写物Dp40は、エクソン63～70を使用する。5'UTRおよびコードされた最初の7 aaは、転写物Dp71におけるものと同一であるが、停止コドンはエクソン/イントロン70のスプライスジャンクションにある。3'UTRは、代替ポリアデニル化部位を含むイントロン70からのntを含む。Dp40アイソフォームは、完全長ジストロフィンの正常なC末端 (aa 3409～3685) を欠く。

10

20

30

40

配列名*	核酸 アクセッション番号*	核酸 SEQ ID NO:	タンパク質 アクセッション番号*	タンパク質 SEQ ID NO:	説明
ジストロフィン Dp140c アイソフォーム	NM_004020.3	408	NP_004011.2	409	転写物バリエーション: Dp140 転写物は、イントロン44 に位置するプロモーター/ エクソン1で開始する エクソン45～79を 使用する。Dp140転写物は、 エクソン51 (ジストロフィンのaa 2461 に対応する) で翻訳が 開始されるので、長い (1kb) 5' UTRを有する。 代替プロモーターおよび エクソン1に加えて、 エクソン71～74および78の 差次的スプライシング により、少なくとも5つの Dp140アイソフォームが 生じる。これらのうち、 この転写物 (Dp140c) は、 エクソン71～74を欠く。
ジストロフィン Dp140b アイソフォーム	NM_004021.2	410	NP_004012.1	411	転写物バリエーション: Dp140 転写物は、イントロン44 に位置するプロモーター/ エクソン1で開始する エクソン45～79を 使用する。Dp140転写物は、 エクソン51 (ジストロフィンのaa 2461 に対応する) で翻訳が 開始されるので、長い (1kb) 5' UTRを有する。 代替プロモーターおよび エクソン1に加えて、 エクソン71～74および78の 差次的スプライシング により、少なくとも5つの Dp140アイソフォームが 生じる。これらのうち、 この転写物 (Dp140b) は、 エクソン78を欠いており、 ユニークなC末端を有する タンパク質をコードする。
ジストロフィン Dp140ab アイソフォーム	NM_004022.2	412	NP_004013.1	413	転写物バリエーション: Dp140 転写物は、イントロン44に 位置するプロモーター/ エクソン1で開始する エクソン45～79を 使用する。Dp140転写物は、 エクソン51 (ジストロフィンのaa 2461 に対応する) で翻訳が 開始されるので、長い (1kb) 5' UTRを有する。

10

20

30

40

配列名*	核酸 アクセッション番号*	核酸 SEQ ID NO:	タンパク質 アクセッション番号*	タンパク質 SEQ ID NO:	説明
					代替プロモーターおよび エクソン1に加えて、 エクソン71~74および78の 差次的スプライシング により、少なくとも5つの Dp140アイソフォームが 生じる。これらのうち、 この転写物 (Dp140ab) は、 エクソン71および78を 欠いており、ユニークな C末端を有する タンパク質をコードする。
ジストロフィン Dp140bc アイソフォーム	NM_004023.2	414	NP_004014.1	415	転写物バリエーション: Dp140 転写物は、イントロン44 に位置するプロモーター/ エクソン1で開始する エクソン45~79を 使用する。Dp140転写物は、 エクソン51(ジストロフィンの aa 2461に対応する)で 翻訳が開始されるので、 長い(kb) 5'UTRを有する。 代替プロモーターおよび エクソン1に加えて、 エクソン71~74および78の 差次的スプライシング により、少なくとも5つの Dp140アイソフォームが 生じる。これらのうち、 この転写物 (Dp140bc) は、 エクソン71~74および78を 欠いており、ユニークな C末端を有する タンパク質をコードする。
ジストロフィン アイソフォームX2	XM_006724469.3	416	XP_006724532.1	417	
ジストロフィン アイソフォームX5	XM_011545467.1	418	XP_011543769.1	419	
ジストロフィン アイソフォームX6	XM_006724473.2	420	XP_006724536.1	421	
ジストロフィン アイソフォームX8	XM_006724475.2	422	XP_006724538.1	423	
ジストロフィン アイソフォームX4	XM_017029328.1	424	XP_016884817.1	425	
ジストロフィン アイソフォームX1	XM_006724468.2	426	XP_006724531.1	427	
ジストロフィン アイソフォームX13	XM_017029331.1	428	XP_016884820.1	429	
ジストロフィン アイソフォームX3	XM_006724470.3	430	XP_006724533.1	431	
ジストロフィン アイソフォームX7	XM_006724474.3	432	XP_006724537.1	433	
ジストロフィン アイソフォームX9	XM_011545468.2	434	XP_011543770.1	435	
ジストロフィン アイソフォームX11	XM_017029330.1	436	XP_016884819.1	437	
ジストロフィン アイソフォームX10	XM_017029329.1	438	XP_016884818.1	439	
ジストロフィン アイソフォームX12	XM_011545469.1	440	XP_011543771.1	441	

【 0 0 3 3 】

ジストロフィン は、細胞膜のジストログリカン複合体 (DGC) に構造的安定性を提供する

10

20

30

40

50

る、筋組織内の重要な成分である。どちらの性別も変異を保有し得るが、女性は骨格筋形態の疾患の影響を受けることはめったにない。

【0034】

B. 症状

症状は、通常、2～3歳の男児に現れ、早期幼児期に見られることもある。早期幼児期まで症状が現れなくても、検査室試験により、出生時に活性変異を保有する子供を特定することができる。筋肉量の損失に関連する脚および骨盤の進行性の近位筋衰弱が最初に観察される。最終的に、この衰弱は、腕、首、および他の領域に広がる。初期の徴候は、仮性肥大（ふくらはぎおよび三角筋の腫脹）、低持久力、および、助けなしで起立することが困難、または階段を上ることができないことを含み得る。病状が進行するにつれて、筋組織は、消耗を経験し、最終的には脂肪および線維性組織に置き換えられる（線維症）。10歳までに歩行を補助するために支持具が必要となることがあり、ほとんどの患者は、12歳までに車椅子に頼る。その後の症状は、脊椎湾曲を含め、骨格の変形を導く異常な骨発達を含み得る。進行性の筋肉劣化に起因して、運動の消失が起こり、最終的に麻痺に至る。知的障害が存在する可能性も、存在しない可能性もあるが、存在しても、子供が年を取るにつれて次第に悪化することはない。DMDに罹患している男性の平均余命は25歳前後である。

10

【0035】

進行性の神経筋障害であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの主な症状は、筋肉消耗に伴う筋衰弱であり、随意筋、とりわけ臀部、骨盤領域、大腿部、肩部、およびふくらはぎの随意筋が最初に侵される。筋衰弱はまた、後に、腕、首、および他の領域でも生じる。ふくらはぎが腫脹することが多い。症状は、通常、6歳より前に現れ、早期幼児期に現れることもある。他の身体症状は以下のとおりである。

20

- ・ぎこちない歩き方、足踏み方、または走り方（患者は、ふくらはぎの筋肉緊張の増大のため、足の前部で歩く傾向がある。また、つま先歩きは、膝伸筋の衰弱に対する代償的適応である。）

- ・頻繁な転倒

- ・疲労

- ・運動技能（ランニング、ホッピング、ジャンピング）の障害

- ・股関節屈筋の短縮を導くおそれのある、腰椎の脊柱前彎過度。これは、姿勢全体、および歩き方、足踏み方、または走り方に影響を及ぼす。

30

- ・アキレス腱および膝腱の筋拘縮は、結合組織において筋線維が短くなり線維形成を起こすので、機能を損なう。

- ・進行性の歩行困難

- ・筋線維の変形

- ・舌およびふくらはぎの筋肉の仮性肥大（腫脹）。筋組織は最終的に脂肪および結合組織により置き換えられるため、仮性肥大という語を用いる。

- ・脳内のジストロフィンの非存在または機能不全の結果であると考えられる、神経行動障害（例えば、ADHD）、学習障害（失読症）、および特定の認知技能（特に短期言語記憶）の非進行性衰弱の高いリスク

40

- ・歩く能力の最終的損失（通常は12歳までに）

- ・骨格の変形（場合によっては脊柱側彎を含む）

- ・臥位または座位から起き上がることが困難

【0036】

この病状は、しばしば、患者が最初の措置を講じたときから臨床的に観察することができ、通常、男児が9歳～12歳の間に歩行能力が完全に失われる。DMDに罹患したほとんどの男性は、21歳までに、本質的に「首より下が麻痺する」ようになる。筋肉消耗は、脚および骨盤で始まり、次に肩および首の筋肉に進行し、続いて腕の筋肉および呼吸筋が損失する。ふくらはぎの筋肉の腫脹（仮性肥大）が一目瞭然である。心筋症、特に（拡張型心筋症）が一般的であり、鬱血性心不全または不整脈（不規則な心拍）の発症はごくまれであ

50

る。

【0037】

ガワーズ徴候陽性は、下肢筋肉のより重度の障害を反映する。子供は、上肢で起き上がる：初めに腕と膝で立ち上がり、次いで手を脚の上まで「歩行させて」直立する。罹患した子供は、通常、より疲れやすく、同等者よりも全体的な力が弱い。クレアチンキナーゼ（CPK-MM）の血流レベルは極めて高い。筋電図検査（EMG）は、衰弱が神経への損傷ではなく筋組織の破壊によって引き起こされていることを示す。遺伝子検査は、Xp21遺伝子の遺伝的誤りを明らかにすることができる。筋生検（免疫組織化学もしくは免疫プロッティング）または遺伝子検査（血液検査）は、ジストロフィンの非存在を確認するが、遺伝子検査の改善によってこれは不要になることが多い。

10

- ・ 異常な心筋（心筋症）
- ・ 鬱血性心不全または不規則な心拍リズム（不整脈）
- ・ 胸部および背部の変形（脊柱側彎）
- ・ ふくらはぎ、臀部、および肩の筋腫脹（4歳または5歳前後）。これらの筋肉は最終的に、脂肪および結合組織により置き換えられる（仮性肥大）。
- ・ 筋肉量の損失（萎縮）
- ・ かかと、脚の筋拘縮
- ・ 筋肉の変形
- ・ 食物または流体が肺に流入することに伴う肺炎および嚥下を含む、呼吸器障害（疾患の後期段階において）

20

【0038】

C. 原因

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、X染色体の短腕に位置する遺伝子座Xp21のジストロフィン遺伝子の変異によって引き起こされる。ジストロフィンは、多くのサブユニットを含有するタンパク質複合体を通じて、各筋線維の細胞骨格を、基礎となる基底層（細胞外マトリックス）に接続する役割を担う。ジストロフィンが存在しないと、過剰なカルシウムが筋線維鞘（細胞膜）に浸透する。カルシウムおよびシグナル伝達経路の変化により水がミトコンドリアに侵入し、次いでミトコンドリアが破裂する。

【0039】

骨格筋ジストロフィーでは、ミトコンドリア機能不全が、ストレス誘発性サイトゾルカルシウムシグナルの増幅およびストレス誘発性活性酸素種（ROS）産生の増幅を生じる。いくつかの経路を含むが明確に理解されていない複雑なカスケードプロセスにおいて、細胞内の酸化ストレスの増加が筋線維鞘に損傷を与え、最終的には細胞死をもたらす。筋線維が壊死を起こし、最終的に脂肪および結合組織に置き換えられる。

30

【0040】

DMDは、X連鎖劣性パターンで遺伝する。女性が典型的にはこの疾患の保因者になり、男性が罹患する。典型的には、女性保因者は、罹患した息子を産むまでは変異を保有することに気付かないであろう。保因者の母親の息子は、母親から欠陥遺伝子を引き継ぐ可能性が50%ある。保因者の母親の娘は、保因者である可能性が50%であり、遺伝子の2つの正常コピーを有する可能性が50%ある。いかなる場合でも、罹患していない父親は、正常なYを息子に、または正常なXを娘に譲り渡す。DMDなどのX連鎖劣性状態の女性保因者は、X不活性化のパターンによっては症状を示し得る。

40

【0041】

フレーム外エクソンを並列することによってオープンリーディングフレーム（ORF）を破壊する、ヒトDMD遺伝子のエクソン51の前のエクソン欠失が、最も一般的なタイプのヒトDMD変異である。エクソン51のスキッピングは、原理上、エクソン欠失を有するDMD患者の13%でDMD ORFを回復させることができる。

【0042】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、男児の3,500人に1人の発生率を有する。ジストロフィン遺伝子内の変異は、生殖細胞系伝達の間に遺伝するかまたは自発的に発生し得る。

50

【0043】

D. 診断

この障害の家族歴を有する人には、遺伝カウンセリングが推奨される。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、妊娠中に行われる遺伝子検査によって約95%の精度で検出できる。

【0044】

DNA検査

ジストロフィン遺伝子の筋肉特異的アイソフォームは、79のエクソンから構成され、通常、DNA検査および分析で、影響を受けるエクソンの特定のタイプの変異を同定することができる。ほとんどの場合に、DNA検査が診断を確定する。

【0045】

筋生検

DNA検査で変異を見つけられない場合は、筋生検検査が行われることがある。小さな筋組織サンプルを抽出し（通常は針の代わりにメスで）、ジストロフィンの存在を明らかにする色素を適用する。そのタンパク質の完全な非存在は、その病状を示唆する。

【0046】

過去数年間に、病状を引き起こす多数の変異をより多く検出するDNA検査が開発されており、デュシェンヌの存在を確認するために頻繁に筋生検が必要となることはない。

【0047】

出生前検査

DMDは、X連鎖劣性遺伝子によって運ばれる。男性はX染色体を1つしか持たないので、変異した遺伝子の1コピーがDMDを引き起こす。父親はX連鎖形質を息子に譲り渡すことができないので、変異は母親によって伝達される。

【0048】

母親が保因者であって、2つのX染色体のうちの1つがDMD変異を有する場合、女兒がその変異を2つのX染色体の1つとして引き継ぎ、保因者になる可能性が50%ある。男児がその変異を1つのX染色体として引き継ぎ、それ故DMDを有する可能性が50%ある。

【0049】

出生前検査は、まだ生まれていない子供が最も一般的な変異を有するかどうかにかんがうことができる。DMDに関連する多くの変異が存在するが、一部は同定されていないので、遺伝子検査は、DMDを有する家族が同定されている変異を有する場合にのみ機能する。

【0050】

侵襲的検査の前に、胎児の性別の判定が重要である。男性はこのX連鎖疾患の影響を受けることがあるが、女性のDMDは極めて稀である。これは、最近では無料の胎児DNA検査により16週以上の時点で超音波スキャンによって達成することができる。絨毛膜標本採取（CVS）は、11～14週時に行うことができ、1%の流産リスクを有する。羊水穿刺は、15週後に行うことができ、0.5%の流産リスクを有する。胎児の採血は、約18週時に行うことができる。不明確な遺伝子検査結果の場合の別の選択肢は、胎児筋生検である。

【0051】

E. 処置

DMDに対する現行の治癒法はなく、継続的な医学的必要性が規制当局によって認識されている。ある特定の変異に対するエクソスキッピング処置を用いた第1～2a相試験は、歩行の減退を中断し、わずかな臨床的改善をもたらした。処置は、一般に、生活の質を最大限にするために症状の発症を制御することを目的とし、以下を含む：

- ・プレドニゾロンおよびデフラザコートなどのコルチコステロイドは、エネルギーおよび強度を高め、いくつかの症状の重症化を遅らせる。

- ・ランダム化比較試験は、ベータ-2-アゴニストが筋力を増加させるが、疾患の進行を改変しないことを示している。ベータ2-アゴニストでのほとんどのRCTの経過観察時間は、わずか12ヶ月前後であり、よってその時間枠を超えて結果を推定することはできない。

- ・水泳などの、軽度な不快でない身体活動が推奨される。不活動であること（ベッドでの静養など）は、筋肉疾患を悪化させ得る。

10

20

30

40

50

- ・理学療法は、筋力、柔軟性、および機能を維持するのに役立つ。
- ・矯正装具（支持具および車椅子など）は、移動性および自己ケア能力を改善し得る。睡眠中に足首を適切な位置で支える、体にぴったり合った取り外し可能な脚支持具は、拘縮の発症を遅らせることができる。
- ・疾患の進行に応じて適切な呼吸補助が重要である。

【0052】

DMDの包括的な集学的ケアスタンダード/ガイドラインは、疾病管理予防センター（CDC）によって開発されており、www.treat-nmd.eu/dmd/care/diagnosis-management-DMDで入手可能である。

【0053】

DMDは、Bushby et al., Lancet Neurol., 9(1): 77-93 (2010) および Bushby et al., Lancet Neurol., 9(2): 177-198 (2010)（参照によってその全体が組み入れられる）に概説されているように、一般に5つの段階を経て進行する。発症前期の間、患者は、典型的には、発達遅延を示すが、歩行障害はない。初期の歩行可能期の間、患者は、典型的には、ガワーズ徴候、動揺歩行、およびつま先歩きを示す。後期の歩行可能期の間、患者は、典型的には、次第に苦しい歩行を見せ、階段を上るおよび床から起き上がる能力が失われ始める。初期の非歩行可能期の間、患者は、典型的には、しばらくの間は自力で進むことができ、姿勢を保つことができ、脊柱側彎を発症し得る。後期の非歩行可能期の間、上肢機能および姿勢保持は、次第に制限される。

【0054】

いくつかの態様において、処置は、疾患の発症前期に開始される。いくつかの態様において、処置は、初期の歩行可能期に開始される。いくつかの態様において、処置は、後期の歩行可能期に開始される。複数の態様において、処置は、初期の非歩行可能期の間を開始される。複数の態様において、処置は、後期の非歩行可能期の間を開始される。

【0055】

1. 理学療法

理学療法士は、患者が身体的潜在性を最大限に発揮できるようにすることに携わる。彼らの目的は、以下を行うことである：

- ・必要に応じてストレッチおよび運動のプログラムを開発することによって拘縮および変形の発症を最小限に抑えること
- ・固定具および耐久性のある医療機器を推薦することによって、身体的な性質の他の二次的合併症を予測し、最小限に抑えること
- ・呼吸機能を監視し、呼吸運動を補助するための技法および分泌物を取り除く方法について助言すること。

【0056】

2. 呼吸補助

呼吸のたびに調節可能な体積（量）の空気を人に送達する最新の「従量式酸素吸入器/人工呼吸器」が、筋ジストロフィーに関連した呼吸障害を有する人の処置において有益である。酸素吸入器は、空気を直接送達する侵襲性の気管内チューブまたは気管切開チューブを必要とすることもあるが、一部の人には、フェイスマスクまたはマウスピースによる非侵襲性の送達で十分である。この後者の方法においては、気道陽圧装置、特に二相性の気道陽圧装置が使用されることもある。呼吸具は、携行性のために外部バッテリーを備えた電動車椅子の底面または背面の酸素吸入器トレイに容易に適合し得る。

【0057】

呼吸筋が崩壊し始める可能性があるとき、酸素吸入器処置を十代の半ばから後半に始め得る。肺活量が正常の40%未満に低下した場合、人が換気低下状態（「低換気」）にある可能性が最も高い時間である睡眠時間中に、従量式酸素吸入器/人工呼吸器を使用し得る。睡眠中の低換気は、睡眠障害の詳しい病歴と酸素測定試験および毛細血管血のガスとによって判定される（肺機能検査を参照のこと）。咳補助装置は、肺の過膨張による肺内の過剰な粘液を陽気圧で、次いで陰圧で粘液を上昇させることに役立ち得る。肺活量が正常

の30パーセント未満に減少し続ける場合、さらなる補助のため日中にも従量式酸素吸入器/人工呼吸器が必要となり得る。必要に応じて、人は、日中に酸素吸入器/人工呼吸器を使用する時間を徐々に増加させるであろう。

【0058】

F. 予後

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、最終的に全ての随意筋に影響を及ぼしかつ後期に心筋および呼吸筋を侵す、進行性疾患である。平均余命は、現在25歳前後と推定されているが、これは患者によって異なる。最近の医学の進歩は、罹患者の生存を延長させている。全ての筋疾患に焦点を当てた有力な英国慈善団体であるThe Muscular Dystrophy Campaignは、「高い水準の医学的ケアにより、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する若年男性は、30代を優に超えるまで生きることが多い」と述べている。

10

【0059】

稀な事例では、DMDを有する人は、必要に応じて、車椅子およびベッドでの適正な位置調整、酸素吸入器の補助（気管切開術またはマウスピースを介した）、気道浄化、ならびに心臓薬の使用によって、40代または50代前半まで生存することが分かっている。晩年のケアのための早期の必要な支援計画は、DMDを抱えながら生きている人において長寿が示されている。

【0060】

不思議なことに、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのmdxマウスモデルにおいて、ジストロフィンの欠如は、カルシウムレベルの上昇および骨格筋の筋壊死と関連している。内喉頭筋（ILM）は、保護されており、筋壊死を起こさない。ILMは、他の筋肉と比較してカルシウムの変化を処理する能力がより優れていることを示唆するカルシウム調節系プロファイルを有しており、これは、それらのユニークな病態生理学的特性についての機構的洞察を提供し得る。ILMは、種々の臨床シナリオにおける筋肉消耗の予防および治療のための新規戦略の開発を容易にし得る。

20

【0061】

II. CRISPRシステム

A. CRISPR

CRISPR（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復）は、塩基配列の短い反復を含有するDNA遺伝子座である。各反復の後に、ウイルスへの事前曝露由来の「スペーサーDNA」の短いセグメントが続く。CRISPRは、配列決定された真正細菌ゲノムの約40%および配列決定された古細菌の90%に見いだされる。CRISPRは、CRISPRに関連するタンパク質をコードするcas遺伝子と関連していることが多い。CRISPR/Casシステムは、プラスミドおよびファージなどの外来遺伝エレメントに対する耐性を付与し、かつ獲得免疫の一形態を提供する、原核生物の免疫系である。CRISPRスペーサーは、真核生物におけるRNAiのように、これらの外因性遺伝エレメントを認識およびサイレンシングする。

30

【0062】

CRISPR反復は、サイズが24~48塩基対の範囲にある。これらは通常、ある程度の二分対称性を示す、つまりヘアピンなどの二次構造の形成を暗示するが、真に回文であるわけではない。反復は、同様の長さのスペーサーで隔てられている。いくつかのスペーサーは原核生物のゲノムと一致するが（自己ターゲティングスペーサー）、いくつかのCRISPRスペーサー配列は、プラスミドおよびファージ由来の配列と正確に一致する。新たなスペーサーは、ファージ感染に応答して迅速に付加され得る。

40

【0063】

B. Casヌクレアーゼ

CRISPR関連（cas）遺伝子は、CRISPR反復-スペーサーアレイに関連していることが多い。2013年現在、40種を超える異なるCasタンパク質ファミリーが記述されている。これらのタンパク質ファミリーのうち、Cas1は、異なるCRISPR/Casシステムの間で遍在しているようである。8つのCRISPRサブタイプ（Ecoli、Ypest、Nmeni、Dvulg、Tneap、Hmari、Apern、およびMtube）を定義するためにcas遺伝子および反復構造の特定の組み合わせが使用

50

されており、その一部は、RAMP (repeat-associated mysterious protein) をコードする追加の遺伝子モジュールと関連している。単一のゲノム内に2つ以上のCRISPRサブタイプが存在し得る。CRISPR/Casサブタイプの散在的分布は、システムが微生物の進化中に遺伝子水平伝播を受けることを示唆している。

【0064】

外因性DNAは、外見上、Cas遺伝子によりコードされたタンパク質によって小さなエレメント（長さがおよそ30塩基対）へとプロセッシングされ、これが次に、リーダー配列の近くのCRISPR遺伝子座に何らかの形で挿入される。CRISPR遺伝子座からのRNAは、構成的に発現され、Casタンパク質によって個々の外部に由来する配列エレメントと隣接する反復配列とから構成される小さなRNAへとプロセッシングされる。RNAは、他のCasタンパク質をガイドして、外因性遺伝エレメントをRNAまたはDNAレベルでサイレンシングする。CRISPRサブタイプ間の機能的多様性を、証拠が示唆している。Cse (CasサブタイプEcoli) タンパク質（大腸菌 (*E. coli*) 中のCasA~Eと呼ばれる）は機能的複合体Cascadeを形成し、これが、CRISPR RNA転写物をCascadeの保持するスパーサー反復単位にプロセッシングする。他の原核生物では、Cas6がCRISPR転写物をプロセッシングする。興味深いことに、大腸菌でのCRISPRに基づくファージ不活性化は、CascadeおよびCas3を必要とするが、Cas1およびCas2を必要としない。パイロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) および他の原核生物において見いだされるCmr (Cas RAMPモジュール) タンパク質は、相補的な標的RNAを認識および切断する小さなCRISPR RNAとの機能的複合体を形成する。RNAガイドCRISPR酵素は、V型制限酵素として分類される。

10

20

【0065】

Cas9は、ヌクレアーゼ、すなわちDNAを切断するために特化した酵素であり、二重らせんの各鎖に対して1つずつの、2つの活性切断部位を有する。チームは、標的DNAを探し当てるCas9の能力を保持しながら、一方または両方の部位を無効にできることを実証した。tracrRNAとスパーサーRNAを組み合わせて「単一ガイドRNA」分子にし、これをCas9と混合することで正しいDNA標的を発見および切断することができるので、そのような合成ガイドRNAを遺伝子編集に使用できる可能性があることが提唱された。

【0066】

Cas9タンパク質は、病原細菌および共生細菌において高度に濃縮されている。CRISPR/Cas媒介性遺伝子調節は、特に真核生物宿主との細菌の相互作用中の、内因性細菌遺伝子の調節に寄与し得る。例えば、フランシセラ・ノビシダ (*Francisella novicida*) のCasタンパク質Cas9は、ユニークな小さいCRISPR/Cas関連RNA (scaRNA) を使用して、*F. ノビシダ*が宿主応答を弱め病原性を促進するのに不可欠な細菌性リポタンパク質をコードする内因性転写物を抑制する。Wangらは、生殖細胞系（接合体）へのCas9 mRNAおよびsgRNAの共注射が、変異と上手く適合したことを示した。また、Cas9 DNA配列の送達も想定される。

30

【0067】

CRISPR/Casシステムは、3種類のクラスに分けられる。クラス1は、いくつかのCasタンパク質をCRISPR RNA (crRNA) と一緒に使用して、機能的エンドヌクレアーゼを構築する。クラス2 CRISPRシステムは、単一のCasタンパク質をcrRNAと共に使用する。Cpf1は、1,300のアミノ酸タンパク質を含有するクラスIIのV型CRISPR/Casシステムとして最近同定された。米国特許公報第2014/0068797号（参照によってその全体が組み入れられる）も参照されたい。

40

【0068】

C. Cpf1ヌクレアーゼ

ブレボテラおよびフランシセラ1由来のクラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復、すなわちCRISPR/Cpf1は、CRISPR/Cas9システムといくつかの類似性を有するDNA編集技術である。Cpf1は、クラスII CRISPR/CasシステムのRNAガイドエンドヌクレアーゼである。この獲得免疫機構は、ブレボテラ細菌およびフランシセラ細菌に見いだされる。それは、ウイルスによる遺伝子損傷を防止する。Cpf1遺伝子は、CRISPR遺伝子座に関連しており、ガイドRNAを使用してウイルスDNAを発見および切断するエンドヌクレアーゼをコー

50

ドする。Cpf1は、Cas9よりも小さくかつ単純なエンドヌクレアーゼであり、CRISPR/Cas9システムの制限の一部を克服する。

【0069】

Cpf1は、多くの細菌種に見られる。ゲノム編集のためのツールへと発展した究極的なCpf1エンドヌクレアーゼは、それを保有していることが知られた最初の16種のうちの1種から採取された。

【0070】

複数の態様において、Cpf1は、以下に示す配列を有する、アシダミノコッカス由来のCpf1酵素である（BV3L6種、UniProtアクセッション番号U2UMQ6; SEQ ID NO.442）。

1	mtqfegftnl	yqvsctlrfe	lipqgktrlkh	iqeggfieed	karndhykel	kpiidriykt	10
61	yadqclqlvq	ldwenlsaai	dsyrkektee	trnalieeqa	tyrnaihdyf	igrtdnlttda	
121	inkrhaeiyk	glfkaelfng	kvlkqlgtvt	ttehenallr	sfdkfttyfs	gfyenrknav	
181	saedistaip	hrivqdnfnpk	fkenchiftr	litavpslre	hfenvkkaig	ifvstsieev	
241	fsfpfynqll	tqtqidlynq	llggisreag	tekikglnev	lnlaiqknde	tahiiaslph	
301	rfiplflkqil	sdrntlsfil	eefksdeevi	qsfcykttl	rnenvletae	alfnelnsid	
361	lthifishkk	letissalcd	hwdtlrnaly	erriseltgk	itksakekvq	rsikhedinl	
421	geiisaagke	lseafkqkts	eilshahaal	dqplpttlkk	geekeilksq	ldsllglyhl	
481	ldwfavdesn	evdpefsarl	tgiklemeps	lsfynkarny	atkkpysvek	fklnfqmptl	
541	asgwdvnkek	nngailfvkn	glyylgimpk	qkgrykalsf	eptektsege	dkmyydyfpd	
601	aakmipkcst	qlkavtahfq	thttpillsn	nfiepleitk	eiydlennpek	epkkfqtaya	
661	kktgdqkgyr	ealckwidft	rdflskytkt	tsidlsslrp	ssqykdlgey	yaelnpllyh	
721	isfgriaeek	imdavetgkl	ylfqiynkdf	akghhgkpn	htlywtglfs	penlaksik	
781	lngqaelfyr	pkssmkrmah	rlgekmlnkk	lkdkqktpip	tlyqelydyv	nhrlshdlsd	
841	earallpnvi	tkevsheii	drfstsdkff	fhpvitlnyq	aanspskfnq	rvnaylkeh	20
901	etpiigidrg	ernliyitvi	dstgkileqr	slntiqqfdy	qkkldnreke	rvaargawsv	
961	vgtikdlkqg	ylsqviheiv	dlmihyqavv	vlenlnfgfk	skrtgiaeka	vyqqfekmli	
1021	dklnclvlkd	ypaekvggvl	npyqltdqft	sfakmgtqsg	flfyvpapyt	skidpltgfv	
1081	dpfvwktikn	hesrkhfleg	fdflhydvkt	gdfilhfkmn	rnlsfqrqlp	gfmpawdivf	
1141	eknetqfdak	gtpfiagkri	vpvienhrft	gryrdlypan	elialleekg	ivfrdgsnil	
1201	pkllenddsh	aidtmvalir	svlqmrnsna	atgedyinsp	vrldngvcfd	srfqnpewpm	
1261	dadangayhi	alkgqlllnh	lkeskdiklq	ngisnqdwla	yiqelrn		

【0071】

いくつかの態様において、Cpf1は、以下に示す配列を有する、ラクノスピラ科由来のCpf1酵素である（ND2006種、UniProtアクセッション番号A0A182DWE3; SEQ ID NO.443）。

1	AASKLEKFTN	CYSLSKTLRF	KAIPVGKTQE	NIDNKRLLE	DEKRAEDYKG	VKKLLDRYYL	
61	SFINDVLHSI	KLKNLNNYIS	LFRKKTRTEK	ENKELENLEI	NLRKEIAKAF	KGAAGYKSLF	30
121	KKDIIETILP	EAADDKDEIA	LVNSFNGFTT	AFTGFFDNRE	NMFSEEAKST	SIAFRICINEN	
181	LTRYISNMID	FEKVDAIFDK	HEVQEIKEKI	LNSDYDVEDF	FEGEFFNFVL	TQEGIDVYNA	
241	IIGGFVTESE	EKIKGLNEYI	NLYNAKTKQA	LPKFKPLYKQ	VLSDRESLSF	YGEYTSDEE	
301	VLEVFRNTLN	KNSEIFSSIK	KLEKLFKNFD	EYSSAGIFVK	NGPAISTISK	DIFGEWNLIR	
361	DKWNAEYDDI	HLKKKAVVTE	KYEDDRRKSF	KKIGSFSLEQ	LQEYADADLS	VVEKLKEIII	
421	QKVDEIYKVY	GSSEKLFAD	FVLEKSLKKN	DAVVAIMKDL	LDSVKSFENY	IKAFFGEGKE	
481	TNRDESFGYD	FVLAYDILLK	VDHIYDAIRN	YVTQKPYSKD	KFKLYFQNPQ	FMGGWDKDKE	
541	TDYRATILRY	GSKYYLAIMD	KKYAKCLQKI	DKDDVNGNYE	KINYKLLPGP	NKMLPKVFFS	
601	KKWMAYYNPS	EDIQKIYKNG	TFKKGDMFNL	NDCHKLIDFF	KDSISRYPKW	SNAYDENFSE	
661	TEKYKDIAGF	YREVEEQGYK	VSFESASKKE	VDKLVEEGKL	YMFQIYNKDF	SDKSHGTPNL	
721	HTMYFKLLFD	ENNHGQIRLS	GGAELFMRA	SLKKEELVVH	PANSPANKN	PDNPKKTTTL	
781	SYDVYKDKRF	SEDQYELHIP	IAINKCPKNI	FKINTEVRVL	LKHDDNPYVI	GIDRGERNLL	
841	YIVVVDGKGN	IVEQYSLNEI	INNENGIRIK	TDYHSLDDKK	EKERFEARQN	WTSIENIKEL	
901	KAGYISQVVH	KICELVEKYD	AVIALEDLNS	GFKNSRVKVE	KQVYQKFEKM	LIDKLNYMVD	40
961	KKSNPCATGG	ALKGYQITNK	FESFKSMSTQ	NGFIFYIPAW	LTSKIDPSTG	FVNLLKTKYT	
1021	SIADSKKFIS	SFDRIMYVPE	EDLFEFALDY	KNFSRTDADY	IKKWKLYSYG	NRIRIFAAAK	
1081	KNNVFAWEEV	CLTSAYKELF	NKYGINYQQG	DIRALLCEQS	DKAFYSSFMA	LMSLMLQMRN	
1141	SITGRTDVDF	LISPVKNSDG	IFYDSRNYEA	QENAILPKNA	DANGAYNIAR	KVLWAIGQFK	
1201	KADEKLDKV	KIAISNKEWL	EYAQTSVK				

【0072】

いくつかの態様において、Cpf1は、哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化される。いくつかの態様において、Cpf1は、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化される。

【0073】

いくつかの態様において、本開示の組成物は、細菌である黄色ブドウ球菌由来の小型バ

ージョンのCas9を含む。小型バージョンのCas9は、野生型または完全長Cas9に勝る利点を提供する。

【0074】

Cpf1遺伝子座は、混合アルファ/ベータドメイン、RuvC-Iとそれに続くらせん領域、RuvC-IIおよびジンクフィンガー様ドメインを含有する。Cpf1タンパク質は、Cas9のRuvCドメインに似たRuvC様エンドヌクレアーゼドメインを有する。さらに、Cpf1は、HNHエンドヌクレアーゼドメインを有さず、Cpf1のN末端は、Cas9のアルファ-らせん認識ローブを有さない。

【0075】

Cpf1 CRISPR-Casドメインアーキテクチャは、Cpf1が機能的にユニークであることを示し、クラス2のV型CRISPRシステムとして分類されている。Cpf1遺伝子座は、II型システムよりもI型およびIII型に似たCas1、Cas2、およびCas4タンパク質をコードする。データベース検索は、Cpf1ファミリータンパク質が多く、多くの細菌種に豊富にあることを示唆している。

10

【0076】

機能的なCpf1は、tracrRNAを必要としない。それ故、本開示の機能的なCpf1 gRNAは、crRNAを含んでもそれからなってもよい。Cpf1は、Cas9よりも小さいヌクレアーゼであるだけでなく、より小さいsgRNA分子（Cas9のヌクレオチド数の半分に近い）も有するので、このことによってゲノム編集に利益をもたらす。

【0077】

Cpf1-gRNA（例えば、Cpf1-crRNA）複合体は、Cas9によって標的とされるグリッチPAMとは対照的に、プロトスペーサー隣接モチーフ5'-YTN-3'（式中、「Y」はピリミジンであり、「N」は任意の核酸塩基である）または5'-TTN-3'の同定によって、標的DNAまたはRNAを切断する。PAMの同定後、Cpf1は、4または5ヌクレオチドオーバーハングの付着末端様DNA二本鎖切断を導入する。

20

【0078】

CRISPR/Cpf1システムは、Cpf1酵素と、二重らせん上の修正スポットを発見して複合体を位置付けて標的DNAを切断するガイドRNAとを含むか、またはそれらからなる。そのネイティブの細菌宿主では、CRISPR/Cpf1システム活性は、3つの段階を有する：

適応：Cas1およびCas2タンパク質が、小さなDNA断片のCRISPRアレイへの適応を容易にする；

30

crRNAの形成：Casタンパク質をガイドする成熟crRNAを産生する、プレ-cr-RNAのプロセッシング；および

干渉：Cpf1がcrRNAに結合して、二成分複合体を形成し、標的DNA配列を同定および切断する。

【0079】

このシステムは、哺乳動物細胞などの非細菌細胞においてCpf1を所望の標的配列にガイドする、天然に存在しないcrRNAを利用するように修飾されている。

【0080】

D. gRNA

RNAにガイドされるタンパク質として、Cas9は、DNA標的の認識を指令する短いRNAを必要とする。Cas9は、PAM配列NGGを含有するDNA配列を選択的に調べるが、それはプロトスペーサー標的なしでここに結合することができる。しかしながら、Cas9-gRNA複合体は、二本鎖切断を生じるためにgRNAとの厳密な一致を必要とする。細菌におけるCRISPR配列は、複数のRNAで発現され、次いでRNAのガイド鎖を生じるためにプロセッシングされる。真核生物系は、CRISPR RNAをプロセッシングするために必要なタンパク質の一部を欠いているため、RNAポリメラーゼIII型プロモーターU6で発現される単一RNAにCas9ターゲティングに不可欠なRNA片を組み合わせるために合成構築物gRNAが作られた。合成gRNAは、最小長で100bpをわずかに上回り、PAM配列NGGの直前の20のプロトスペーサーヌクレオチドを標的とする部分を含む；gRNAは、PAM配列を含まない。

40

50

【 0 0 8 1 】

いくつかの態様において、gRNAは、野生型ジストロフィン遺伝子内の部位を標的とする。いくつかの態様において、gRNAは、変異体ジストロフィン遺伝子内の部位を標的とする。いくつかの態様において、gRNAは、ジストロフィンイントロンを標的とする。いくつかの態様において、gRNAは、ジストロフィンエクソンを標的とする。いくつかの態様において、gRNAは、表1に示されるジストロフィンアイソフォームの1つまたは複数で発現されかつ存在するジストロフィンエクソン中の部位を標的とする。複数の態様において、gRNAは、ジストロフィンスプライス部位を標的とする。いくつかの態様において、gRNAは、ジストロフィン遺伝子上のスプライスドナー部位を標的とする。複数の態様において、gRNAは、ジストロフィン遺伝子上のスプライスアクセプター部位を標的とする。

10

【 0 0 8 2 】

複数の態様において、ガイドRNAは、変異体DMDエクソンを標的とする。いくつかの態様において、変異体エクソンは、エクソン23または51である。いくつかの態様において、ガイドRNAは、ジストロフィン遺伝子のエクソン1、23、41、44、46、47、48、49、50、51、52、53、54、または55の少なくとも1つを標的とする。複数の態様において、ガイドRNAは、ジストロフィン遺伝子のイントロン44、45、50、51、52、53、54、または55の少なくとも1つを標的とする。好ましい態様において、ガイドRNAは、エクソン51またはエクソン23のスキッピングを誘導するように設計される。複数の態様において、gRNAは、エクソン51またはエクソン23のスプライスアクセプター部位を標的とする。

【 0 0 8 3 】

本明細書に開示の方法および組成物において使用するための好適なgRNAは、SEQ ID NO. 60～382の通り提供される（表E）。好ましい態様において、gRNAは、SEQ ID No.60～SEQ ID No.382のいずれか1つから選択される。

20

【 0 0 8 4 】

いくつかの態様において、本開示のgRNAは、DMD遺伝子に対応するコード配列または非コード配列内の標的配列に相補的である配列を含み、それ故、標的配列にハイブリダイズする。いくつかの態様において、Cpf1のためのgRNAは、直接反復骨格配列とそれに続く24ヌクレオチドのガイド配列を含有する、単一crRNAを含む。いくつかの態様において、crRNAの「ガイド」配列は、標的配列に相補的であるgRNAの配列を含む。いくつかの態様において、本開示のcrRNAは、標的配列に相補的ではないgRNAの配列を含む。本開示の「骨格」配列は、gRNAをCpf1ポリペプチドに連結する。本開示の「骨格」配列は、gRNA-Cas9構築物のtracrRNA配列と等価ではない。

30

【 0 0 8 5 】

E. Cas9 対 Cpf1

Cas9は、DNAを切断するために2つのRNA分子を必要とする一方で、Cpf1は1つ必要とする。これらタンパク質はまた、DNAを異なる場所で切断し、編集部位を選択する際に研究者により多くの選択肢を提供する。Cas9は、DNA分子において両方の鎖を同じ位置で切断し、「平滑」末端を残す。Cpf1は、一方の鎖を他方よりも長く残し、扱いやすい「付着」末端を生じる。Cpf1は、Cas9と比較して、切断部位に新たな配列をより多く挿入できるものである。CRISPR/Cas9システムは遺伝子を効率的に無効にすることができるが、遺伝子を挿入することもノックインを生成することも困難である。Cpf1は、tracrRNAを欠き、トリッチPAMを利用し、DNAを突出型のDNA DSBを介して切断する。

40

【 0 0 8 6 】

まとめると、Cpf1システムとCas9システムとの間の重要な違いは、Cpf1が、異なるPAMを認識して、新たな標的可能性を実現すること、Cas9によって産生される平滑末端の代わりに4～5ntの長い付着末端を生み出し、遺伝子挿入の効率およびNHEJまたはHDRの間の特異性を増強すること、ならびに、Cas9切断部位からさらに離れたPAMからさらに離れた標的DNAを切断して、DNAの新たな切断可能性を実現することである。

特徴	Cas9	Cpf1
構造	2つのRNAが必要(または1つの融合転写物 (crRNA+tracrRNA=gRNA))	1つのRNAが必要
切断機構	平滑末端切断	突出末端切断
切断部位	認識部位の近位	認識部位から遠位
標的部位	G-リッチPAM	T-リッチPAM
細胞タイプ	がん細胞を含む急成長している細胞	神経細胞を含む 非分裂細胞

10

【 0 0 8 7 】

F. CRISPR/Cpf1媒介性遺伝子編集

CRISPR/Cpf1を使用してDMD遺伝子を編集する際の最初の工程は、ゲノム標的配列を同定することである。本開示のgRNAのためのゲノム標的は、ジストロフィン遺伝子内の任意の約24ヌクレオチドのDNA配列であることができるが、但し、その配列がゲノムの残部と比較してユニークであるものとする。いくつかの態様において、ゲノム標的配列は、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51、エクソン45、エクソン44、エクソン53、エクソン46、エクソン52、エクソン50、エクソン43、エクソン6、エクソン7、エクソン8、および/またはエクソン55中にある。いくつかの態様において、ゲノム標的配列は、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51、エクソン45、エクソン44、エクソン53、エクソン46、エクソン52、エクソン50、エクソン43、エクソン6、エクソン7、エクソン8、および/またはエクソン55の5'または3' スプライス部位である。いくつかの態様において、ゲノム標的配列は、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51、エクソン45、エクソン44、エクソン53、エクソン46、エクソン52、エクソン50、エクソン43、エクソン6、エクソン7、エクソン8、および/またはエクソン55のすぐ上流または下流にあるイントロンである。例示的なゲノム標的配列を表Dに見いだすことができる。

20

【 0 0 8 8 】

CRISPR/Cpf1を使用してDMD遺伝子を編集する際の次の工程は、標的とする遺伝子領域内の全てのプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列を同定することである。Cpf1は、TリッチPAM配列 (TTTN、ここで、Nは任意のヌクレオチドである) を利用する。標的配列は、PAMのすぐ上流でなければならない。全ての可能なPAM配列および推定標的部位が同定されたら、次の工程は、最も効率的なオンターゲット切断をもたらす可能性の高い部位を選択することである。gRNAターゲティング配列は標的配列と一致することが必要であり、gRNAターゲティング配列はゲノム内の追加の部位と一致してはならない。好ましい態様において、gRNAターゲティング配列は、標的と完全な相同性を有するが、ゲノムの他の場所では相同性を有さない。いくつかの態様において、所与のgRNAターゲティング配列は、ゲノム全体にわたり部分的な相同性が存在する追加の部位を有する。これらの部位は、「オフターゲット」と呼ばれ、gRNAを設計するときに考慮されるべきである。一般に、オフターゲット部位は、PAM配列の近くにミスマッチがある場合は効率的に切断されないの、相同性のないgRNAまたはPAM配列に近いミスマッチを有するものが最も高い特異性を有する。「オフターゲット活性」に加えて、所望の標的配列の切断 (「オンターゲット活性」) を最大限にする要因が考慮されなければならない。各々が標的DNAと100%の相同性を有する2つのgRNAターゲティング配列が等価な切断効率をもたらすわけではないことは、当業者に公知である。実際に、切断効率は、選択された標的配列内の具体的なヌクレオチドに応じて増加も減少もし得る。最良のgRNAを設計するために、各々の潜在的なgRNAターゲティング配列の予測オンターゲット活性およびオフターゲット活性の詳細な調査が必要となる。潜在的なPAM配列および標的配列を探し、関連するgRNAをそれらの予測オンターゲット活性およびオフターゲット活性に基づいてランク付けできる、いくつかのgRNA設計プログラムが開発されている (例えば、CRISPRdirect、www.crispr.dbcls.jpで入手可能)。

30

40

50

【0089】

次の工程は、所望のgRNAを合成およびクローン化することである。ターゲティングオリゴを合成し、アニーリングし、gRNA骨格を含有するプラスミドに標準的な制限-ライゲーションクローニングを使用して挿入することができる。しかしながら、正確なクローニング戦略は、選択されるgRNAベクターに依存する。Cpf1のためのgRNAは、Cas9のためのgRNAと比べ特に単純で、直接反復骨格配列とそれに続く約24ヌクレオチドのガイド配列を含有する単一crRNAからのみなる。Cpf1は、検出可能なDNA切断を達成するために最低16ヌクレオチドのガイド配列を、インビトロで効率的なDNA切断を達成するために最低18ヌクレオチドのガイド配列を必要とする。いくつかの態様において、20~24ヌクレオチドのガイド配列が使用される。Cpf1 gRNAのシード領域は、一般に、ガイド配列の5'端の最初の5ヌクレオチド内にある。Cpf1は、標的ゲノムDNAにおいて突出型切断を行う。AsCpf1およびLbCpf1では、切断は、標的とされた(+)鎖上のPAMの19bp後で、他方の鎖上の23bpで起こる。

10

【0090】

各gRNAは、次いで、1つまたは複数の標的細胞株において検証されるべきである。例えば、CRISPRおよびgRNAが細胞に送達された後に、ゲノム標的領域を、PCRを使用して増幅し、当業者に公知の方法に従って配列決定してよい。

【0091】

いくつかの態様において、遺伝子編集は、インビトロで実施してもエキスピボで実施してもよい。いくつかの態様において、インビトロまたはエキスピボで、細胞を、Cpf1と、ジストロフィンスプライス部位を標的とするgRNAとに接触させる。いくつかの態様において、細胞を、Cpf1およびガイドRNAをコードする1つまたは複数の核酸と接触させる。いくつかの態様において、1つまたは複数の核酸を、細胞に、例えば、リポフェクションまたはエレクトロポレーションを使用して導入する。また、遺伝子編集を接合体で実施してもよい。複数の態様において、接合体に、Cpf1およびジストロフィンスプライス部位を標的とするgRNAをコードする1つまたは複数の核酸を注射してよい。その後、接合体を宿主に注射してよい。

20

【0092】

複数の態様において、Cpf1は、ベクター上に提供される。複数の態様において、ベクターは、ラクノスピラ科細菌に由来するCpf1配列を含有する。例えば、Uniprotアクセッション番号A0A182DWE3; SEQ ID NO.443を参照されたい。複数の態様において、ベクターは、アシダミノコッカス細菌に由来するCpf1配列を含有する。例えば、Uniprotアクセッション番号U2UMQ6; SEQ ID NO.442を参照されたい。いくつかの態様において、Cpf1配列は、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化される。いくつかの態様において、ベクターは、蛍光活性化セルソーティング(FACS)を使用してCpf1発現細胞を選別することを可能とするGFPなどの蛍光タンパク質をコードする配列をさらに含有する。いくつかの態様において、ベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターである。

30

【0093】

複数の態様において、gRNAはベクター上に提供される。いくつかの態様において、ベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターである。複数の態様において、Cpf1およびガイドRNAは、同じベクター上に提供される。複数の態様において、Cpf1およびガイドRNAは、異なるベクター上に提供される。

40

【0094】

いくつかの態様において、相同組換え修復を達成するために、細胞を一本鎖DMDオリゴヌクレオチドと追加で接触させる。いくつかの態様において、小さいINDELが、ジストロフィンのタンパク質リーディングフレームを回復させる(「リフレーミング」戦略)。リフレーミング戦略を使用するとき、細胞を単一gRNAと接触させてよい。複数の態様において、スプライスドナーまたはスプライスアクセプター部位が破壊され、それが、エクソンスキッピングおよびタンパク質リーディングフレームの回復をもたらす(「エクソンスキッピング」戦略)。エクソンスキッピング戦略を使用するとき、細胞を2以上のgRNAと接触させてよい。

50

【0095】

インビトロまたはエキスピボのCpf1媒介性DNA切断の効率を、T7 E1アッセイなどの当業者に公知の技術を使用して評価してよい。DMD発現の回復を、RT-PCR、ウエスタンブロッティング、および免疫細胞化学などの当業者に公知の技術を使用して確認してよい。

【0096】

いくつかの態様において、インビトロまたはエキスピボ遺伝子編集は、筋細胞または衛星細胞で実施される。いくつかの態様において、遺伝子編集は、iPSC細胞またはiCM細胞で実施される。複数の態様において、iPSC細胞を遺伝子編集後に分化させる。例えば、iPSC細胞は、編集後に筋細胞または衛星細胞へと分化させ得る。複数の態様において、iPSC細胞を、心筋細胞、骨格筋細胞、または平滑筋細胞へと分化させる。複数の態様において、iPSC細胞を心筋細胞へと分化させる。当業者に公知の方法に従って分化するようにiPSC細胞を誘導し得る。

10

【0097】

いくつかの態様において、細胞をCpf1およびgRNAと接触させることは、ジストロフィン発現を回復させる。複数の態様において、インビトロもしくはエキスピボで編集された細胞またはそれらに由来する細胞は、野生型細胞と同程度のジストロフィタンパク質のレベルを示す。複数の態様において、編集された細胞またはそれらに由来する細胞は、ジストロフィンを、野生型ジストロフィン発現レベルの50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはその間の任意の百分率のレベルで発現する。複数の態様において、インビトロもしくはエキスピボで編集された細胞またはそれらに由来する細胞は、野生型細胞ものと同程度のミトコンドリア数を有する。複数の態様において、編集された細胞またはそれらに由来する細胞は、野生型細胞の50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはその間の任意の百分率の数のミトコンドリアを有する。複数の態様において、編集された細胞またはそれらに由来する細胞は、ベースラインで非編集細胞と比較して酸素消費率(OCR)の増加を示す。

20

【0098】

III. 核酸送達

上で考察した通り、ある特定の態様において、その後の精製および細胞/対象への送達のため、または遺伝子に基づく送達アプローチで直接使用するため、発現カセットを用いて転写因子産物を発現させる。Cpf1およびジストロフィンスプライス部位を標的とする少なくとも1つのDMDガイドRNAをコードする1つまたは複数の核酸を含有する発現ベクターが本明細書に提供される。いくつかの態様において、Cpf1をコードする核酸および少なくとも1つのガイドRNAをコードする核酸は、同じベクター上に提供される。さらなる態様において、Cpf1をコードする核酸および少なくとも1つのガイドRNAをコードする核酸は、別々のベクター上に提供される。

30

【0099】

発現は、ベクター内に適切なシグナルが提供されることを必要とし、このシグナルは、細胞において関心対象の遺伝子の発現を駆動するウイルスおよび哺乳動物の両供給源に由来するエンハンサー/プロモーターなどの様々な調節エレメントを含む。また、宿主細胞におけるメッセンジャーRNAの安定性および翻訳可能性を最適化するように設計されたエレメントも定義される。産物を発現する永続的な安定細胞クローンを樹立するための多数のドミナント薬物選択マーカーの使用条件も提供され、薬物選択マーカーの発現をポリペプチドの発現と関連付けるエレメントも提供される。

40

【0100】

A. 調節エレメント

本出願全体を通して、「発現カセット」という用語は、核酸コード配列の一部または全てが転写および翻訳されることができる、すなわち、プロモーターの制御下にある、遺伝子産物をコードする核酸を含有する任意のタイプの遺伝子構築物を含むことを意味する。「プロモーター」は、遺伝子の特異的な転写を開始するために必要とされる、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識されるDNA配列を指す。「転写制御下」とい

50

う語句は、プロモーターが、RNAポリメラーゼ開始および遺伝子の発現を制御するため、核酸に対して正確な位置および方向にあることを意味する。「発現ベクター」は、複製可能な遺伝子構築物に含まれており、したがって、複製起点、転写終結シグナル、ポリA領域、選択可能マーカー、および多目的クローニング部位の1つまたは複数を含む、発現カセットを含むことを意味する。

【0101】

プロモーターという用語は、RNAポリメラーゼIIのための開始部位の周辺に密集した転写制御モジュールの一群を指すために本明細書において使用される。どのようにプロモーターが組織化されるかについての考えの大部分は、HSVチミジンキナーゼ(tk)およびSV40初期転写単位のためのものを含む、いくつかのウイルスプロモーターの分析に由来する。より最近の研究によって拡大されたこれらの研究は、プロモーターが個別の機能的モジュールから構成されることを示しており、機能的モジュールは各々、およそ7~20bpのDNAからなり、転写活性化タンパク質または抑制タンパク質のための1つまたは複数の認識部位を含有している。

10

【0102】

各プロモーター内の少なくとも1つのモジュールは、RNA合成のための開始部位を位置付けるように機能する。これの最もよく知られている例は、TATAボックスであるが、哺乳動物末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のためのプロモーターおよびSV40後期遺伝子のためのプロモーターなどのTATAボックスを欠くいくつかのプロモーターにおいては、開始部位自体を覆う個別エレメントが、開始の場所を固定するのを助ける。

20

【0103】

いくつかの態様において、本開示のCpf1構築物は、筋細胞特異的プロモーターによって発現される。この筋細胞特異的プロモーターは、構成的に活性なプロモーターであっても、誘導性プロモーターであってもよい。

【0104】

追加のプロモーターエレメントは、転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは開始部位の30~110bp上流の領域に位置するが、多数のプロモーターが開始部位の下流にも機能的エレメントを含有していることが最近になって示された。エレメントが反転したり互い相対的に移動したりするときにもプロモーター機能が保存されるように、プロモーターエレメント間の間隔はフレキシブルであることが多い。tkプロモーターでは、プロモーターエレメント間の間隔を50bp間隔にまで増加させることができ、そこからは活性が減退し始める。プロモーターに依存して、個々のエレメントは、協同的にまたは独立に機能して転写を活性化できるようである。

30

【0105】

ある特定の態様において、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)前初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス長末端反復、ラットインスリンプロモーター、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼなどのウイルスプロモーターを、関心対象のコード配列の高レベルの発現を得るために使用できる。発現のレベルが所与の目的に十分であるという条件で、関心対象のコード配列の発現を達成するための、当技術分野において周知である他のウイルスまたは哺乳動物細胞または細菌ファージのプロモーターの使用も同じく想定される。周知の特性を有するプロモーターを用いることによって、トランスフェクションまたは形質転換の後の関心対象のタンパク質の発現のレベルおよびパターンを最適化することができる。さらに、特定の生理学的シグナルに応答して調節されるプロモーターを選択することにより、遺伝子産物の誘導性発現が可能となる。

40

【0106】

エンハンサーは、同じDNA分子上の遠位に位置するプロモーターからの転写を増加させる遺伝エレメントである。エンハンサーは、プロモーターと同様に組織化される。すなわち、それらは、各々が1つまたは複数の転写タンパク質と結合する多くの個々のエレメントから構成される。エンハンサーとプロモーターとの間の基本的な差異は、機能性である

50

。エンハンサー領域は全体として離れて転写を刺激することができなければならない；このことは、プロモーター領域またはその成分エレメントには当てはまる必要がない。その一方で、プロモーターは、特定の部位において特定の方向でRNA合成の開始を指令する1つまたは複数のエレメントを有しなければならないが、エンハンサーはこれらの特異性を欠いている。プロモーターおよびエンハンサーは、重複しかつ連続していることが多く、極めて類似したモジュール機構を有することが多いと見られる。

【0107】

プロモーターおよび/またはエンハンサーは、例えば、免疫グロブリン軽鎖、免疫グロブリン重鎖、T細胞受容体、HLA DQ aおよび/またはDQ β 、 γ -インターフェロン、インターロイキン-2、インターロイキン-2受容体、MHCクラスII β 5、MHCクラスII HLA-Dra、 α -アクチン、筋肉クレアチンキナーゼ (MCK)、プレアルブミン (トランスサイレチン)、エラスターゼI、メタロチオネイン (MTII)、コラゲナーゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、t-グロビン、 β -グロビン、c-fos、c-HA-ras、インスリン、神経細胞接着分子 (NCAM)、 α -アンチトリパイン (antitrypsin)、H2B (TH2B) ヒストン、マウスおよび/またはI型コラーゲン、グルコース調節タンパク質 (GRP94およびGRP78)、ラット成長ホルモン、ヒト血清アミロイドA (SAA)、トロポニンI (TN I)、血小板由来成長因子 (PDGF)、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、SV40、ポリオーマ、レトロウイルス、パピローマウイルス、B型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、ならびにテナガザル白血病ウイルスであってよい。

【0108】

いくつかの態様において、誘導性エレメントを使用してよい。いくつかの態様において、誘導性エレメントは、例えば、MTII、MMTV (マウス乳腺腫瘍ウイルス)、 γ -インターフェロン、アデノウイルス5 E2、コラゲナーゼ、ストロメリシン、SV40、ネズミ科MX遺伝子、GRP78遺伝子、 α -2-マクログロブリン、ビメンチン、MHCクラスI遺伝子H-2 b、HSP70、プロリフェリン、腫瘍壊死因子、および/または甲状腺刺激ホルモン 遺伝子である。いくつかの態様において、誘導因子は、ホルボールエステル (TFA)、重金属、糖質コルチコイド、ポリ (rI) x、ポリ (rc)、EIA、ホルボールエステル (TPA)、インターフェロン、ニューカッスル病ウイルス、A23187、IL-6、血清、インターフェロン、SV40巨大T抗原、PMA、および/または甲状腺ホルモンである。本明細書に記載の誘導性エレメントのいずれかを本明細書に記載の誘導因子のいずれかと共に使用してよい。

【0109】

以下は、発現構築物において関心対象の遺伝子をコードする核酸と組み合わせて使用できるプロモーター/エンハンサーおよび誘導性プロモーター/エンハンサーの一覧である。加えて、あらゆるプロモーター/エンハンサー組み合わせ (Eukaryotic Promoter Data Base EPDBによる) を遺伝子の発現を駆動するために使用することもできる。真核細胞は、送達複合体の一部としてまたは追加の遺伝子発現構築物として適切な細菌ポリメラーゼが提供されれば、ある特定の細菌プロモーターからの細胞質転写を支援することができる。

【0110】

特に興味深いものは、筋肉特異的プロモーターである。これらは、ミオシン軽鎖-2プロモーター、 α -アクチンプロモーター、トロポニン1プロモーター； $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体プロモーター、ジストロフィンプロモーター、 γ インテグリンプロモーター、脳性ナトリウム利尿ペプチドプロモーターおよび B-クリスタリン/低分子量熱ショックタンパク質プロモーター、 β -ミオシン重鎖プロモーター、ならびにANFプロモーターを含む。

【0111】

いくつかの態様において、本開示のCpf1-gRNA構築物は、筋細胞特異的プロモーターによって発現される。この筋細胞特異的プロモーターは、構成的に活性なプロモーターであっても、誘導性プロモーターであってもよい。

【0112】

cDNAインサートが用いられる場合、典型的には、遺伝子転写物の適正なポリアデニル化を達成するため、ポリアデニル化シグナルを含めることが望ましい。ポリアデニル化シグ

10

20

30

40

50

ナルの性質は、本明細書に開示の方法の実施の成功にとって重大ではないと考えられ、ヒト成長ホルモンおよびSV40ポリアデニル化シグナルなどの任意のそのような配列を用いてよい。また、ターミネーターも発現カセットのエLEMENTとして想定される。これらのELEMENTは、メッセージレベルを増強し、カセットから他の配列へのリードスルーを最小限に抑えるために役立つことができる。

【0113】

B. 2Aペプチド

本発明者は、昆虫ウイルスであるトセア・アシグナ (Thosea asigna) 由来の2A様自己切断ドメイン (TaV 2Aペプチド; SEQ ID NO.444; EGRGSLTTCGDVEENPGP) を利用する。これらの2A様ドメインは、真核生物全体で機能することが示されており、アミノ酸の切断を、2A様ペプチドドメイン内で同時翻訳的に起こさせる。それ故、TaV 2Aペプチドを含めることで、単一のmRNA転写物から複数のタンパク質の発現が可能となる。重要なことに、真核生物系で試験したとき、TaVのドメインは、99%を超える切断活性を示した (Donnelly et al., 2001)。他の許容される2A様ペプチドは、ウマ鼻炎Aウイルス (ERAV) 2Aペプチド

10

(SEQ ID NO. 445; QCTNYALLKLAGDVESNPGP)

、ブタテシオウイルス-1 (PTV1) 2Aペプチド

(SEQ ID NO. 446; ATNFSLLKQAGDVEENPGP)

および口蹄疫ウイルス (FMDV) 2Aペプチド

(SEQ ID No. 447; PVKQLLNFDLLKLAGDVESNPGP)

20

またはそれらの修飾型バージョンを含むが、これらに限定されない。

【0114】

いくつかの態様において、2Aペプチドを使用して、レポーターおよびCfp1を同時に発現させる。レポーターは、例えば、GFPであってよい。

【0115】

使用し得る他の自己切断ペプチドは、核封入タンパク質a (Nia) プロテアーゼ、P1プロテアーゼ、3Cプロテアーゼ、Lプロテアーゼ、3C様プロテアーゼ、またはそれらの修飾型バージョンを含むが、これらに限定されない。

【0116】

C. 発現ベクターの送達

30

発現ベクターを細胞に導入できる多数の方法が存在する。ある特定の態様において、発現構築物は、ウイルス、またはウイルスゲノムに由来する改変された構築物を含む。受容体媒介性エンドサイトーシスを介して細胞に侵入し、宿主細胞ゲノムに組み込まれ、ウイルス遺伝子を安定的かつ効率的に発現することができる特定のウイルスは、哺乳動物細胞に外来遺伝子を移入するための魅力的な候補である。これらは、比較的低い外来DNA配列の収容量を有し、限定された宿主範囲を有する。さらに、許容細胞における発がん潜在性および細胞変性効果は、安全性の問題を提起する。これらは、8kBまでの外来遺伝物質しか収容できないが、種々の細胞株および実験動物に容易に導入することができる。

【0117】

インビボ送達のための好ましい方法の1つは、アデノウイルス発現ベクターの使用を伴う。「アデノウイルス発現ベクター」は、(a) 構築物のパッケージングを支援すること、および (b) その中にクローニングされたアンチセンスポリヌクレオチドを発現することに十分な、アデノウイルス配列を含有する構築物を含むことを意味する。これに関して、発現は、遺伝子産物が合成されることを必要としない。

40

【0118】

発現ベクターは、遺伝子改変された形態のアデノウイルスを含む。36kBの直鎖状二本鎖DNAウイルスであるアデノウイルスの遺伝子組織化に関する知識は、アデノウイルスDNAの大断片を7kBまでの外来配列で置換することを可能にする。レトロウイルスとは対照的に、アデノウイルスDNAは、潜在的な遺伝毒性なしに、エピソーム様式で複製できるため、宿主細胞のアデノウイルス感染は、染色体組み込みをもたらさない。また、アデノウイル

50

スは、構造的に安定しており、広範な増幅の後にもゲノム再編成は検出されていない。アデノウイルスは、細胞周期に関わらず、事実上全ての上皮細胞に感染することができる。現在のところ、アデノウイルス感染は、ヒトにおいて急性呼吸器疾患などの軽度の疾患にのみ関連付けられているようである。

【0119】

アデノウイルスは、ゲノムのサイズが中程度であり、操作が容易であり、力価が高く、標的細胞範囲が広く、感染性が高いため、遺伝子移入ベクターとして使用するのに特に適している。ウイルスゲノムの両端は、ウイルスDNAの複製およびパッケージングに必要なシスエレメントである100~200塩基対逆方向反復(ITR)を含有する。ゲノムの初期(E)領域および後期(L)領域は、ウイルスDNA複製の開始によって分割される異なる転写単位を含有する。E1領域(E1AおよびE1B)は、ウイルスゲノムおよび少数の細胞遺伝子の転写の調節を担うタンパク質をコードする。E2領域(E2AおよびE2B)の発現は、ウイルスDNA複製のためのタンパク質の合成をもたらす。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子発現、および宿主細胞シャットオフに関与している。ウイルスカプシドタンパク質の大半を含む後期遺伝子の産物は、主要後期プロモーター(MLP)によって生じた単一の一次転写物の有意なプロセッシングの後にのみ発現される。MLP(16.8 m.u.に位置する)は、感染の後期に特に効率的であり、このプロモーターから生じたmRNAは全て、5'トリパータイトリーダー(TPL)配列を保有しており、このため翻訳のための好ましいmRNAである。

10

【0120】

あるシステムにおいて、組換えアデノウイルスは、シャトルベクターとプロウイルスベクターとの間の相同組換えから生成される。2種のプロウイルスベクター間の可能性のある組換えのため、このプロセスから野生型アデノウイルスが生成され得る。それ故、個々のプラークからウイルスの単一クローンを単離し、そのゲノム構造を調査することが重要である。

20

【0121】

複製欠損性である現在のアデノウイルスベクターの生成および増殖は、Ad5 DNA断片によってヒト胎児腎細胞から形質転換され、E1タンパク質を構成的に発現する、293と名付けられたユニークなヘルパー細胞株に依存する。E3領域は、アデノウイルスゲノムにとって不可欠でないため、現在のアデノウイルスベクターは、293細胞の補助により、E1領域、D3領域のいずれかまたは両方に外来DNAを保持する。本来、アデノウイルスは、野生型ゲノムのおよそ105%をパッケージングすることができ、それによって、約2kb余分のDNAを収容できる。E1領域およびE3領域において置換可能なおよそ5.5kbのDNAと組み合わせると、現在のアデノウイルスベクターの最大収容量は、7.5kb、またはベクターの全長の約15%未満である。アデノウイルスのウイルスゲノムの80%超が、ベクター骨格に残存し、ベクター媒介性の細胞傷害の起源となる。また、E1欠失ウイルスの複製欠損は不完全である。

30

【0122】

ヘルパー細胞株は、ヒト胎児腎細胞、筋細胞、造血細胞、または他のヒト胎児間葉系もしくは上皮系細胞などのヒト細胞に由来してよい。あるいは、ヘルパー細胞は、ヒトアデノウイルスに許容性の他の哺乳動物種の細胞に由来してもよい。そのような細胞は、例えば、Vero細胞または他のサル胎仔間葉系もしくは上皮系細胞を含む。上述の通り、好ましいヘルパー細胞株は、293である。

40

【0123】

Racher et al. (1995) は、293細胞を培養し、アデノウイルスを増殖させるための、改善された方法を開示した。あるフォーマットにおいて、培地100~200mlを含有する1リットルのシリコン処理スピナーフラスコ(Techne, Cambridge, UK)へ個々の細胞を接種することによって、天然細胞凝集物を成長させる。40rpmで撹拌した後、細胞生存能をトリパンブルーにより推定する。別のフォーマットにおいて、Fibra-Celマイクロキャリア(Bibby Sterlin, Stone, UK) (5g/l) を以下の通り用いる。培地5mlに再懸濁した細胞接種材料を、250mlの三角フラスコ内の担体(50ml)へ添加し、1~4時間、時々撹拌しながら

50

、静置する。次いで、培地を新鮮な培地50mlに交換し、振盪を開始する。ウイルス産生のため、細胞を、約80%コンフルエントにまで増殖させ、その後、培地を交換し(最終体積の25%に)、アデノウイルスを0.05のMOIで添加する。培養物を一晩静置し、その後、体積を100%に増加させ、さらに72時間、振盪を開始する。

【0124】

本開示のアデノウイルスは、複製欠損性であるかまたは少なくとも条件付きで複製欠損性である。アデノウイルスベクターが複製欠損性であるか、または少なくとも条件付きで欠損性である要件以外、アデノウイルスベクターの性質は、本明細書に開示の方法の実施の成功にとって重要ではないと考えられる。アデノウイルスは、42種類の異なる公知の血清型またはサブグループA~Fのいずれかのものであってよい。サブグループCの5型アデノウイルスは、本開示において使用するための条件付き複製欠損アデノウイルスベクターを得るための好ましい出発材料である。

10

【0125】

上述の通り、本開示に係る典型的なベクターは、複製欠損性であり、アデノウイルスE1領域を有しない。したがって、E1コード配列が除去された位置に、関心対象の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを導入することが、最も便利である。しかしながら、アデノウイルス配列内の構築物の挿入の位置は重要ではない。Karlsson et al. (1986) により記載されている通り、E3置換ベクターの欠失E3領域の代わりに、またはヘルパー細胞株もしくはヘルパーウイルスがE4欠損を補完するE4領域に、関心対象の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを挿入してもよい。

20

【0126】

アデノウイルスは、増殖および操作が容易であり、インビトロおよびインビボで広い宿主範囲を示す。このウイルス群は、高い力価、例えば、1ml当たり $10^9 \sim 10^{12}$ のプラーク形成単位で得ることができ、高度に感染性である。アデノウイルスの生活環は、宿主細胞ゲノムへの組み込みを必要としない。アデノウイルスベクターによって送達される外来遺伝子は、エピソードであり、それ故、宿主細胞に対して低い遺伝毒性を有する。野生型アデノウイルスを用いた予防接種の研究において、副作用は報告されておらず(Couch et al., 1963; Top et al., 1971)、このことは、インビボ遺伝子移入ベクターとしての安全性および治療的潜在性を実証している。

30

【0127】

アデノウイルスベクターは、真核生物遺伝子発現およびワクチン開発において使用されている。動物研究は、組換えアデノウイルスが遺伝子治療にも使用できることを示唆した。異なる組織への組換えアデノウイルスの投与における研究は、気管滴注、筋肉注射、末梢静脈内注射、および脳への定位接種を含む。

【0128】

レトロウイルスは、逆転写のプロセスによって感染細胞においてそれらのRNAを二本鎖DNAへ変換できることを特徴とする、一本鎖RNAウイルスの一群である。次いで、生じたDNAは、プロウイルスとして細胞染色体へ安定的に組み込まれ、ウイルスタンパク質の合成を指令する。組み込みは、レシピエント細胞およびその子孫におけるウイルス遺伝子配列の保持をもたらす。レトロウイルスゲノムは、カプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素、およびエンベロープ成分をそれぞれコードする3種の遺伝子gag、pol、およびenvを含有する。gag遺伝子から上流に見いだされる配列は、ゲノムのビリオンへのパッケージングのためのシグナルを含有する。2つの長い末端反復(LTR)配列が、ウイルスゲノムの5'端および3'端に存在する。これらは、強力なプロモーター配列およびエンハンサー配列を含有し、宿主細胞ゲノムへの組み込みのためにも必要とされる。

40

【0129】

レトロウイルスベクターを構築するために、ある特定のウイルス配列の代わりに、関心対象の遺伝子をコードする核酸をウイルスゲノムに挿入し、複製欠損性であるウイルスを生産する。ビリオンを生産するため、gag遺伝子、pol遺伝子、およびenv遺伝子を含有するがLTRおよびパッケージング成分を有しないパッケージング細胞株を構築する。レトロ

50

ウイルスLTRおよびパッケージング配列と一緒にcDNAを含有する組換えプラスミドをこの細胞株に導入したとき（例えば、リン酸カルシウム沈殿によって）、パッケージング配列は、組換えプラスミドのRNA転写物がウイルス粒子へパッケージングされることを可能にし、次いで、それが培養培地へ分泌される。次いで、組換えレトロウイルスを含有する培地を収集し、場合により濃縮し、遺伝子移入のために使用する。レトロウイルスベクターは、多種多様な細胞タイプに感染することができる。しかしながら、組み込みおよび安定的発現は、宿主細胞の分裂を必要とする。

【0130】

ウイルスエンベロープへの乳糖残基の化学的付加によるレトロウイルスの化学的修飾に基づいて、レトロウイルスベクターの特異的なターゲティングを可能にするように設計された新規アプローチが最近開発された。この修飾は、シアロ糖タンパク質受容体を介した肝細胞の特異的感染を可能とすることもできる。

10

【0131】

レトロウイルスエンベロープタンパク質および特異的細胞受容体に対するビオチン化抗体が使用される、組換えレトロウイルスのターゲティングのための異なるアプローチを使用してよい。抗体は、ストレプトアビジンを使用することによってビオチン成分を介してカップリングされる。主要組織適合複合体クラスI抗原およびクラスII抗原に対する抗体を使用することで、それらの表面抗原を保有する種々のヒト細胞へのエコトロピックウイルスのインビトロ感染が実証された（Roux et al., 1989）。

【0132】

本開示の全ての局面において、レトロウイルスベクターの使用に関してある特定の制限がある。例えば、レトロウイルスベクターは、通常、細胞ゲノム内のランダムな部位に組み込まれる。これは、宿主遺伝子の中断を通してまたはウイルス調節配列の挿入を通して挿入変異誘発を導くことができ、これが隣接遺伝子の機能に干渉し得る。欠損レトロウイルスベクターの使用に関する別の懸念は、パッケージング細胞における複製能を有する野生型ウイルスの潜在的な出現である。これは、宿主細胞ゲノムに組み込まれたgag配列、pol配列、env配列の上流に組換えウイルス由来のインタクトな配列を挿入する、組換え事象からもたらされ得る。しかしながら、組換えの可能性を大幅に減少させるはずである新たなパッケージング細胞株が、現在入手可能である（例えば、Markowitz et al., 1988; Hersdorffer et al., 1990を参照のこと）。

20

30

【0133】

他のウイルスベクターを本開示において発現構築物として用いてよい。ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、およびヘルペスウイルスなどのウイルスに由来するベクターを用いてよい。これらは、様々な哺乳動物細胞のためのいくつかの魅力的な特徴を提供する。

【0134】

複数の態様において、AAVベクターは、複製欠損体または条件付き複製欠損性である。複数の態様において、AAVベクターは、組換えAAVベクターである。いくつかの態様において、AAVベクターは、血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、またはそれらの任意の組み合わせのAAVベクターから単離されるかまたはそれに由来する配列を含む。いくつかの態様において、AAVベクターは、AAV9ベクターではない。

40

【0135】

いくつかの態様において、単一のウイルスベクターを使用して、Cpf1および少なくとも1つのgRNAをコードする核酸を細胞に送達する。いくつかの態様において、第一のウイルスベクターを使用してCpf1が細胞に提供され、第二のウイルスベクターを使用して少なくとも1つのgRNAが細胞に提供される。センスまたはアンチセンスの遺伝子構築物の発現を達成するために、発現構築物を細胞へ送達しなければならない。細胞は、筋細胞、衛星細胞、メサンジオブラスト（mesangioblast）、骨髄由来細胞、間質細胞、または間葉系幹細胞であってよい。複数の態様において、細胞は、心筋細胞、骨格筋細胞、または平滑筋

50

細胞である。複数の態様において、細胞は、前脛骨筋、大腿四頭筋、ヒラメ筋、隔膜、または心臓における細胞である。いくつかの態様において、細胞は、人工多能性幹細胞（iPSC）または内部細胞塊細胞（iCM）である。さらなる態様において、細胞は、ヒトiPSCまたはヒトiCMである。いくつかの態様において、本開示のヒトiPSCまたはヒトiCMは、培養幹細胞株、成人幹細胞、胎盤幹細胞に由来しても、ヒト胚の破壊を必要としない成人または胚性幹細胞の別の起源に由来してもよい。細胞への送達は、細胞株の形質転換のための実験手順の場合のようにインビトロで達成しても、特定の疾患状態の処置の場合のようにインビボまたはエクスビボで達成してもよい。1つの送達機構は、発現構築物が感染性のウイルス粒子にカプセル封入されるウイルス感染を介する。

【0136】

培養哺乳動物細胞への発現構築物の移入のためのいくつかの非ウイルス法も本開示によって想定される。これらは、リン酸カルシウム沈殿（Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990）、DEAE-デキストラン（Gopal, 1985）、エレクトロポレーション（Tur-Kaspa et al., 1986; Potter et al., 1984）、直接マイクロインジェクション（Harland and Weintraub, 1985）、DNA負荷リボソーム（Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979）およびリポフェクタミン-DNA複合体、細胞超音波処理（Fechheimer et al., 1987）、高速度微粒子弾を使用した遺伝子銃（Yang et al., 1990）、ならびに受容体媒介性トランスフェクション（Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988）を含む。これらの技術のいくつかを、インビボまたはエクスビボ使用にうまく適合させ得る。

【0137】

発現構築物を細胞に送達したら、関心対象の遺伝子をコードする核酸を、異なる部位において位置付けおよび発現してよい。ある特定の態様において、遺伝子をコードする核酸を、細胞のゲノムへ安定的に組み込んでよい。この組み込みは、相同組み換え（遺伝子置換）を介して類似の位置および方向であっても、ランダムな非特異的位置に組み込んでよい（遺伝子強化）。なおさらなる態様において、核酸を、DNAの別個のエピソームセグメントとして細胞内に安定的に維持してよい。そのような核酸セグメントまたは「エピソーム」は、宿主細胞周期と無関係にまたは同期的に、維持および複製させるのに十分な配列をコードする。どのように発現構築物が細胞へ送達されるか、および細胞内のどこに核酸が残存するかは、用いられる発現構築物のタイプに依存する。

【0138】

なお別の態様において、発現構築物は、単純に裸の組換えDNAまたはプラスミドからなっているてもよい。構築物の移入は、物理的にまたは化学的に細胞膜を透過処理する前述の方法のいずれかによって実施してよい。これは、インビトロ移入に特に適用可能であるが、インビボ使用にも同様に適用してもよい。Dubensky et al. (1984)は、ポリオーマウイルスDNAを、成体マウスおよび新生仔マウスの肝臓および脾臓に、リン酸カルシウム沈殿物の形態で注射することに成功したが、このことは、活発なウイルス複製および急性感染を実証している。Benvenisty and Neshif (1986)はまた、リン酸カルシウムで沈殿させたプラスミドの直接腹腔内注射が、トランスフェクトされた遺伝子の発現をもたらすことを実証した。また、関心対象の遺伝子をコードするDNAを、類似の様式でインビボ移入して、遺伝子産物を発現させてもよい。

【0139】

さらに別の態様において、細胞への裸のDNA発現構築物の移入は、粒子銃を含んでよい。この方法は、細胞膜を貫通し、細胞を死滅させることなく細胞に侵入することを可能にする高速度まで、DNAコート微粒子弾を加速させる能力に依存する。小さな粒子を加速させるためのいくつかの装置が開発されている。そのような装置の1つは、電流を発生させるために高電圧放出に依存し、次に、その電流が原動力を提供する（Yang et al., 1990）。使用される微粒子弾は、タングステンまたは金のビーズなどの生物学的に不活性な物質からなる。

【0140】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、発現構築物は、対象の肝臓、皮膚、および/または筋組織に直接送達される。これは、銃と標的器官との間の任意の介在組織を排除するための、組織または細胞の外科的露出、すなわち、エキスピボ処置を必要し得る。この場合もやはり、特定の遺伝子をコードするDNAをこの方法を介して送達してもよく、なお本開示に組み入れられる。

【0141】

さらなる態様において、発現構築物をリボソーム中に捕捉させてよい。リボソームは、リン脂質二重膜および内部水性媒体を特徴とする小胞構造である。多層リボソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。これらは、リン脂質を過剰の水性溶液に懸濁させたときに自然に形成される。脂質成分が自己再配置を受けた後、閉じた構造を形成し、脂質二重層間に水および溶解した溶質を捕捉する。また、リボフェクタミン-DNA複合体も想定される。

10

【0142】

インビトロでの外来DNAのリボソーム媒介性核酸送達および発現は大きな成功を収めている。Wong et al., (1980)は、培養されたニワトリ胚細胞、HeLa細胞、および肝細胞がん細胞において、外来DNAのリボソーム媒介性送達および発現の実現可能性を実証した。Nicolau et al., (1987)は、静脈内注射後のラットにおいてリボソーム媒介性遺伝子移入の達成に成功した。Lipofectamine 2000 (商標)として公知の試薬が広く使用され、市販されている。

20

【0143】

ある特定の態様において、リボソームを血球凝集性ウイルス(HVJ)と複合体化してよい。これは、細胞膜との融合を容易にし、リボソームにカプセル封入されたDNAの細胞侵入を促進することが示されている。他の態様において、リボソームを、核の非ヒストン染色体タンパク質(HMG-1)と複合体化しても、一緒に使用してもよい。なおさらなる態様において、リボソームを、HVJおよびHMG-1の両方と複合体化しても、一緒に使用してもよい。そのような発現構築物は、インビトロおよびインビボでの核酸の移入および発現での使用に成功しており、これらを本開示に適用可能である。細菌プロモーターがDNA構築物において用いられる場合、リボソーム内に適切な細菌ポリメラーゼを含めることも望ましい。

30

【0144】

特定の遺伝子をコードする核酸を細胞へ送達するために用いることができる他の発現構築物は、受容体媒介性送達ビヒクルである。これらは、ほぼ全ての真核細胞において受容体媒介性エンドサイトーシスによる巨大分子の選択的取り込みを利用する。様々な受容体の細胞タイプ特異的な分布のため、送達は高度に特異的であることができる。

40

【0145】

受容体媒介性遺伝子ターゲティングビヒクルは一般に、細胞受容体特異的なリガンドおよびDNA結合剤の2種の成分からなる。いくつかのリガンドが、受容体媒介性遺伝子移入のために使用されている。最も広範に特徴付けられているリガンドは、アシアロオロソムコイド(ASOR)およびトランスフェリンである。ASORと同じ受容体を認識する合成ネオ糖タンパク質が遺伝子送達ビヒクルとして使用されており、また、上皮増殖因子(EGF)も扁平上皮がん細胞へ遺伝子を送達するために使用されている。

40

【0146】

IV. 薬学的組成物および送達法

臨床適用のために、薬学的組成物が、意図する適用に適した形態で調製される。一般に、これは、発熱性物質およびヒトまたは動物にとって有害であり得る他の不純物を本質的に含まない組成物を調製することを要する。

【0147】

薬物、タンパク質、または送達ベクターを安定化し、標的細胞による取り込みを可能にするため、適切な塩および緩衝液が使用される。本開示の水性組成物は、薬学的に許容される担体または水性媒体に溶解または分散された有効量の薬物、ベクター、またはタンバ

50

ク質を含む。「薬学的にまたは薬理学的に許容される」という語句は、動物またはヒトに投与されたときに有害反応、アレルギー反応、または他の不都合な反応を生じない分子実体および組成物を指す。本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、ヒトへの投与に適した医薬などの医薬の製剤化において使用するために許容される、溶媒、緩衝液、溶液、分散媒、コーティング剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および作用物質の使用は、当技術分野において周知である。治療用組成物における使用において、本開示の活性成分と非適合性でないあらゆる慣用の媒体または作用物質を使用してよい。組成物のベクターまたは細胞を不活化しない条件で、補足的な活性成分を組成物に組み込むこともできる。

【0148】

いくつかの態様において、本開示の活性組成物は、従来の薬学的調製物を含む。本開示に係るこれらの組成物の投与は、標的組織が任意の一般的な経路を介して利用可能である限り、その経路を介するものであってよいが、一般には全身投与を含む。これは、経口、経鼻、または経頬を含む。あるいは、投与は、皮内注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射、もしくは静脈内注射によっても、筋組織への直接注射によってもよい。前述のように、そのような組成物は、通常、薬学的に許容される組成物として投与される。

【0149】

活性化化合物は、非経口投与されても腹腔内投与されてもよい。例として、遊離塩基または薬理学的に許容される塩としての活性化化合物の溶液を、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合された水中で調製することができる。グリセロール、液体

【0150】

注射可能な使用に適した薬学的形態は、例えば、無菌の水性の溶液または分散液、および無菌の注射可能な溶液または分散液の即時調製のための無菌の粉末を含む。一般に、これらの調製物は、無菌であり、容易な注射可能性が存在する程度に流動性である。調製物は、製造および保管条件下で安定であるべきであり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されるべきである。適切な溶媒または分散媒は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、および植物油を含有してよい。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散液の場合には必要とされる粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン類、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射可能組成物の吸収の延長は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に使用することによってもたらされ得る。

【0151】

無菌の注射可能溶液は、活性化化合物を適切な量で、所望により任意の他の成分（例えば、上に列挙した通り）と共に、溶媒に組み込み、続いて、濾過滅菌することによって調製してよい。一般に、分散液は、例えば上に列挙した通りの基本的な分散媒および所望の他の成分を含有する無菌の媒体に、様々な滅菌された活性成分を組み込むことによって調製される。無菌の注射可能溶液の調製のための無菌の粉末の場合、好ましい調製の方法は、事前に滅菌濾過された溶液から活性成分と任意の追加の所望の成分との粉末を与える、真空乾燥および凍結乾燥の技術を含む。

【0152】

いくつかの態様において、本開示の組成物は、中性または塩の形態で製剤化される。薬学的に許容される塩は、例えば、無機酸（例えば、塩酸もしくはリン酸）からまたは有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など）から得られる、酸付加塩（タン

10

20

30

40

50

パク質の遊離アミノ基と形成される)を含む。また、タンパク質の遊離カルボキシル基と形成される塩を、無機塩基(例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、もしくは水酸化鉄)からまたは有機塩基(例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなど)から得ることもできる。

【0153】

製剤化の後、溶液は、好ましくは、投薬製剤と適合性の様式で、かつ、治療的に有効であるような量で投与される。製剤は、注射可能溶液、薬物放出カプセルなどのような種々の剤形で容易に投与してよい。水性溶液での非経口投与のために、例えば、溶液は、一般に、適切に緩衝され、最初に、液体希釈剤が、例えば、十分な生理食塩水またはグルコースで等張にされる。そのような水性溶液を、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与に使用してよい。好ましくは、特に本開示に照らして、当業者に公知であるような無菌の水性媒体が用いられる。例として、単一用量を、等張NaCl溶液1mlに溶解し、皮下注入液1000mlに添加しても、提案された注入部位に注射してもよい(例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580を参照のこと)。処置される対象の状態に応じて、投薬量のある程度の変動が必然的に起こる。いずれにしても、投与責任者が、個々の対象のための適切な用量を決める。さらに、ヒトへの投与のために、調製物は、FDA Office of Biologics standardsによって必要とされるような無菌性、発熱性、一般的安全性、および純度の基準を満たすべきである。

10

【0154】

いくつかの態様において、本明細書に記載のCpf1およびgRNAを、養子細胞移入(ACT)を使用して患者に送達してよい。養子細胞移入では、1つまたは複数の発現構築物が、患者を起源とする細胞(自己由来)または患者以外の1つまたは複数の個体を起源とする細胞(同種異系)にエキスピボで提供される。細胞は、その後、患者に導入されるかまたは再導入される。したがって、いくつかの態様において、Cpf1およびジストロフィンスプライス部位を標的とするガイドRNAをコードする1つまたは複数の核酸が、細胞が患者に導入されるかまたは再導入される前に、細胞にエキスピボで提供される。

20

【0155】

V. 配列の表

以下の表は、本明細書に開示の組成物および方法と一緒に使用するための例示的なプライマー配列およびgRNA配列を提供する。

30

【0156】

(表C)プライマー配列

	プライマー名		プライマー配列
pCpf1-2A-GFPのための クローニングプライマー	AgeI-nLbCpf1-F1	F	tttttttcaggttGGaccggtgccaccATGAGCAAGCTGGA (SEQ ID NO: 8)
	nLbCpf1-R1	R	TGGGGTTATAGTAGGCCATCCACTTC (SEQ ID NO: 9)
	nLbCpf1-F2	F	GATGGCCTACTATAACCCAGCG (SEQ ID NO: 10)
	nLbCpf1-R2	R	GGCATAGTCGGGGACATCATATG (SEQ ID NO: 11)
	AgeI-nAsCpf1-F1	F	tttttttcaggttGGaccggtgccaccATGACACAGTTTCGAG (SEQ ID NO: 12)
	nAsCpf1-R1	R	TCCTTCTCAGGATTGTTTCAGGTCGTA (SEQ ID NO: 13)
	nAsCpf1-F2	F	CTGAACAATCCTGAGAAGGAGCC (SEQ ID NO: 14)
	nAsCpf1-R2	R	GGCATAGTCGGGGACATCATATG (SEQ ID NO: 11)
	nCpf1-2A-GFP-F	F	ATGATGTCCCGACTATGCCgaattcGGCAGTGGAGAGGG (SEQ ID NO: 15)
	nCpf1-2A-GFP-R	R	AGCGAGCTCTAGttagaattcCTTGTACAG (SEQ ID NO: 16)
LbCpf1 mRNAの インビトロ転写	T7-Scaffold-F	F	CACCAGCGCTGCTTAATACGACTCACTATAGGGAAAT (SEQ ID NO: 17)
	T7-Scaffold-R	R	AGTAGCGCTTCTAGACCTCACTTCCCTACTCAG (SEQ ID NO: 18)
			AGAAGAAATATAAGACTCGAGgccaccATGAGCAAGCTGGAGAAGTTTAC (SEQ ID NO: 19)
	T7-nLb-F1	F	
	T7-nLb-R1	R	TGGGGTTATAGTAGGCCATCC (SEQ ID NO: 20)
	T7-nLb-NLS-F2	F	GATGGCCTACTATAACCCAGCG (SEQ ID NO: 10)
	T7-nLb-NLS-R2	R	CCCGCAGAAGGCAGCGTCGACTTAGGCATAGTCGGGGACATCATATG (SEQ ID NO: 21)
			AGAAGAAATATAAGACTCGAGgccaccATGACACAGTTTCGAGGGCTTTAC (SEQ ID NO: 22)
	T7-nAs-F1	F	
	T7-nAs-R1	R	TCCTTCTCAGGATTGTTTCAGGTCGTA (SEQ ID NO: 13)
ヒトDMDエクソン51 gRNA		F	CTGAACAATCCTGAGAAGGAGCC (SEQ ID NO: 14)
		R	CCCGCAGAAGGCAGCGTCGACTTAGGCATAGTCGGGGACATCATATG (SEQ ID NO: 21)
	nLb-DMD-E51-g1-Top	F	CACCGTAATTTCTACTAAGTGTAGATgCTCCTACTCAGACTGTTACTCTGTTTTTTT (SEQ ID NO: 23)
	nLb-DMD-E51-g1-Bot	R	AAACAAAAAACAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGcATCTACACTTAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 24)
	nLb-DMD-E51-g2-Top	F	CACCGTAATTTCTACTAAGTGTAGATtaccatgtattgctaataaaagtaTTTTTTT (SEQ ID NO: 25)
	nLb-DMD-E51-g2-Bot	R	AAACAAAAAAtactttgttttagcaatacatggtaATCTACACTTAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 26)
	nLb-DMD-E51-g3-Top	F	CACCGTAATTTCTACTAAGTGTAGATattgaagagtaacaatttgagccaTTTTTTT (SEQ ID NO: 27)
	nLb-DMD-E51-g3-Bot	R	AAACAAAAAAtggctcaaattgttactcttcaatATCTACACTTAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 28)
	nAs-DMD-E51-g1-Top	F	CACCGTAATTTCTACTCTTGTAGATgCTCCTACTCAGACTGTTACTCTGTTTTTTT (SEQ ID NO: 29)
	nAs-DMD-E51-g1-Bot	R	AAACAAAAAACAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGcATCTACAAGAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 30)
ヒトDMDエクソン51 T7E1	DMD-E51-T7E1-F1	F	Ttccctggcaaggtctga (SEQ ID NO: 31)
	DMD-E51-T7E1-R1	R	ATCCTCAAGGTCACCCACC (SEQ ID NO: 32)
ヒト心筋細胞 RT-PCR	Riken51-RT-PCR-F1	F	CCCAGAAGACCAAGATAAACTTGAA (SEQ ID NO: 1)
	Riken51-RT-PCR-R1	R	CTCTGTTCCAAATCCTGCATTGT (SEQ ID NO: 33)
ヒト心筋細胞 mtDNAコピー数 qPCR	hmtND1-qF1	F	CGCCACATCTACCATCACCTC (SEQ ID NO: 3)
	hmtND1-qR1	R	CGGCTAGGCTAGAGGTGGCTA (SEQ ID NO: 4)
	hLPL-qF1	F	GAGTATGCAGAAGCCCCGAGTC (SEQ ID NO: 5)
	hLPL-qR1	R	TCAACATGCCCAACTGGTTTCTGG (SEQ ID NO: 6)

10

20

30

	プライマー名		プライマー配列
マウスDmd エクソン23 gRNA	nLb-dmd-E23-g1-Top	F	CACCGTAATTTCTACTAAGTGTAGATaggctctgcaaagttctTTGAAAGTTTTTTT (SEQ ID NO: 34)
	nLb-dmd-E23-g1-Bot	R	AAACAAAAAACTTTCAAagaactttgcagagcctATCTACACTTAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 35)
	nLb-dmd-E23-g2-Top	F	CACCGTAATTTCTACTAAGTGTAGATAAAGAGCAACAAATGGCttcaacTTTTTTT (SEQ ID NO: 36)
	nLb-dmd-E23-g2-Bot	R	AAACAAAAAAggttgaaGCCATTTTGTGCTCTTTATCTACACTTAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 37)
	nLb-dmd-E23-g2-Top	F	CACCGTAATTTCTACTAAGTGTAGATAAAGAGCAAAATAATGGCttcaacTTTTTTT (SEQ ID NO: 38)
	nLb-dmd-E23-g2-Bot	R	AAACAAAAAAggttgaaGCCATTTTATGCTCTTTATCTACACTTAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 39)
	nLb-dmd-E23-g3-Top	F	CACCGTAATTTCTACTAAGTGTAGATAAAGAACTTTGCAGAGCctcaaaaTTTTTTT (SEQ ID NO: 40)
	nLb-dmd-E23-g3-Bot	R	AAACAAAAAAAttttgagGCTCTGCAAAGTTCTTTATCTACACTTAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 41)
	nLb-dmd-I22-g1-Top	F	CACCGTAATTTCTACTAAGTGTAGATctgaatatctatgcattaataactTTTTTTT (SEQ ID NO: 42)
	nLb-dmd-I22-g1-Bot	R	AAACAAAAAAAgttattaatgcatagatatcagATCTACACTTAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 43)
	nLb-dmd-I22-g2-Top	F	CACCGTAATTTCTACTAAGTGTAGATtattatattacagggcatattataTTTTTTT (SEQ ID NO: 44)
	nLb-dmd-I22-g2-Bot	R	AAACAAAAAAAtataatagccctgtaataataATCTACACTTAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 45)
	nLb-dmd-I23-g3-Top	F	CACCGTAATTTCTACTAAGTGTAGATAGgtaagccgaggtttggcctttaTTTTTTT (SEQ ID NO: 46)
	nLb-dmd-I23-g3-Bot	R	AAACAAAAAAAtaaggccaaacctcggttacCTATCTACACTTAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 47)
	nLb-dmd-I23-g4-Top	F	CACCGTAATTTCTACTAAGTGTAGATcccagagtccttcaaagatatgaTTTTTTT (SEQ ID NO: 48)
	nLb-dmd-I23-g4-Bot	R	AAACAAAAAAAtcaatatctttgaaggactctgggATCTACACTTAGTAGAAATTAC (SEQ ID NO: 49)
LbCpf1 gRNAの イントロ転写	T7-Lb-dmd-E23-uF	F	GAATTGTAATACGACTCACTATAGGGTAATTTCTACTAAGTGTAGAT (SEQ ID NO: 50)
	T7-Lb-dmd-E23-g1-R	R	CTTTCAAagaactttgcagagcctATCTACACTTAGTAGAAATTA (SEQ ID NO: 51)
	T7-Lb-dmd-E23-mg2-R	R	GttgaaGCCATTTTATGCTCTTTATCTACACTTAGTAGAAATTA (SEQ ID NO: 52)
	T7-Lb-dmd-E23-g3-R	R	tttttgagGCTCTGCAAAGTTCTTTATCTACACTTAGTAGAAATTA (SEQ ID NO: 53)
	T7-Lb-dmd-I22-g2-R	R	tataatatgcccgtgaataataATCTACACTTAGTAGAAATTACCTATAGTGAG (SEQ ID NO: 54)
マウスDmd エクソン23 T7E1	T7-Lb-dmd-I22-g4-R	R	tcaatatctttgaaggactctgggATCTACACTTAGTAGAAATTACCTATAGTGAG (SEQ ID NO: 55)
	Dmd-E23-T7E1-F729	F	Gagaaacttctgtgatgtgaggacata (SEQ ID NO: 56)
	Dmd-E23-T7E1-R1	R	CAACCTCGGCTTACCTGAAAT (SEQ ID NO: 57)
	Dmd-E23-T7E1-R729	R	Caatatctttgaaggactctgggtaaa (SEQ ID NO: 58)
	Dmd-E23-T7E1-R3	R	Aattaatagaagtcaatgtaggaag (SEQ ID NO: 59)

10

20

30

【 0 1 5 7 】

(表 D) ゲノム標的配列

標的の gRNAエクソン	ガイド #	鎖	ゲノム標的配列*	PAM	SEQ ID NO.
ヒト-エクソン51	4	1	tcttttcttcttttctctttt	tttt	60
ヒト-エクソン51	5	1	cttttcttcttttctcttttG	tttt	61
ヒト-エクソン51	6	1	tttttcttcttttctcttttGC	tttc	62
ヒト-エクソン51	7	1	tcttcttttctcttttGCAAAA	tttt	63
ヒト-エクソン51	8	1	cttcttttctcttttGCAAAAA	tttt	64
ヒト-エクソン51	9	1	ttcttttctcttttGCAAAAAC	tttc	65
ヒト-エクソン51	10	1	ttcttttGCAAAAACCCAAAAT	tttt	66
ヒト-エクソン51	11	1	tccttttGCAAAAACCCAAAATA	tttt	67
ヒト-エクソン51	12	1	ccttttGCAAAAACCCAAAATAT	tttt	68
ヒト-エクソン51	13	1	cttttGCAAAAACCCAAAATATT	tttc	69
ヒト-エクソン51	14	1	tGCAAAAACCCAAAATATTTTAGC	tttt	70
ヒト-エクソン51	15	1	GCAAAAACCCAAAATATTTTAGCT	tttt	71
ヒト-エクソン51	16	1	CAAAAACCCAAAATATTTTAGCTC	tttG	72
ヒト-エクソン51	17	1	AGCTCCTACTCAGACTGTTACTCT	TTTT	73
ヒト-エクソン51	18	1	GCTCCTACTCAGACTGTTACTCTG	TTTA	74
ヒト-エクソン51	19	-1	CTTAGTAACCACAGGTGTGTCAC	TTTC	75
ヒト-エクソン51	20	-1	GAGATGGCAGTTTCCTTAGTAACC	TTTG	76
ヒト-エクソン51	21	-1	TAGTTTGGAGATGGCAGTTTCCTT	TTTC	77
ヒト-エクソン51	22	-1	TTCTCATACCTTCTGCTTGATGAT	TTTT	78
ヒト-エクソン51	23	-1	TCATTTTTTCTCATACCTTCTGCT	TTTA	79
ヒト-エクソン51	24	-1	ATCATTTTTTCTCATACCTTCTGC	TTTT	80
ヒト-エクソン51	25	-1	AAGAAAACTTCTGCCAACTTTTA	TTTA	81
ヒト-エクソン51	26	-1	AAAGAAAACTTCTGCCAACTTTT	TTTT	82
ヒト-エクソン51	27	1	TCTTTAAAATGAAGATTTTCCACC	TTTT	83
ヒト-エクソン51	28	1	CTTTAAAATGAAGATTTTCCACCA	TTTT	84
ヒト-エクソン51	29	1	TTTAAAATGAAGATTTTCCACCAA	TTTC	85
ヒト-エクソン51	30	1	AAATGAAGATTTTCCACCAATCAC	TTTA	86
ヒト-エクソン51	31	1	CCACCAATCACTTTACTCTCCTAG	TTTT	87
ヒト-エクソン51	32	1	CACCAATCACTTTACTCTCCTAGA	TTTC	88
ヒト-エクソン51	33	1	CTCTCCTAGACCATTTCACCAG	TTTA	89
ヒト-エクソン45	1	-1	agaaaagattaaacagtgtgtac	tttg	90
ヒト-エクソン45	2	-1	tttgagaaaagattaaacagtgtg	TTTa	91
ヒト-エクソン45	3	-1	atttgagaaaagattaaacagtgt	TTTT	92
ヒト-エクソン45	4	-1	Tatttgagaaaagattaaacagtg	TTTT	93
ヒト-エクソン45	5	1	atcttttctcaaatAAAAAGACAT	ttta	94
ヒト-エクソン45	6	1	ctcaaatAAAAAGACATGGGGCTT	tttt	95
ヒト-エクソン45	7	1	tcaaatAAAAAGACATGGGGCTTC	tttc	96

10

20

30

40

ヒト-エクソン45	8	1	TGTTTTGCCTTTTTGGTATCTTAC	TTTT	97	
ヒト-エクソン45	9	1	GTTTTGCCTTTTTGGTATCTTACA	TTTT	98	
ヒト-エクソン45	10	1	TTTTGCCTTTTTGGTATCTTACAG	TTTG	99	
ヒト-エクソン45	11	1	GCCTTTTTGGTATCTTACAGGAAC	TTTT	100	
ヒト-エクソン45	12	1	CCTTTTTGGTATCTTACAGGAAC	TTTG	101	
ヒト-エクソン45	13	1	TGGTATCTTACAGGAACCCAGGA	TTTT	102	
ヒト-エクソン45	14	1	GGTATCTTACAGGAACCCAGGAT	TTTT	103	
ヒト-エクソン45	15	-1	AGGATTGCTGAATTATTTCTTCCC	TTTG	104	
ヒト-エクソン45	16	-1	GAGGATTGCTGAATTATTTCTTCC	TTTT	105	
ヒト-エクソン45	17	-1	TGAGGATTGCTGAATTATTTCTTC	TTTT	106	10
ヒト-エクソン45	18	-1	CTGTAGAATACTGGCATCTGTTTT	TTTC	107	
ヒト-エクソン45	19	-1	CCTGTAGAATACTGGCATCTGTTT	TTTT	108	
ヒト-エクソン45	20	-1	TCCTGTAGAATACTGGCATCTGTT	TTTT	109	
ヒト-エクソン45	21	-1	CAGACCTCCTGCCACCGCAGATTC	TTTG	110	
ヒト-エクソン45	22	-1	TGTCTGACAGCTGTTTGCAGACCT	TTTC	111	
ヒト-エクソン45	23	-1	CTGTCTGACAGCTGTTTGCAGACC	TTTT	112	
ヒト-エクソン45	24	-1	TCTGTCTGACAGCTGTTTGCAGAC	TTTT	113	
ヒト-エクソン45	25	-1	TTCTGTCTGACAGCTGTTTGCAGA	TTTT	114	
ヒト-エクソン45	26	-1	ATTCCTATTAGATCTGTGCGCCCTA	TTTC	115	20
ヒト-エクソン45	27	-1	CATTCCTATTAGATCTGTGCGCCCT	TTTT	116	
ヒト-エクソン45	28	1	AGCAGACTTTTTAAGCTTTCTTTA	TTTT	117	
ヒト-エクソン45	29	1	GCAGACTTTTTAAGCTTTCTTTAG	TTTA	118	
ヒト-エクソン45	30	1	TAAGCTTTCTTTAGAAGAATATTT	TTTT	119	
ヒト-エクソン45	31	1	AAGCTTTCTTTAGAAGAATATTTT	TTTT	120	
ヒト-エクソン45	32	1	AGCTTTCTTTAGAAGAATATTTCA	TTTA	121	
ヒト-エクソン45	33	1	TTTAGAAGAATATTTTCATGAGAGA	TTTC	122	
ヒト-エクソン45	34	1	GAAGAATATTTTCATGAGAGATTAT	TTTA	123	
ヒト-エクソン44	1	1	TCAGTATAACCAAAAAATATACGC	TTTG	124	
ヒト-エクソン44	2	1	acataatccatctatcttctga	tttt	125	30
ヒト-エクソン44	3	1	cataatccatctatcttctgat	ttta	126	
ヒト-エクソン44	4	1	tcttgatccatgcttttACCTG	tttt	127	
ヒト-エクソン44	5	1	cttgatccatgcttttACCTGC	tttt	128	
ヒト-エクソン44	6	1	ttgatccatgcttttACCTGCA	tttc	129	
ヒト-エクソン44	7	-1	TCAACAGATCTGTCAAATCGCCTG	TTTC	130	
ヒト-エクソン44	8	1	ACCTGCAGGCGATTTGACAGATCT	tttt	131	
ヒト-エクソン44	9	1	CCTGCAGGCGATTTGACAGATCTG	tttA	132	
ヒト-エクソン44	10	1	ACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGC	TTTG	133	
ヒト-エクソン44	11	-1	TATCATAATGAAAACGCCGCCATT	TTTA	134	40
ヒト-エクソン44	12	1	CATTATGATATAAAGATATTTAAT	TTTT	135	
ヒト-エクソン44	13	-1	TATTTAGCATGTTCCCAATTCTCA	TTTG	136	
ヒト-エクソン44	14	-1	GAAAAACAAATCAAAGACTTACC	TTTC	137	
ヒト-エクソン44	15	1	ATTTGTTTTTTCGAAATTGTATTT	TTTG	138	

ヒト-エクソン44	16	1	TTTTTTCGAAATTGTATTTATCTT	TTTG	139	
ヒト-エクソン44	17	1	TTCGAAATTGTATTTATCTTCAGC	TTTT	140	
ヒト-エクソン44	18	1	TCGAAATTGTATTTATCTTCAGCA	TTTT	141	
ヒト-エクソン44	19	1	CGAAATTGTATTTATCTTCAGCAC	TTTT	142	
ヒト-エクソン44	20	1	GAAATTGTATTTATCTTCAGCACA	TTTC	143	
ヒト-エクソン44	21	-1	AGAAGTTAAAGAGTCCAGATGTGC	TTTA	144	
ヒト-エクソン44	22	1	TCTTCAGCACATCTGGACTCTTTA	TTTA	145	
ヒト-エクソン44	23	-1	CATCACCTTCAGAACCTGATCTT	TTTC	146	
ヒト-エクソン44	24	1	ACTTCTTAAAGATCAGGTTCTGAA	TTTA	147	
ヒト-エクソン44	25	1	GACTGTTGTTGTCATCATTATATT	TTTT	148	10
ヒト-エクソン44	26	1	ACTGTTGTTGTCATCATTATATTA	TTTG	149	
ヒト-エクソン53	1	-1	AACTAGAATAAAAAGGAAAAATAAA	TTTC	150	
ヒト-エクソン53	2	1	CTACTATATATTTATTTTTCCTTT	TTTA	151	
ヒト-エクソン53	3	1	TTTTTCCTTTTATTCTAGTTGAAA	TTTA	152	
ヒト-エクソン53	4	1	TCCTTTTATTCTAGTTGAAAGAAT	TTTT	153	
ヒト-エクソン53	5	1	CCTTTTATTCTAGTTGAAAGAATT	TTTT	154	
ヒト-エクソン53	6	1	CTTTTATTCTAGTTGAAAGAATTC	TTTC	155	
ヒト-エクソン53	7	1	ATTCTAGTTGAAAGAATTCAGAAT	TTTT	156	
ヒト-エクソン53	8	1	TTCTAGTTGAAAGAATTCAGAATC	TTTA	157	20
ヒト-エクソン53	9	-1	ATTCAACTGTTGCCCTCCGGTTCTG	TTTC	158	
ヒト-エクソン53	10	-1	ACATTTCACTCAACTGTTGCCTCC	TTTA	159	
ヒト-エクソン53	11	-1	CTTTTGGATTGCATCTACTGTATA	TTTT	160	
ヒト-エクソン53	12	-1	TGTGATTTTCTTTTGGATTGCATC	TTTC	161	
ヒト-エクソン53	13	-1	ATACTAACCTTGGTTTCTGTGATT	TTTG	162	
ヒト-エクソン53	14	-1	AAAAGGTATCTTTGATACTAACCT	TTTA	163	
ヒト-エクソン53	15	-1	AAAAAGGTATCTTTGATACTAACC	TTTT	164	
ヒト-エクソン53	16	-1	TTTTAAAAAGGTATCTTTGATACT	TTTA	165	
ヒト-エクソン53	17	-1	ATTTTAAAAAGGTATCTTTGATAC	TTTT	166	
ヒト-エクソン46	1	-1	TTAATGCAAACCTGGGACACAAACA	TTTG	167	30
ヒト-エクソン46	2	1	TAAATTGCCATGTTTGTGTCCCAG	TTTT	168	
ヒト-エクソン46	3	1	AAATTGCCATGTTTGTGTCCCAGT	TTTT	169	
ヒト-エクソン46	4	1	AATTGCCATGTTTGTGTCCCAGTT	TTTA	170	
ヒト-エクソン46	5	1	TGTCCCAGTTTGCAATTAACAAATA	TTTG	171	
ヒト-エクソン46	6	-1	CAACATAGTTCTCAAACATTTGT	tttC	172	
ヒト-エクソン46	7	-1	CCAACATAGTTCTCAAACATTTG	tttt	173	
ヒト-エクソン46	8	-1	tCCAACATAGTTCTCAAACATTT	tttt	174	
ヒト-エクソン46	9	-1	tttCCAACATAGTTCTCAAACAT	tttt	175	
ヒト-エクソン46	10	-1	ttttCCAACATAGTTCTCAAACAT	tttt	176	40
ヒト-エクソン46	11	-1	tttttCCAACATAGTTCTCAAACAT	tttt	177	
ヒト-エクソン46	12	1	CATTAACAAATAGTTTGAGAACTA	TTTG	178	
ヒト-エクソン46	13	1	AGAACTATGTTGGaaaaaaaTA	TTTG	179	
ヒト-エクソン46	14	-1	GTTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAAG	TTTT	180	

ヒト-エクソン46	15	1	ATTCTTCTTTCTCCAGGCTAGAAG	TTTT	181	
ヒト-エクソン46	16	1	TTCTTCTTTCTCCAGGCTAGAAGA	TTTA	182	
ヒト-エクソン46	17	1	TCCAGGCTAGAAGAACAAAAGAAT	TTTC	183	
ヒト-エクソン46	18	-1	AAATTCTGACAAGATATTCTTTTG	TTTG	184	
ヒト-エクソン46	19	-1	CTTTTAGTTGCTGCTCTTTTCCAG	TTTT	185	
ヒト-エクソン46	20	-1	AGAAAATAAAATTACCTTGACTTG	TTTG	186	
ヒト-エクソン46	21	-1	TGCAAGCAGGCCCTGGGGGATTTG	TTTA	187	
ヒト-エクソン46	22	1	ATTTTCTCAAATCCCCCAGGGCCT	TTTT	188	
ヒト-エクソン46	23	1	TTTTCTCAAATCCCCCAGGGCCTG	TTTA	189	
ヒト-エクソン46	24	1	CTCAAATCCCCCAGGGCCTGCTTG	TTTT	190	10
ヒト-エクソン46	25	1	TCAAATCCCCCAGGGCCTGCTTGC	TTTC	191	
ヒト-エクソン46	26	1	TTAATTCAATCATTGGTTTTCTGC	TTTT	192	
ヒト-エクソン46	27	1	TAATTCAATCATTGGTTTTCTGCC	TTTT	193	
ヒト-エクソン46	28	1	AATTCAATCATTGGTTTTCTGCCC	TTTT	194	
ヒト-エクソン46	29	1	ATTCAATCATTGGTTTTCTGCCCA	TTTA	195	
ヒト-エクソン46	30	-1	GCAAGGAATATGAATAACCTAAT	TTTA	196	
ヒト-エクソン46	31	1	CTGCCCATTAGGTTATTCATAGTT	TTTT	197	
ヒト-エクソン46	32	1	TGCCCATTAGGTTATTCATAGTTC	TTTC	198	
ヒト-エクソン52	1	-1	TAGAAAACAATTTAACAGGAAATA	TTTA	199	20
ヒト-エクソン52	2	1	CTGTAAATTTGTTTTCTATAAACC	TTTC	200	
ヒト-エクソン52	3	-1	GAAATAAAAAAAGATGTTACTGTAT	TTTA	201	
ヒト-エクソン52	4	-1	AGAAATAAAAAAAGATGTTACTGTA	TTTT	202	
ヒト-エクソン52	5	1	CTATAAACCCCTTATACAGTAACAT	TTTT	203	
ヒト-エクソン52	6	1	TATAAACCCCTTATACAGTAACATC	TTTC	204	
ヒト-エクソン52	7	1	TTATTTCTAAAAGTGTTTTGGCTG	TTTT	205	
ヒト-エクソン52	8	1	TATTTCTAAAAGTGTTTTGGCTGG	TTTT	206	
ヒト-エクソン52	9	1	ATTTCTAAAAGTGTTTTGGCTGGT	TTTT	207	
ヒト-エクソン52	10	1	TTTCTAAAAGTGTTTTGGCTGGTC	TTTA	208	
ヒト-エクソン52	11	1	TAAAAGTGTTTTGGCTGGTCTCAC	TTTC	209	30
ヒト-エクソン52	12	-1	CATAATACAAAGTAAAGTACAATT	TTTA	210	
ヒト-エクソン52	13	-1	ACATAATACAAAGTAAAGTACAAT	TTTT	211	
ヒト-エクソン52	14	1	GGCTGGTCTCACAATTGTACTTTA	TTTT	212	
ヒト-エクソン52	15	1	GCTGGTCTCACAATTGTACTTTAC	TTTG	213	
ヒト-エクソン52	16	1	CTTTGTATTATGTAAAAGGAATAC	TTTA	214	
ヒト-エクソン52	17	1	TATTATGTAAAAGGAATACACAAC	TTTG	215	
ヒト-エクソン52	18	1	TTCTTACAGGCAACAATGCAGGAT	TTTG	216	
ヒト-エクソン52	19	1	GAACAGAGGCGTCCCCAGTTGGAA	TTTG	217	
ヒト-エクソン52	20	-1	GGCAGCGGTAATGAGTTCTTCCAA	TTTG	218	
ヒト-エクソン52	21	-1	TCAAATTTTGGGCAGCGGTAATGA	TTTT	219	40
ヒト-エクソン52	22	1	AAAAACAAGACCAGCAATCAAGAG	TTTG	220	
ヒト-エクソン52	23	-1	TGTGTCCCATGCTTGTTAAAAAAC	TTTG	221	
ヒト-エクソン52	24	1	TTACAAGCATGGGACACACAAAG	TTTT	222	

ヒト-エクソン 52	25	1	TAACAAGCATGGGACACACAAAGC	TTTT	223
ヒト-エクソン 52	26	1	AACAAGCATGGGACACACAAAGCA	TTTT	224
ヒト-エクソン 52	27	1	ACAAGCATGGGACACACAAAGCAA	TTTA	225
ヒト-エクソン 52	28	-1	TTGAAACTTGTTCATGCATCTTGCT	TTTA	226
ヒト-エクソン 52	29	-1	ATTGAAACTTGTTCATGCATCTTGC	TTTT	227
ヒト-エクソン 52	30	-1	TATTGAAACTTGTTCATGCATCTTG	TTTT	228
ヒト-エクソン 52	31	1	AATAAAAACCTTAAGTTCATATATC	TTTC	229
ヒト-エクソン 50	1	-1	GTGAATATATTATTGGATTCTAT	TTTG	230
ヒト-エクソン 50	2	-1	AAGATAATTCATGAACATCTTAAT	TTTG	231
ヒト-エクソン 50	3	-1	ACAGAAAAGCATACACATTACTTA	TTTA	232
ヒト-エクソン 50	4	1	CTGTTAAAGAGGAAGTTAGAAGAT	TTTT	233
ヒト-エクソン 50	5	1	TGTTAAAGAGGAAGTTAGAAGATC	TTTC	234
ヒト-エクソン 50	6	-1	CCGCCTTCCACTCAGAGCTCAGAT	TTTA	235
ヒト-エクソン 50	7	-1	CCCTCAGCTCTTGAAGTAAACGGT	TTTG	236
ヒト-エクソン 50	8	1	CTCAAGAGCTGAGGGCAAAGCAG	TTTA	237
ヒト-エクソン 50	9	-1	AACAAATAGCTAGAGCCAAAGAGA	TTTG	238
ヒト-エクソン 50	10	-1	GAACAAATAGCTAGAGCCAAAGAG	TTTT	239
ヒト-エクソン 50	11	1	GCTCTAGCTATTTGTTCAAAGTG	TTTG	240
ヒト-エクソン 50	12	1	TTCAAAGGTGCAACTATGAAGTGA	TTTG	241
ヒト-エクソン 50	13	-1	TCTCTCACCCAGTCATCACTTCAT	TTTC	242
ヒト-エクソン 50	14	-1	CTCTCTCACCCAGTCATCACTTCA	TTTT	243
ヒト-エクソン 43	1	1	tatatatatatatTTTTCTCTT	TTTG	244
ヒト-エクソン 43	2	1	TCTCTTTCTATAGACAGCTAATTC	tTTT	245
ヒト-エクソン 43	3	1	CTCTTTCTATAGACAGCTAATTCA	TTTT	246
ヒト-エクソン 43	4	-1	AAACAGTAAAAAAATGAATTAGCT	TTTA	247
ヒト-エクソン 43	5	1	TCTTTCTATAGACAGCTAATTCAT	TTTC	248
ヒト-エクソン 43	6	-1	AAAACAGTAAAAAAATGAATTAGC	TTTT	249
ヒト-エクソン 43	7	1	TATAGACAGCTAATTCATTTTTTT	TTTC	250
ヒト-エクソン 43	8	-1	TATTCTGTAATATAAAAATTTTAA	TTTA	251
ヒト-エクソン 43	9	-1	ATATTCTGTAATATAAAAATTTTA	TTTT	252
ヒト-エクソン 43	10	1	TTTACTGTTTTAAAATTTTTATAT	TTTT	253
ヒト-エクソン 43	11	1	TACTGTTTTAAAATTTTTATATT	TTTT	254
ヒト-エクソン 43	12	1	TACTGTTTTAAAATTTTTATATTA	TTTT	255
ヒト-エクソン 43	13	1	ACTGTTTTAAAATTTTTATATTAC	TTTT	256
ヒト-エクソン 43	14	1	CTGTTTTAAAATTTTTATATTACA	TTTA	257
ヒト-エクソン 43	15	1	AAAATTTTTATATTACAGAATATA	TTTT	258
ヒト-エクソン 43	16	1	AAATTTTTATATTACAGAATATAA	TTTA	259
ヒト-エクソン 43	17	-1	TTGTAGACTATCTTTTATATTCTG	TTTG	260
ヒト-エクソン 43	18	1	TATATTACAGAATATAAAAAGATAG	TTTT	261
ヒト-エクソン 43	19	1	ATATTACAGAATATAAAAAGATAGT	TTTT	262
ヒト-エクソン 43	20	1	TATTACAGAATATAAAAAGATAGTC	TTTA	263
ヒト-エクソン 43	21	-1	CAATGCTGCTGTCTTCTTGCTATG	TTTG	264

10

20

30

40

ヒト-エクソン 43	22	1	CAATGGGAAAAAGTTAACAAAATG	TTTC	265	
ヒト-エクソン 43	23	-1	TGCAAGTATCAAGAAAAATATATG	TTTC	266	
ヒト-エクソン 43	24	1	TCTTGATACTTGCAGAAATGATTT	TTTT	267	
ヒト-エクソン 43	25	1	CTTGATACTTGCAGAAATGATTTG	TTTT	268	
ヒト-エクソン 43	26	1	TTGATACTTGCAGAAATGATTTGT	TTTC	269	
ヒト-エクソン 43	27	1	TTTTCAGGGAACTGTAGAATTTAT	TTTG	270	
ヒト-エクソン 43	28	-1	CATGGAGGGTACTGAAATAAATTC	TTTC	271	
ヒト-エクソン 43	29	-1	CCATGGAGGGTACTGAAATAAATT	TTTT	272	
ヒト-エクソン 43	30	1	CAGGGAACCTGTAGAATTTATTTCA	TTTT	273	
ヒト-エクソン 43	31	-1	TCCATGGAGGGTACTGAAATAAAT	TTTT	274	10
ヒト-エクソン 43	32	1	AGGGAACCTGTAGAATTTATTTTCAG	TTTC	275	
ヒト-エクソン 43	33	-1	TTCCATGGAGGGTACTGAAATAAA	TTTT	276	
ヒト-エクソン 43	34	-1	CCTGTCTTTTTTCCATGGAGGGTA	TTTC	277	
ヒト-エクソン 43	35	-1	CCCTGTCTTTTTTCCATGGAGGGT	TTTT	278	
ヒト-エクソン 43	36	-1	TCCCTGTCTTTTTTCCATGGAGGG	TTTT	279	
ヒト-エクソン 43	37	1	TTTCAGTACCCCTCCATGGAAAAAA	TTTA	280	
ヒト-エクソン 43	38	1	AGTACCCTCCATGGAAAAAAGACA	TTTC	281	
ヒト-エクソン 6	1	1	AGTTTGCATGGTTCTTGCTCAAGG	TTTA	282	
ヒト-エクソン 6	2	-1	ATAAGAAAATGCATTCTTGAGCA	TTTC	283	20
ヒト-エクソン 6	3	-1	CATAAGAAAATGCATTCTTGAGC	TTTT	284	
ヒト-エクソン 6	4	1	CATGGTTCTTGCTCAAGGAATGCA	TTTG	285	
ヒト-エクソン 6	5	-1	ACCTACATGTGGAAATAAATTTTC	TTTG	286	
ヒト-エクソン 6	6	-1	GACCTACATGTGGAAATAAATTTT	TTTT	287	
ヒト-エクソン 6	7	-1	TGACCTACATGTGGAAATAAATTT	TTTT	288	
ヒト-エクソン 6	8	1	CTTATGAAAATTTATTTCCACATG	TTTT	289	
ヒト-エクソン 6	9	1	TTATGAAAATTTATTTCCACATGT	TTTC	290	
ヒト-エクソン 6	10	-1	ATTACATTTTTTGACCTACATGTGG	TTTC	291	
ヒト-エクソン 6	11	-1	CATTACATTTTTTGACCTACATGTG	TTTT	292	
ヒト-エクソン 6	12	-1	TCATTACATTTTTTGACCTACATGT	TTTT	293	30
ヒト-エクソン 6	13	1	TTTCCACATGTAGGTCAAAAATGT	TTTA	294	
ヒト-エクソン 6	14	1	CACATGTAGGTCAAAAATGTAATG	TTTC	295	
ヒト-エクソン 6	15	-1	TTGCAATCCAGCCATGATATTTTT	TTTG	296	
ヒト-エクソン 6	16	-1	ACTGTTGGTTTGTGCAATCCAGC	TTTC	297	
ヒト-エクソン 6	17	-1	CACTGTTGGTTTGTGCAATCCAG	TTTT	298	
ヒト-エクソン 6	18	1	AATGCTCTCATCCATAGTCATAGG	TTTG	299	
ヒト-エクソン 6	19	-1	ATGTCTCAGTAATCTTCTTACCTA	TTTA	300	
ヒト-エクソン 6	20	-1	CAAGTTATTTAATGTCTCAGTAAT	TTTA	301	
ヒト-エクソン 6	21	-1	ACAAGTTATTTAATGTCTCAGTAA	TTTT	302	
ヒト-エクソン 6	22	1	GACTCTGATGACATATTTTTTCCCC	TTTA	303	40
ヒト-エクソン 6	23	1	TCCCCAGTATGGTTCCAGATCATG	TTTT	304	
ヒト-エクソン 6	24	1	CCCCAGTATGGTTCCAGATCATGT	TTTT	305	
ヒト-エクソン 6	25	1	CCCAGTATGGTTCCAGATCATGTC	TTTC	306	

ヒト-エクソン7	1	1	TATTTGTCTTtgtgtatgtgtga	TTTA	307	10
ヒト-エクソン7	2	1	TCTTtgtgtatgtgtatgtga	TTTG	308	
ヒト-エクソン7	3	1	tgatgtgtatgtgtatgtgtt	TTtg	309	
ヒト-エクソン7	4	1	AGGCCAGACCTATTTGACTGGAAT	ttTT	310	
ヒト-エクソン7	5	1	GGCCAGACCTATTTGACTGGAATA	tTTA	311	
ヒト-エクソン7	6	1	ACTGGAATAGTGTGGTTTGCCAGC	TTTG	312	
ヒト-エクソン7	7	1	CCAGCAGTCAGCCACACAACGACT	TTTG	313	
ヒト-エクソン7	8	-1	TCTATGCCTAATTGATATCTGGCG	TTTC	314	
ヒト-エクソン7	9	-1	CCAACCTTCAGGATCGAGTAGTTT	TTTA	315	
ヒト-エクソン7	10	1	TGGACTACCACTGCTTTTAGTATG	TTTC	316	
ヒト-エクソン7	11	1	AGTATGGTAGAGTTTAATGTTTTC	TTTT	317	
ヒト-エクソン7	12	1	GTATGGTAGAGTTTAATGTTTTC	TTTA	318	
ヒト-エクソン8	1	-1	AGACTCTAAAAGGATAATGAACAA	TTTG	319	20
ヒト-エクソン8	2	1	ACTTTGATTTGTTTCATTATCCTTT	TTTA	320	
ヒト-エクソン8	3	-1	TATATTTGAGACTCTAAAAGGATA	TTTC	321	
ヒト-エクソン8	4	1	ATTTGTTTCATTATCCTTTTAGAGT	TTTG	322	
ヒト-エクソン8	5	-1	GTTTCTATATTTGAGACTCTAAAA	TTTG	323	
ヒト-エクソン8	6	-1	GGTTTCTATATTTGAGACTCTAAA	TTTT	324	
ヒト-エクソン8	7	-1	TGGTTTCTATATTTGAGACTCTAA	TTTT	325	
ヒト-エクソン8	8	1	TTCATTATCCTTTTAGAGTCTCAA	TTTG	326	
ヒト-エクソン8	9	1	AGAGTCTCAAATATAGAAACCAAA	TTTT	327	
ヒト-エクソン8	10	1	GAGTCTCAAATATAGAAACCAAAA	TTTA	328	
ヒト-エクソン8	11	-1	CACTTCCTGGATGGCTTCAATGCT	TTTC	329	
ヒト-エクソン8	12	1	GCCTCAACAAGTGAGCATTGAAGC	TTTT	330	
ヒト-エクソン8	13	1	CCTCAACAAGTGAGCATTGAAGCC	TTTG	331	30
ヒト-エクソン8	14	-1	GGTGGCCTTGGAACATTTCCACT	TTTA	332	
ヒト-エクソン8	15	-1	GTCACCTTAGGTGGCCTTGGCAAC	TTTA	333	
ヒト-エクソン8	16	-1	ATGATGTAAGTGAATAATGTTCTTC	TTTG	334	
ヒト-エクソン8	17	-1	CCTGTTGAGAATAGTGCATTTGAT	TTTA	335	
ヒト-エクソン8	18	1	CAGTTACATCATCAAATGCACTAT	TTTT	336	
ヒト-エクソン8	19	1	AGTTACATCATCAAATGCACTATT	TTTC	337	
ヒト-エクソン8	20	-1	CACACTTTACCTGTTGAGAATAGT	TTTA	338	
ヒト-エクソン8	21	1	CTGTTTTATATGCATTTTATAGGTA	TTTT	339	
ヒト-エクソン8	22	1	TGTTTTATATGCATTTTATAGGTAT	TTTC	340	
ヒト-エクソン8	23	1	ATATGCATTTTATAGGTATTACGTG	TTTT	341	
ヒト-エクソン8	24	1	TATGCATTTTATAGGTATTACGTGC	TTTA	342	
ヒト-エクソン8	25	1	TAGGTATTACGTGCACatatatat	TTTT	343	40
ヒト-エクソン8	26	1	AGGTATTACGTGCACatatatata	TTTT	344	
ヒト-エクソン8	27	1	GGTATTACGTGCACatatatatat	TTTA	345	
ヒト-エクソン55	1	-1	AGCAACAACCTATAATATTGTGCAG	TTTA	346	
ヒト-エクソン55	2	1	GTTCTCCATCTTTCTCTTTTAT	TTTA	347	
ヒト-エクソン55	3	1	TCTTTTTATGGAGTTCCTAGGTG	TTTC	348	

ヒト-エクソン 55	4	1	TATGGAGTTCAGTGGTGCACCAT	TTTT	349
ヒト-エクソン 55	5	1	ATGGAGTTCAGTGGTGCACCAT	TTTT	350
ヒト-エクソン 55	6	1	TGGAGTTCAGTGGTGCACCATTC	TTTA	351
ヒト-エクソン 55	7	1	ATAATTGCATCTGAACATTTGGTC	TTTA	352
ヒト-エクソン 55	8	1	GTCCTTTGCAGGGTGAGTGAGCGA	TTTG	353
ヒト-エクソン 55	9	-1	TTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCACT	TTTC	354
ヒト-エクソン 55	10	1	CAGGGTGAGTGAGCGAGAGGCTGC	TTTG	355
ヒト-エクソン 55	11	1	GAAGAACTCATAGATTACTGCAA	TTTG	356
ヒト-エクソン 55	12	-1	CAGGTCCAGGGGGAAGTGTGCAG	TTTC	357
ヒト-エクソン 55	13	-1	CCAGGTCCAGGGGGAAGTGTGCA	TTTT	358
ヒト-エクソン 55	14	-1	AGCTTCTGTAAGCCAGGCAAGAAA	TTTC	359
ヒト-エクソン 55	15	1	TTGCCTGGCTTACAGAAGCTGAAA	TTTC	360
ヒト-エクソン 55	16	-1	CTTACGGGTAGCATCCTGTAGGAC	TTTC	361
ヒト-エクソン 55	17	-1	CTCCCTTGGAGTCTTCTAGGAGCC	TTTA	362
ヒト-エクソン 55	18	-1	ACTCCCTTGGAGTCTTCTAGGAGC	TTTT	363
ヒト-エクソン 55	19	-1	ATCAGCTCTTTTACTCCCTTGGAG	TTTC	364
ヒト-エクソン 55	20	1	CGCTTTAGCACTCTTGTGGATCCA	TTTC	365
ヒト-エクソン 55	21	1	GCACTCTTGTGGATCCAATTGAAC	TTTA	366
ヒト-エクソン 55	22	-1	TCCCTGGCTTGTGAGTTACAAGTA	TTTG	367
ヒト-エクソン 55	23	-1	GTCCCTGGCTTGTGAGTTACAAGT	TTTT	368
ヒト-エクソン 55	24	-1	TTTTGTCCCTGGCTTGTGAGTTAC	TTTG	369
ヒト-エクソン 55	25	-1	GTTTTGTCCCTGGCTTGTGAGTTA	TTTT	370
ヒト-エクソン 55	26	1	TACTTGTAAGTACAAGCCAGGGA	TTTG	371
ヒト-G1-エクソン 51		1	gCTCCTACTCAGACTGTACTCTG	TTTA	372
ヒト-G2-エクソン 51		1	taccatgtattgctaacaagta	TTTC	373
ヒト-G3-エクソン 51		-1	attgaagagtaacaattgagcca	TTTA	374
マウス-エクソン 23-G1		1	aggctctgcaaagtctTTGAAAG	TTTG	375
マウス-エクソン 23-G2		1	AAAGAGCAACAAAATGGCttcaac	TTTG	376
マウス-エクソン 23-G3		1	AAAGAGCAATAAAAATGGCttcaac	TTTG	377
マウス-エクソン 23-G4		-1	AAAGAACTTTGCAGAGCctcaaaa	TTTC	378
マウス-エクソン 23-G5		-1	ctgaatatctatgcattaataact	TTTA	379
マウス-エクソン 23-G6		-1	tattatattacagggcatattata	TTTC	380
マウス-エクソン 23-G7		1	Aggtaagccgaggtttggccttta	TTTC	381
マウス-エクソン 23-G8		1	cccagagtccttcaaagatattga	TTTA	382

* この表において、大文字は、遺伝子のエクソン配列と整列しているヌクレオチドを表す。
小文字は、遺伝子のイントロン配列と整列しているヌクレオチドを表す。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 8 】

(表 E) gRNA配列

標的のgRNA エクソン	ガイド #	鎖	gRNA 配列*	PAM	SEQ ID NO.
ヒト-エクソン51	4	1	aaaaaggaaaaagaagaaaaaga	tttt	448
ヒト-エクソン51	5	1	Caaaaaggaaaaagaagaaaaag	tttt	449
ヒト-エクソン51	6	1	GCaaaaaggaaaaagaagaaaaa	tttc	450
ヒト-エクソン51	7	1	UUUUGCaaaaaggaaaaagaaga	tttt	451
ヒト-エクソン51	8	1	UUUUUGCaaaaaggaaaaagaag	tttt	452
ヒト-エクソン51	9	1	GUUUUUGCaaaaaggaaaaagaa	tttc	453
ヒト-エクソン51	10	1	AUUUUGGGUUUUUGCaaaaaggaa	tttt	454
ヒト-エクソン51	11	1	UAUUUUGGGUUUUUGCaaaaagga	tttt	455
ヒト-エクソン51	12	1	AUAUUUUGGGUUUUUGCaaaaagg	tttt	456
ヒト-エクソン51	13	1	AAUAUUUUGGGUUUUUGCaaaaag	tttc	457
ヒト-エクソン51	14	1	GCUAAAAUAUUUUGGGUUUUUGCa	tttt	458
ヒト-エクソン51	15	1	AGCUAAAAUAUUUUGGGUUUUUGC	tttt	459
ヒト-エクソン51	16	1	GAGCUAAAAUAUUUUGGGUUUUUG	tttG	460
ヒト-エクソン51	17	1	AGAGUAACAGUCUGAGUAGGAGCU	TTTT	461
ヒト-エクソン51	18	1	CAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAGC	TTTA	462
ヒト-エクソン51	19	-1	GUGACACAACCUGUGGUUACUAAG	TTTC	463
ヒト-エクソン51	20	-1	GGUUACUAAGGAAACUGCCAUCU	TTTG	464
ヒト-エクソン51	21	-1	AAGGAAACUGCCAUCUCCAAACUA	TTTC	465
ヒト-エクソン51	22	-1	AUCAUCAAGCAGAAGGUAUGAGAA	TTTT	466
ヒト-エクソン51	23	-1	AGCAGAAGGUAUGAGAAAAAUGA	TTTA	467
ヒト-エクソン51	24	-1	GCAGAAGGUAUGAGAAAAAUGAU	TTTT	468
ヒト-エクソン51	25	-1	UAAAAGUUGGCAGAAGUUUUUCUU	TTTA	469
ヒト-エクソン51	26	-1	AAAAGUUGGCAGAAGUUUUUCUUU	TTTT	470
ヒト-エクソン51	27	1	GGUGGAAAAUCUUCAUUUUAAAGA	TTTT	471
ヒト-エクソン51	28	1	UGGUGGAAAAUCUUCAUUUUAAAG	TTTT	472
ヒト-エクソン51	29	1	UUGGUGGAAAAUCUUCAUUUUAAA	TTTC	473
ヒト-エクソン51	30	1	GUGAUUGGUGGAAAAUCUUCAUUU	TTTA	474
ヒト-エクソン51	31	1	CUAGGAGAGUAAAGUGAUUGGUGG	TTTT	475

10

20

30

ヒト-エクソン 51	32	1	UCUAGGAGAGUAAAGUGAUUGGUG	TTTC	476	10
ヒト-エクソン 51	33	1	CUGGUGGGAAAUGGUCUAGGAGA	TTTA	477	
ヒト-エクソン 45	1	-1	guagcacacuguuuaucuuuucu	tttg	478	
ヒト-エクソン 45	2	-1	cacacuguuuaucuuuucucaaa	TTTa	479	
ヒト-エクソン 45	3	-1	acacuguuuaucuuuucucaaau	TTTT	480	
ヒト-エクソン 45	4	-1	cacuguuuaucuuuucucaaauA	TTTT	481	
ヒト-エクソン 45	5	1	AUGUCUUUUUauuugagaaaagau	ttta	482	
ヒト-エクソン 45	6	1	AAGCCCCAUGUCUUUUUauuugag	tttt	483	
ヒト-エクソン 45	7	1	GAAGCCCCAUGUCUUUUUauuuga	tttc	484	
ヒト-エクソン 45	8	1	GUAAGAUACCAAAAAGGCAAAACA	TTTT	485	
ヒト-エクソン 45	9	1	UGUAAGAUACCAAAAAGGCAAAAC	TTTT	486	20
ヒト-エクソン 45	10	1	CUGUAAGAUACCAAAAAGGCAAAA	TTTG	487	
ヒト-エクソン 45	11	1	GUUCCUGUAAGAUACCAAAAAGGC	TTTT	488	
ヒト-エクソン 45	12	1	AGUUCCUGUAAGAUACCAAAAAGG	TTTG	489	
ヒト-エクソン 45	13	1	UCCUGGAGUUCUGUAAGAUACCA	TTTT	490	
ヒト-エクソン 45	14	1	AUCCUGGAGUUCUGUAAGAUACC	TTTT	491	
ヒト-エクソン 45	15	-1	GGGAAGAAUAAUUCAGCAAUCCU	TTTG	492	
ヒト-エクソン 45	16	-1	GGAAGAAUAAUUCAGCAAUCCUC	TTTT	493	
ヒト-エクソン 45	17	-1	GAAGAAUAAUUCAGCAAUCCUCA	TTTT	494	
ヒト-エクソン 45	18	-1	AAACAGAUGCCAGUAUUCUACAG	TTTC	495	
ヒト-エクソン 45	19	-1	AAACAGAUGCCAGUAUUCUACAGG	TTTT	496	30
ヒト-エクソン 45	20	-1	AACAGAUGCCAGUAUUCUACAGGA	TTTT	497	
ヒト-エクソン 45	21	-1	GAAUCUGCGGUGGCAGGAGGUCUG	TTTG	498	
ヒト-エクソン 45	22	-1	AGGUCUGCAAACAGCUGUCAGACA	TTTC	499	
ヒト-エクソン 45	23	-1	GGUCUGCAAACAGCUGUCAGACAG	TTTT	500	
ヒト-エクソン 45	24	-1	GUCUGCAAACAGCUGUCAGACAGA	TTTT	501	
ヒト-エクソン 45	25	-1	UCUGCAAACAGCUGUCAGACAGAA	TTTT	502	
ヒト-エクソン 45	26	-1	UAGGGCGACAGAUUCUAAUAGGAAU	TTTC	503	
ヒト-エクソン 45	27	-1	AGGGCGACAGAUUCUAAUAGGAAUG	TTTT	504	
ヒト-エクソン 45	28	1	UAAAGAAAGCUUAAAAAGUCUGCU	TTTT	505	
ヒト-エクソン 45	29	1	CUAAAGAAAGCUUAAAAAGUCUGC	TTTA	506	40
ヒト-エクソン 45	30	1	AAAUUUCUUCUAAAGAAAGCUUA	TTTT	507	
ヒト-エクソン 45	31	1	GAAAUUUCUUCUAAAGAAAGCUU	TTTT	508	
ヒト-エクソン 45	32	1	UGAAAUUUCUUCUAAAGAAAGCU	TTTA	509	
ヒト-エクソン 45	33	1	UCUCUCAUGAAAUUUCUUCUAAA	TTTC	510	
ヒト-エクソン 45	34	1	AUAUUCUCUCAUGAAAUUUCUUC	TTTA	511	
ヒト-エクソン 44	1	1	GCGUAUUAUUUUUGGUUAUACUGA	TTTG	512	
ヒト-エクソン 44	2	1	ucaagaaaauagauggauuauugu	tttt	513	
ヒト-エクソン 44	3	1	aucaagaaaauagauggauuauug	ttta	514	
ヒト-エクソン 44	4	1	CAGGUaaaagcauauuggaucaga	tttt	515	
ヒト-エクソン 44	5	1	GCAGGUaaaagcauauuggaucaag	tttt	516	
ヒト-エクソン 44	6	1	UGCAGGUaaaagcauauuggaucaa	tttc	517	

ヒト-エクソン 44	7	-1	CAGGCGAUUUGACAGAUCUGUUGA	TTTC	518	10
ヒト-エクソン 44	8	1	AGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGU	tttt	519	
ヒト-エクソン 44	9	1	CAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGG	tttA	520	
ヒト-エクソン 44	10	1	GCCGCCAUUUCUCAACAGAUCUGU	TTTG	521	
ヒト-エクソン 44	11	-1	AAUGGCGGCGUUUUCAUUAUGAUA	TTTA	522	
ヒト-エクソン 44	12	1	AUUAUUUAUCUUUAUAUCAUAAUG	TTTT	523	
ヒト-エクソン 44	13	-1	UGAGAAUUGGGAACAUGC UAAAUA	TTTG	524	
ヒト-エクソン 44	14	-1	GGUAAGUCUUUGAUUUUGUUUUUUC	TTTC	525	
ヒト-エクソン 44	15	1	AAAUACAAUUCGAAAAACAAAU	TTTG	526	
ヒト-エクソン 44	16	1	AAGAUAAAUACAAUUCGAAAAAA	TTTG	527	
ヒト-エクソン 44	17	1	GCUGAAGAUAAAUACAAUUCGAA	TTTT	528	
ヒト-エクソン 44	18	1	UGCUGAAGAUAAAUACAAUUCGA	TTTT	529	
ヒト-エクソン 44	19	1	GUGCUGAAGAUAAAUACAAUUCG	TTTT	530	
ヒト-エクソン 44	20	1	UGUGCUGAAGAUAAAUACAAUUC	TTTC	531	
ヒト-エクソン 44	21	-1	GCACAUCUGGACUCUUUAACUUCU	TTTA	532	
ヒト-エクソン 44	22	1	UAAAGAGUCCAGAUUGUGCUGAAGA	TTTA	533	
ヒト-エクソン 44	23	-1	AAGAUCAGGUUCUGAAGGGUGAUG	TTTC	534	
ヒト-エクソン 44	24	1	UUCAGAACCUGAUCUUUAAGAAGU	TTTA	535	
ヒト-エクソン 44	25	1	AAUAUAAUGAUGACAACAACAGUC	TTTT	536	20
ヒト-エクソン 44	26	1	UAAUAUAAUGAUGACAACAACAGU	TTTG	537	
ヒト-エクソン 53	1	-1	UUUAUUUUUCCUUUAUUCUAGUU	TTTC	538	
ヒト-エクソン 53	2	1	AAAGGAAAAAUAAUUAUUAUAGUAG	TTTA	539	
ヒト-エクソン 53	3	1	UUUCAACUAGAAUAAAAGGAAAAA	TTTA	540	
ヒト-エクソン 53	4	1	AUUCUUUCAACUAGAAUAAAAGGA	TTTT	541	
ヒト-エクソン 53	5	1	AAUUCUUUCAACUAGAAUAAAAGG	TTTT	542	
ヒト-エクソン 53	6	1	GAAUUCUUUCAACUAGAAUAAAAG	TTTC	543	
ヒト-エクソン 53	7	1	AUUCUGAAUUCUUUCAACUAGAAU	TTTT	544	
ヒト-エクソン 53	8	1	GAUUCUGAAUUCUUUCAACUAGAA	TTTA	545	
ヒト-エクソン 53	9	-1	CAGAACCGGAGGCAACAGUUGAAU	TTTC	546	
ヒト-エクソン 53	10	-1	GGAGGCAACAGUUGAAUGAAAUGU	TTTA	547	
ヒト-エクソン 53	11	-1	UAUACAGUAGAUCAAUCCAAAAG	TTTT	548	
ヒト-エクソン 53	12	-1	GAUGCAAUCCAAAAGAAAAUCACA	TTTC	549	
ヒト-エクソン 53	13	-1	AAUCACAGAAACCAAGGUUAGUAU	TTTG	550	
ヒト-エクソン 53	14	-1	AGGUUAGUAUCAAAAGAUACCUUU	TTTA	551	
ヒト-エクソン 53	15	-1	GGUUAGUAUCAAAAGAUACCUUUUU	TTTT	552	
ヒト-エクソン 53	16	-1	AGUAUCAAAAGAUACCUUUUUAAAA	TTTA	553	
ヒト-エクソン 53	17	-1	GUAUCAAAAGAUACCUUUUUAAAAU	TTTT	554	
ヒト-エクソン 46	1	-1	UGUUUGUGUCCCAGUUUGCAUUA	TTTG	555	40
ヒト-エクソン 46	2	1	CUGGGACACAAACAUGGCAAUUUA	TTTT	556	
ヒト-エクソン 46	3	1	ACUGGGACACAAACAUGGCAAUUU	TTTT	557	
ヒト-エクソン 46	4	1	AACUGGGACACAAACAUGGCAAUU	TTTA	558	
ヒト-エクソン 46	5	1	UAUUUGUUAUUGCAAACUGGGACA	TTTG	559	

ヒト-エクソン 46	6	-1	ACAAAUAGUUUGAGAACUAUGUUG	tttC	560	
ヒト-エクソン 46	7	-1	CAAAUAGUUUGAGAACUAUGUUGG	tttt	561	
ヒト-エクソン 46	8	-1	AAAUAGUUUGAGAACUAUGUUGGa	tttt	562	
ヒト-エクソン 46	9	-1	AUAGUUUGAGAACUAUGUUGGaaa	tttt	563	
ヒト-エクソン 46	10	-1	UAGUUUGAGAACUAUGUUGGaaaa	tttt	564	
ヒト-エクソン 46	11	-1	AGUUUGAGAACUAUGUUGGaaaaa	tttt	565	
ヒト-エクソン 46	12	1	UAGUUCUCAAAACUAUUUGUUA AUG	TTTG	566	
ヒト-エクソン 46	13	1	UAuuuuuuuuuCCAACAUA GUUCU	TTTG	567	
ヒト-エクソン 46	14	-1	CUUCUUUCUCCAGGCUAGAAGAAC	TTTT	568	10
ヒト-エクソン 46	15	1	CUUCUAGCCUGGAGAAAGAAGAAU	TTTT	569	
ヒト-エクソン 46	16	1	UCUUCUAGCCUGGAGAAAGAAGAA	TTTA	570	
ヒト-エクソン 46	17	1	AUUCUUUUGUUCUUCUAGCCUGGA	TTTC	571	
ヒト-エクソン 46	18	-1	CAAAAGAAUAUCUUGUCAGAAUUU	TTTG	572	
ヒト-エクソン 46	19	-1	CUGGAAAAGAGCAGCAACUAAAAG	TTTT	573	
ヒト-エクソン 46	20	-1	CAAGUCAAGGUAAUUUUU AUUUUCU	TTTG	574	
ヒト-エクソン 46	21	-1	CAAAUCCCCCAGGGCCUGCUUGCA	TTTA	575	
ヒト-エクソン 46	22	1	AGGCCCUUGGGGAUUUGAGAAAAU	TTTT	576	
ヒト-エクソン 46	23	1	CAGGCCCUUGGGGAUUUGAGAAAA	TTTA	577	
ヒト-エクソン 46	24	1	CAAGCAGGCCCUUGGGGAUUUGAG	TTTT	578	20
ヒト-エクソン 46	25	1	GCAAGCAGGCCCUUGGGGAUUUGA	TTTC	579	
ヒト-エクソン 46	26	1	GCAGAAAACCAAUGAUUGAAUUA	TTTT	580	
ヒト-エクソン 46	27	1	GGCAGAAAACCAAUGAUUGAAUUA	TTTT	581	
ヒト-エクソン 46	28	1	GGGCAGAAAACCAAUGAUUGAAUU	TTTT	582	
ヒト-エクソン 46	29	1	UGGGCAGAAAACCAAUGAUUGAAU	TTTA	583	
ヒト-エクソン 46	30	-1	AUUAGGUUAUUC AUAGUCCUUGC	TTTA	584	
ヒト-エクソン 46	31	1	AACUAUGAAUAACCUAAUGGGCAG	TTTT	585	
ヒト-エクソン 46	32	1	GAACUAUGAAUAACCUAAUGGGCA	TTTC	586	
ヒト-エクソン 52	1	-1	UAUUUCCUGUUA AAUUGUUUUCUA	TTTA	587	30
ヒト-エクソン 52	2	1	GGUUUAUAGAAAACAAUUUAACAG	TTTC	588	
ヒト-エクソン 52	3	-1	AUACAGUAACAUCUUUUUUAUUUC	TTTA	589	
ヒト-エクソン 52	4	-1	UACAGUAACAUCUUUUUUAUUUCU	TTTT	590	
ヒト-エクソン 52	5	1	AUGUUACUGUAUAAGGGUUUAUAG	TTTT	591	
ヒト-エクソン 52	6	1	GAUGUUACUGUAUAAGGGUUUAUA	TTTC	592	
ヒト-エクソン 52	7	1	CAGCCAAAACACUUUUAGAAAUA	TTTT	593	
ヒト-エクソン 52	8	1	CCAGCCAAAACACUUUUAGAAAUA	TTTT	594	
ヒト-エクソン 52	9	1	ACCAGCCAAAACACUUUUAGAAAU	TTTT	595	
ヒト-エクソン 52	10	1	GACCAGCCAAAACACUUUUAGAAA	TTTA	596	
ヒト-エクソン 52	11	1	GUGAGACCAGCCAAAACACUUUUA	TTTC	597	40
ヒト-エクソン 52	12	-1	AAUUGUACUUUACUUUGUAUUAUG	TTTA	598	
ヒト-エクソン 52	13	-1	AUUGUACUUUACUUUGUAUUAUGU	TTTT	599	
ヒト-エクソン 52	14	1	UAAAGUACAAUUGUGAGACCAGCC	TTTT	600	
ヒト-エクソン 52	15	1	GUAAAGUACAAUUGUGAGACCAGC	TTTG	601	

ヒト-エクソン 52	16	1	GUAUUCUUUUACAUAAUACAAAG	TTTA	602	
ヒト-エクソン 52	17	1	GUUGUGUAUUCCUUUUACAUAAUA	TTTG	603	
ヒト-エクソン 52	18	1	AUCCUGCAUUGUUGCCUGUAAGAA	TTTG	604	
ヒト-エクソン 52	19	1	UUCCAACUGGGGACGCCUCUGUUC	TTTG	605	
ヒト-エクソン 52	20	-1	UUGGAAGAACUCAUUACCGCUGCC	TTTG	606	
ヒト-エクソン 52	21	-1	UCAUUACCGCUGCCCCAAAAUUUGA	TTTT	607	
ヒト-エクソン 52	22	1	CUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUU	TTTG	608	
ヒト-エクソン 52	23	-1	GUUUUUUAACAAGCAUGGGACACA	TTTG	609	
ヒト-エクソン 52	24	1	CUUUGUGUGUCCCAUGCUUGUUA	TTTT	610	10
ヒト-エクソン 52	25	1	GCUUUGUGUGUCCCAUGCUUGUUA	TTTT	611	
ヒト-エクソン 52	26	1	UGC UUUGUGUGUCCCAUGCUUGU	TTTT	612	
ヒト-エクソン 52	27	1	UUGC UUUGUGUGUCCCAUGCUUGU	TTTA	613	
ヒト-エクソン 52	28	-1	AGCAAGAUGCAUGACAAGUUUCAA	TTTA	614	
ヒト-エクソン 52	29	-1	GCAAGAUGCAUGACAAGUUUCAAU	TTTT	615	
ヒト-エクソン 52	30	-1	CAAGAUGCAUGACAAGUUUCAAUA	TTTT	616	
ヒト-エクソン 52	31	1	GAUAUAUGAACUUAAGUUUUUAUU	TTTC	617	
ヒト-エクソン 50	1	-1	AUAGAAAUCCAAUAAUAUAUUCAC	TTTG	618	
ヒト-エクソン 50	2	-1	AUUAAGAUGUUCAUGAAUUAUCUU	TTTG	619	
ヒト-エクソン 50	3	-1	UAAGUAAUGUGUAUGCUUUUCUGU	TTTA	620	20
ヒト-エクソン 50	4	1	AUCUUCUAACUCCUCUUUAACAG	TTTT	621	
ヒト-エクソン 50	5	1	GAUCUUCUAACUCCUCUUUAACA	TTTC	622	
ヒト-エクソン 50	6	-1	AUCUGAGCUCUGAGUGGAAGGCGG	TTTA	623	
ヒト-エクソン 50	7	-1	ACCGUUUACUUCAAGAGCUGAGGG	TTTG	624	
ヒト-エクソン 50	8	1	CUGCUUUGCCUCAGCUCUUGAAG	TTTA	625	
ヒト-エクソン 50	9	-1	UCUCUUUGGCUCUAGCUAUUUGUU	TTTG	626	
ヒト-エクソン 50	10	-1	CUCUUUGGCUCUAGCUAUUUGUUC	TTTT	627	
ヒト-エクソン 50	11	1	CACUUUUGAACAAAUAGCUAGAGC	TTTG	628	
ヒト-エクソン 50	12	1	UCACUUCAUAGUUGCACUUUUGAA	TTTG	629	
ヒト-エクソン 50	13	-1	AUGAAGUGAUGACUGGGUGAGAGA	TTTC	630	30
ヒト-エクソン 50	14	-1	UGAAGUGAUGACUGGGUGAGAGAG	TTTT	631	
ヒト-エクソン 43	1	1	AAGAGAAA Auaauauauauaua	TTTG	632	
ヒト-エクソン 43	2	1	GAAUUAGCUGUCUAUAGAAAGAGA	TTTT	633	
ヒト-エクソン 43	3	1	UGAAUUAGCUGUCUAUAGAAAGAG	TTTT	634	
ヒト-エクソン 43	4	-1	AGCUAAUUCAUUUUUUUACUGUUU	TTTA	635	
ヒト-エクソン 43	5	1	AUGAAUUAGCUGUCUAUAGAAAGA	TTTC	636	
ヒト-エクソン 43	6	-1	GCUAAUUCAUUUUUUUACUGUUUU	TTTT	637	
ヒト-エクソン 43	7	1	AAAAAAUAGAAUUAGCUGUCUAUA	TTTC	638	
ヒト-エクソン 43	8	-1	UUAUUUUUUUAUAUUACAGAAUA	TTTA	639	40
ヒト-エクソン 43	9	-1	UAAAAUUUUUAUAUUACAGAAUAU	TTTT	640	
ヒト-エクソン 43	10	1	AUAUAAAAUUUUAAAACAGUAAA	TTTT	641	
ヒト-エクソン 43	11	1	AAUAUAAAAUUUUAAAACAGUAA	TTTT	642	
ヒト-エクソン 43	12	1	UAAUAUAAAAUUUUAAAACAGUA	TTTT	643	

ヒト-エクソン 43	13	1	GUAAUAUAAAAAUUUUAAAACAGU	TTTT	644	
ヒト-エクソン 43	14	1	UGAAUAUAAAAAUUUUAAAACAG	TTTA	645	
ヒト-エクソン 43	15	1	UAUAUUCUGUAAUAUAAAAAUUUU	TTTT	646	
ヒト-エクソン 43	16	1	UUAUAUUCUGUAAUAUAAAAAUUU	TTTA	647	
ヒト-エクソン 43	17	-1	CAGAAUAUAAAAGAUAGUCUACAA	TTTG	648	
ヒト-エクソン 43	18	1	CUAUCUUUUUAUAUUCUGUAAUAUA	TTTT	649	
ヒト-エクソン 43	19	1	ACUAUCUUUUUAUAUUCUGUAAUAU	TTTT	650	
ヒト-エクソン 43	20	1	GACUAUCUUUUUAUAUUCUGUAAUA	TTTA	651	
ヒト-エクソン 43	21	-1	CAUAGCAAGAAGACAGCAGCAUUG	TTTG	652	10
ヒト-エクソン 43	22	1	CAUUUUGUUAACUUUUUCCCAUUG	TTTC	653	
ヒト-エクソン 43	23	-1	CAUAUAUUUUUCUUGAUACUUGCA	TTTC	654	
ヒト-エクソン 43	24	1	AAAUCAUUUCUGCAAGUAUCAAGA	TTTT	655	
ヒト-エクソン 43	25	1	CAAAUCAUUUCUGCAAGUAUCAAG	TTTT	656	
ヒト-エクソン 43	26	1	ACAAAUCAUUUCUGCAAGUAUCAAA	TTTC	657	
ヒト-エクソン 43	27	1	AUAAAUUCUACAGUUCCCUGAAAA	TTTG	658	
ヒト-エクソン 43	28	-1	GAAUUUAUUUCAGUACCCUCCAUG	TTTC	659	
ヒト-エクソン 43	29	-1	AAUUUAUUUCAGUACCCUCCAUGG	TTTT	660	
ヒト-エクソン 43	30	1	UGAAAUAAAUUCUACAGUUCCCUG	TTTT	661	20
ヒト-エクソン 43	31	-1	AUUUAUUUCAGUACCCUCCAUGGA	TTTT	662	
ヒト-エクソン 43	32	1	CUGAAAUAAAUUCUACAGUUCCCU	TTTC	663	
ヒト-エクソン 43	33	-1	UUUAUUUCAGUACCCUCCAUGGAA	TTTT	664	
ヒト-エクソン 43	34	-1	UACCCUCCAUGGAAAAAAGACAGG	TTTC	665	
ヒト-エクソン 43	35	-1	ACCCUCCAUGGAAAAAAGACAGGG	TTTT	666	
ヒト-エクソン 43	36	-1	CCCUGCAUGGAAAAAAGACAGGGA	TTTT	667	
ヒト-エクソン 43	37	1	UUUUUCCAUGGAGGGUACUGAAA	TTTA	668	
ヒト-エクソン 43	38	1	UGUCUUUUUCCAUGGAGGGUACU	TTTC	669	
ヒト-エクソン 6	1	1	CCUUGAGCAAGAACCAUGCAAACU	TTTA	670	30
ヒト-エクソン 6	2	-1	UGCUCAGGAAUGCAUUUUCUUAU	TTTC	671	
ヒト-エクソン 6	3	-1	GCUCAAGGAAUGCAUUUUCUUAUG	TTTT	672	
ヒト-エクソン 6	4	1	UGCAUCCUUGAGCAAGAACCAUG	TTTG	673	
ヒト-エクソン 6	5	-1	GAAAAUUUAUUUCCACAUGUAGGU	TTTG	674	
ヒト-エクソン 6	6	-1	AAAAUUUAUUUCCACAUGUAGGUC	TTTT	675	
ヒト-エクソン 6	7	-1	AAAUUUUAUUUCCACAUGUAGGUCA	TTTT	676	
ヒト-エクソン 6	8	1	CAUGUGGAAAUAAAUUUUCAUAAAG	TTTT	677	
ヒト-エクソン 6	9	1	ACAUGUGGAAAUAAAUUUUCAUAA	TTTC	678	
ヒト-エクソン 6	10	-1	CCACAUGUAGGUCAAAAUGUAAU	TTTC	679	
ヒト-エクソン 6	11	-1	CACAUGUAGGUCAAAAUGUAAUG	TTTT	680	
ヒト-エクソン 6	12	-1	ACAUGUAGGUCAAAAUGUAAUGA	TTTT	681	40
ヒト-エクソン 6	13	1	ACAUUUUUGACCUACAUGUGGAAA	TTTA	682	
ヒト-エクソン 6	14	1	CAUUACAUUUUUGACCUACAUGUG	TTTC	683	
ヒト-エクソン 6	15	-1	AAAAUAUCAUGGCUGGAUUGCAA	TTTG	684	
ヒト-エクソン 6	16	-1	GCUGGAUUGCAACAAACCAACAGU	TTTC	685	

ヒト-エクソン 6	17	-1	CUGGAUUGCAACAAACCAACAGUG	TTTT	686	10
ヒト-エクソン 6	18	1	CCUAUGACUAUGGAUGAGAGCAUU	TTTG	687	
ヒト-エクソン 6	19	-1	UAGGUAAGAAGAUUACUGAGACAU	TTTA	688	
ヒト-エクソン 6	20	-1	AUUACUGAGACAUUAAAUAAACUUG	TTTA	689	
ヒト-エクソン 6	21	-1	UUACUGAGACAUUAAAUAAACUUGU	TTTT	690	
ヒト-エクソン 6	22	1	GGGGAAAAAU AUGUCAUCAGAGUC	TTTA	691	
ヒト-エクソン 6	23	1	CAUGAUCUGGAACCAUACUGGGGA	TTTT	692	
ヒト-エクソン 6	24	1	ACAUGAUCUGGAACCAUACUGGGG	TTTT	693	
ヒト-エクソン 6	25	1	GACAUGAUCUGGAACCAUACUGGG	TTTC	694	
ヒト-エクソン 7	1	1	uacacacauacacaAAGACAAUA	TTTA	695	
ヒト-エクソン 7	2	1	uacacauacacacauacacaAGA	TTTG	696	20
ヒト-エクソン 7	3	1	aacacauacacauacacacauaca	TTtg	697	
ヒト-エクソン 7	4	1	AUUC CAGUCAAAUAGGUCUGGCCU	ttTT	698	
ヒト-エクソン 7	5	1	UAUUC CAGUCAAAUAGGUCUGGCC	tTTA	699	
ヒト-エクソン 7	6	1	GCUGGCAAACCACACUAUUC CAGU	TTTG	700	
ヒト-エクソン 7	7	1	AGUCGUUGUGUGGCUGACUGCUGG	TTTG	701	
ヒト-エクソン 7	8	-1	CGCCAGAUUAUCAAUUAGGCAUAGA	TTTC	702	
ヒト-エクソン 7	9	-1	AAACUACUCGAUCCUGAAGGUUGG	TTTA	703	
ヒト-エクソン 7	10	1	CAUACUAAAAGCAGUGGUAGUCCA	TTTC	704	
ヒト-エクソン 7	11	1	GAAAACAUAUAAACUCUACCAUACU	TTTT	705	
ヒト-エクソン 7	12	1	UGAAAACAUAUAAACUCUACCAUAC	TTTA	706	30
ヒト-エクソン 8	1	-1	UUGUUCAUAUCCUUUUAGAGUCU	TTTG	707	
ヒト-エクソン 8	2	1	AAAGGAUAAUGAACAAAUCAAAGU	TTTA	708	
ヒト-エクソン 8	3	-1	UAUCCUUUUAGAGUCUCAAAUAUA	TTTC	709	
ヒト-エクソン 8	4	1	ACUCUAAAAGGAUAAUGAACAAAU	TTTG	710	
ヒト-エクソン 8	5	-1	UUUUAGAGUCUCAAAUAUAGAAAC	TTTG	711	
ヒト-エクソン 8	6	-1	UUUAGAGUCUCAAAUAUAGAAACC	TTTT	712	
ヒト-エクソン 8	7	-1	UUAGAGUCUCAAAUAUAGAAACCA	TTTT	713	
ヒト-エクソン 8	8	1	UUGAGACUCUAAAAGGAUAAUGAA	TTTG	714	
ヒト-エクソン 8	9	1	UUUGGUUUCUAUAUUUGAGACUCU	TTTT	715	
ヒト-エクソン 8	10	1	UUUUGGUUUCUAUAUUUGAGACUC	TTTA	716	
ヒト-エクソン 8	11	-1	AGCAUUGAAGCCAUCCAGGAAGUG	TTTC	717	40
ヒト-エクソン 8	12	1	GCUUCA AUGCUCACUUGUUGAGGC	TTTT	718	
ヒト-エクソン 8	13	1	GGCUUCA AUGCUCACUUGUUGAGG	TTTG	719	
ヒト-エクソン 8	14	-1	AGUGGAAAUGUUGCCAAGGCCACC	TTTA	720	
ヒト-エクソン 8	15	-1	GUUGCCAAGGCCACCUAAAGUGAC	TTTA	721	
ヒト-エクソン 8	16	-1	GAAGAACAUUUUCAGUUA CAUCAU	TTTG	722	
ヒト-エクソン 8	17	-1	AUCAA AUGCACUAUUCUCAACAGG	TTTA	723	
ヒト-エクソン 8	18	1	AUAGUGCAUUUGAUGAUGUAACUG	TTTT	724	
ヒト-エクソン 8	19	1	AAUAGUGCAUUUGAUGAUGUAACU	TTTC	725	
ヒト-エクソン 8	20	-1	ACUAUUCUCAACAGGUAAAGUGUG	TTTA	726	
ヒト-エクソン 8	21	1	UACCUAAAAAUGCAUAUAAAACAG	TTTT	727	

ヒト-エクソン8	22	1	AUACCUAAAAAUGCAUAUAAAACA	TTTC	728
ヒト-エクソン8	23	1	CACGUAAUACCUAAAAAUGCAUAU	TTTT	729
ヒト-エクソン8	24	1	GCACGUAAUACCUAAAAAUGCAUA	TTTA	730
ヒト-エクソン8	25	1	auauauauGUGCACGUAAUACCUA	TTTT	731
ヒト-エクソン8	26	1	uauauauauGUGCACGUAAUACCU	TTTT	732
ヒト-エクソン8	27	1	auauauauauGUGCACGUAAUACC	TTTA	733
ヒト-エクソン55	1	-1	CUGCACAAUAUUAUAGUUGUUGCU	TTTA	734
ヒト-エクソン55	2	1	AUAAAAAGAGAAAGAUGGAGGAAC	TTTA	735
ヒト-エクソン55	3	1	CACCUAGUGAACUCCAUAAAAAGA	TTTC	736
ヒト-エクソン55	4	1	AUGGUGCACCUAGUGAACUCCAUA	TTTT	737
ヒト-エクソン55	5	1	AAUGGUGCACCUAGUGAACUCCAUA	TTTT	738
ヒト-エクソン55	6	1	GAAUGGUGCACCUAGUGAACUCCA	TTTA	739
ヒト-エクソン55	7	1	GACCAAUGUUCAGAUUGCAAUUAU	TTTA	740
ヒト-エクソン55	8	1	UCGCUCACUCACCCUGCAAAGGAC	TTTG	741
ヒト-エクソン55	9	-1	AGUGAGCGAGAGGCUGCUUUGGAA	TTTC	742
ヒト-エクソン55	10	1	GCAGCCUCUCGCUCACUCACCCUG	TTTG	743
ヒト-エクソン55	11	1	UUGCAGUAAUCUAUGAGUUUCUUC	TTTG	744
ヒト-エクソン55	12	-1	CUGCAACAGUUCCCCCUGGACCUG	TTTC	745
ヒト-エクソン55	13	-1	UGCAACAGUUCCCCCUGGACCUGG	TTTT	746
ヒト-エクソン55	14	-1	UUUCUUGCCUGGCUUACAGAAGCU	TTTC	747
ヒト-エクソン55	15	1	UUUCAGCUUCUGUAAGCCAGGCAA	TTTC	748
ヒト-エクソン55	16	-1	GUCCUACAGGAUGCUACCCGUAAG	TTTC	749
ヒト-エクソン55	17	-1	GGCUCCUAGAAGACUCCAAGGGAG	TTTA	750
ヒト-エクソン55	18	-1	GCUCCUAGAAGACUCCAAGGGAGU	TTTT	751
ヒト-エクソン55	19	-1	CUCCAAGGGAGUAAAAGAGCUGAU	TTTC	752
ヒト-エクソン55	20	1	UGGAUCCACAAGAGUGCUAAAGCG	TTTC	753
ヒト-エクソン55	21	1	GUUCAAUUGGAUCCACAAGAGUGC	TTTA	754
ヒト-エクソン55	22	-1	UACUUGUAAACUGACAAGCCAGGGA	TTTG	755
ヒト-エクソン55	23	-1	ACUUGUAAACUGACAAGCCAGGGAC	TTTT	756
ヒト-エクソン55	24	-1	GUAACUGACAAGCCAGGGACAAAA	TTTG	757
ヒト-エクソン55	25	-1	UAACUGACAAGCCAGGGACAAAAC	TTTT	758
ヒト-エクソン55	26	1	UCCCUGGCUUGUCAGUUACAAGUA	TTTG	759
ヒト-G1-エクソン51		1	CAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGc	TTTA	760
ヒト-G2-エクソン51		1	uacuuuguuuagcaauacauggua	TTTC	761
ヒト-G3-エクソン51		-1	uggcucaaauguuacucucaau	TTTA	762
マウス-エクソン23-G1		1	CUUUCAAagaacuuugcagagccu	TTTG	763
マウス-エクソン23-G2		1	guugaaGCCAUUUUGUUGCUCUUU	TTTG	764
マウス-エクソン23-G3		1	guugaaGCCAUUUUAUUGCUCUUU	TTTG	765

10

20

30

40

マウス-エクソン23-G4		-1	uuuugagGCUCUGCAAAGUUCUUU	TTTC	766
マウス-エクソン23-G5		-1	aguuaauaaugcauagauauucag	TTTA	767
マウス-エクソン23-G6		-1	uauaauaugcccuguaauauaaua	TTTC	768
マウス-エクソン23-G7		1	uaaaggccaaaccucggcuuaccU	TTTC	769
マウス-エクソン23-G8		1	ucaauaucuugaaggacucuggg	TTTA	770

* この表において、大文字は、遺伝子のエクソン配列と整列しているsgRNAヌクレオチドを表す。小文字は、遺伝子のイントロン配列と整列しているsgRNAヌクレオチドを表す。

【実施例】

【0159】

VI. 実施例

以下の実施例は、本開示の好ましい態様を実証するために含まれる。以下の実施例において開示される技術が、本開示の実践において良好に機能すると本発明者によって発見された技術を代表するものであり、したがって、これがその実践のための好ましい様式に相当すると見なすことができると、当業者は理解するはずである。しかしながら、当業者は、本開示に照らして、本開示の精神および範囲から逸脱することなく、開示されている具体的な態様において多くの変更を行うことができ、それでも同様のまたは類似の結果を得ることができるものと理解するはずである。

【0160】

実施例1 - 材料および方法

pLbCpf1-2A-GFPプラスミドおよびpAsCpf1-2A-GFPプラスミドの作製

ヒトコドン最適化LbCpf1およびAsCpf1を、それぞれ、Feng Zhang (Addgene plasmid # 69988) からの贈与であるpY016プラスミド (Zetsche et al., 2015) (pcDNA3.1-hLbCpf1) およびFeng Zhang (Addgene plasmid # 69982) からの贈与であるpY010プラスミド (Zetsche et al., 2015) (pcDNA3.1-hAsCpf1) からPCR増幅させた。Cpf1 cDNAおよびT2A-GFP DNA断片を、Feng Zhang (Addgene plasmid # 48138) からの贈与である、AgeI/EcoRIで切断してSpCas9 (BB) -2A-GFPを除去したpSpCas9(BB) -2A-GFP (PX458) プラスミド (Ran et al., 2015) の骨格にクローニングした。In-Fusion HDクローニングキット (Takara Bio) を使用した。ヒトDMDまたはマウスDmd遺伝子座を標的とするCpf1ガイドRNA (gRNA) を、新たに作製されたpLbCpf1-2A-GFPプラスミドおよびpAsCpf1-2A-GFPプラスミドに、BbsI消化およびT4ライゲーションを使用してサブクローニングした。詳細なプライマー配列を表Cに見いだすことができ、ゲノム標的配列を表Dに見いだすことができ、gRNA配列を表Eに見いだすことができる。

【0161】

ヒトiPSCの維持、ヌクレオフェクション、および分化

ヒトiPSCをmTeSR (商標) 1培地 (STEMCELL Technologies) 中で培養して、およそ4日毎に継代した (継代比率1:18)。ヌクレオフェクションの1時間前に、iPSCを10 μ M ROCK阻害剤 (Y-27632) で処理して、Accutase (Innovative Cell Technologies, Inc.) を使用して単一細胞に解離させた。1 $\times 10^6$ のiPSC細胞をpLbCpf1-2A-GFPプラスミドまたはpAsCpf1-2A-GFPプラスミド5 μ gと混合し、P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X kit (Lonza) を製造業者のプロトコルに従って使用してヌクレオフェクトした。ヌクレオフェクション後、10 μ M ROCK阻害剤、ペニシリン-ストレプトマイシン (1:100) (ThermoFisher Scientific) および100 μ g/ml Primosin (InvivoGen) を補充したmTeSR (商標) 1培地中でiPSCを培養した。ヌクレオフェクションの3日後、GFP (+) 細胞およびGFP (-) 細胞をFACSによって選別して、T7E1アッセイに供した。GFP (+) から単一クローンを得た。iPSCを採取して配列決定した。過去に記載されている通り (Burridge et al. 2014)、心筋細胞へ分化するようにiPSCを誘導した。

【 0 1 6 2 】

ゲノムDNAの単離

Quick-gDNA MiniPrep kit (Zymo Research) を製造業者のプロトコルに従って使用して、マウス10T1/2線維芽細胞およびヒトiPSCのゲノムDNAを単離した。

【 0 1 6 3 】

RT-PCR

TRIzol (ThermoFisher Scientific) を製造業者のプロトコルに従って使用してRNAを単離した。iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad Laboratories) を製造業者のプロトコルに従って使用してcDNAを合成した。DMDエクソン47および52に隣接するプライマーを使用してRT-PCRを実施した。

フォワード: 5'-CCCAGAAGAGCAAGATAAACTTGAA-3' (SEQ ID NO: 1);

リバーズ: 5'-CTCTGTTCCAAATCCTGCTTGT-3' (SEQ ID NO: 2)

【 0 1 6 4 】

WT心筋細胞、未修正の心筋細胞、およびエクソン51スキッピングした心筋細胞から増幅させたRT-PCR産物は、それぞれ、717bp、320bp、および87bpであった。

【 0 1 6 5 】

ジストロフィンのウエスタンブロット分析

過去に記載されている通り (Long et al., 2014)、ウサギ抗ジストロフィン抗体 (Abcam, ab15277) およびマウス抗心臓ミオシン重鎖抗体 (Abcam, ab50967) を使用してウエスタンブロット分析を実施した。

【 0 1 6 6 】

ジストロフィンの免疫細胞化学および免疫組織化学

iPSC由来心筋細胞をアセトンで固定し、血清カクテル (2% 正常ウマ血清 / 2% 正常ロバ血清 / 0.2% ウシ血清アルブミン (BSA) / PBS) でブロッキングし、ジストロフィン抗体 (MANDYS8, 1:800, Sigma-Aldrich) およびトロポニン-I抗体 (H170, 1:200, Santa Cruz Biotechnology) と0.2% BSA/PBS中でインキュベートした。4℃で一晩インキュベートした後、これらを二次抗体 (ビオチン化ウマ抗マウスIgG, 1:200, Vector Laboratories, フルオレセインコンジュゲートロバ抗ウサギIgG, 1:50, Jackson ImmunoResearch) と1時間インキュベートした。Hoechst 33342 (Molecular Probes) で核を対比染色した。

【 0 1 6 7 】

過去に記載されている通り (Long et al., 2014)、ジストロフィン抗体 (MANDYS8, 1:800, Sigma-Aldrich) を使用して骨格筋肉の免疫組織化学を実施した。ヨウ化プロピジウム (Molecular Probes) で核を対比染色した。

【 0 1 6 8 】

ミトコンドリアDNAのコピー数の定量

過去に記載されている通り (Zechner et al., 2010)、Trizolを使用してゲノムおよびミトコンドリアDNAを単離し、続いて逆抽出した。KAPA SYBR FAST qPCR kit (Kapa Biosystems) を使用してリアルタイムPCRを実施し、ミトコンドリアDNAのコピー数を定量的に決定した。ヒトミトコンドリアND1遺伝子を、プライマー (フォワード:

5'-CGCCACATCTACCATCACCCCTC -3' (SEQ ID NO: 3)

; リバーズ:

5'-CGGCTAGGCTAGAGGTGGCTA -3' (SEQ ID NO: 4)

) を使用して増幅させた。ヒトゲノムLPL遺伝子を、プライマー (フォワード:

5'-GAGTATGCAGAAGCCCCGAGTC -3' (SEQ ID NO: 5)

; リバーズ:

5'-TCAACATGCCCCAACTGGTTTCTGG -3' (SEQ ID NO: 6)

) を使用して増幅させた。二倍体ゲノム当たりのmtDNAコピー数を、下記式を使用して算出した。

$$CT = (mtND1 \text{ CT} - LPL \text{ CT})$$

10

20

30

40

50

二倍体ゲノム当たりのmtDNAコピー数=2×2- CT

【0169】

細胞呼吸率

過去に記載されている通り (Baskin et al., 2014)、XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience) を製造業者のプロトコルに従って使用して、ヒトiPSC由来心筋細胞において酸素消費率 (OCR) を決定した。

【0170】

LbCpf1 mRNAおよびgRNAのインビトロ転写

ヒトコドン最適化LbCpf1を、pLbCpf1-2A-GFPから、T7 プロモーター配列を含むようにPCR増幅させた (表S1)。mMESSAGE mMACHINE T7転写キット (ThermoFisher Scientific) を製造業者のプロトコルに従って使用して、PCR産物を転写した。合成したLbCpf1 mRNAを、E. coli Poly(A) Polymerase (New England Biolabs) でポリAテール化し、NucAwayスピンカラム (ThermoFisher Scientific) を使用して精製した。

【0171】

LbCpf1 gRNAインビトロ転写のための鋳型をpLbCpf1-2A-GFPプラスミドからPCR増幅させ、Wizard SVゲルおよびPCRクリーンアップシステム (Promega) を使用して精製した。MEG Ashortscript T7転写キット (ThermoFisher Scientific) を製造業者のプロトコルに従って使用してLbCpf1 gRNAを合成した。合成したLbCpf1 gRNAを、NucAwayスピンカラム (ThermoFisher Scientific) を使用して精製した。

【0172】

一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN)

ssODNをHDR鋳型として使用して、Integrated DNA Technologiesによって4nM Ultramer オリゴヌクレオチドとして合成した。ssODNを、精製なしで、LbCpf1 mRNAおよびgRNAと直接混合した。ssODNの配列は、以下のとおりである。

5'-TGATATGAATGAACTCATCAAATATGCGTGTAGTGTAATGAACTTCTATTTA
ATTTTGAGGCTCTGCAAAGTTCTTTAAAGGAGCAGCAGAATGGCTTCAACTATCT
GAGTGACACTGTGAAGGAGATGGCCAAGAAAGCACCTTCAGAAATATGCCAGAA
ATATCTGTCAGAATTT-3' (SEQ ID NO: 7)

【0173】

単細胞胚注射によるCRISPR-Cpf1媒介性ゲノム編集

全ての動物の取り扱いは、テキサス大学南西医療センターの動物実験委員会によって承認された。注射手順を過去に記載の通り実施した (Long et al., 2014)。唯一の変更は、Cas9 mRNAおよびCas9 sgRNAをLbCpf1 mRNAおよびLbCpf1 gRNAに置き換えたことであった。

【0174】

ゲノムDNAのPCR増幅、T7E1アッセイ、およびTseI RFLP分析

これらの方法を過去に公開されている通り実施した (Long et al., 2014)。

【0175】

統計分析

統計分析は、両側スチューデントのt検定によって評価した。データを平均±SEMとして示す。P<0.05の値を統計的に有意であると見なした。

【0176】

実施例2 - 結果

Cpf1媒介性ゲノム編集によるDMD iPSC由来心筋細胞の修正

フレーム外エクソンを並列することによってオープンリーディングフレーム (ORF) を破壊する、ヒトDMD遺伝子のエクソン51の前のエクソン欠失は、最も一般的なタイプのヒトDMD変異である (Aartsma-Rus et al., 2009)。エクソン51のスキッピングは、原理上、エクソン欠失を有するDMD患者の13%でDMD ORFを回復させることができる (Cirak et al., 2011)。このタイプの「ホットスポット」変異を修正するCpf1の潜在性を試験するた

10

20

30

40

50

めに、本発明者らは、エクソン48～50の欠失を保有するDMD線維芽細胞由来iPSC (Riken H PS0164、略称Riken51) を使用して、エクソン51内に中途終止コドンを導入した (図1A)。

【0177】

スプライスアクセプター領域は、一般に、Cpf1エンドヌクレアーゼによるゲノム編集のための理想的なPAM配列を生み出すT/Cリッチ (Padgett, 2012) である (図1B)。Riken51 iPSCにおけるジストロフィン発現を回復させるために、本発明者らは、エクソン51を標的とするCpf1 gRNAを使用して、NHEJによって小さな挿入および欠失 (INDEL) をエクソン51に導入し、その後、理論的には修正された遺伝子の3分の1において、ジストロフィンORFをリフレーミングした (本発明者らが「リフレーミング」と呼ぶプロセス) (図1A)。

10

【0178】

プラスミドpLbCpf1-2A-GFPおよびpAsCpf1-2A-GFPにクローニングした (図1D) ガイドRNA (g1と命名) を使用して、Cpf1切断をエクソン51のTリッチスプライスアクセプター部位にターゲティングした (図1C)。これらのプラスミドは、ヒトコドン最適化されたLbCpf1またはAsCpf1に加えてGFP (Cpf1発現細胞の蛍光活性化セルソーティング (FACS) を可能にする) を発現する (図1D)。最初に、本発明者らは、g1を用いたCpf1編集の切断効率をヒト293T細胞において評価した。完全に一致しないDNAを認識および切断するT7E1アッセイを使用して検出された通り、LbCpf1およびAsCpf1は両方とも、g1と共にDNA切断を効率的に誘導した (図1E)。

20

【0179】

次に、本発明者らは、LbCpf1およびAsCpf1をg1と共に使用して、Riken51 iPSCを編集し、T7E1アッセイによって、本発明者らは、DMDエクソン51でのゲノム切断を観察した (図1E)。Cpf1編集DMDエクソン51からのゲノムPCR産物をクローニングおよび配列決定した (図6A)。本発明者らは、LbCpf1およびAsCpf1で編集したRiken51 iPSCの両方においてエクソン51スプライスアクセプター部位の近くにINDELを観察した (図6A)。リフレーミングされたRiken51 iPSCの混合物由来の単一クローンを採取および増大させ、編集したゲノム領域を配列決定した。12のクローンのうち、本発明者らは、ORFを回復させたリフレーミングされたDMDエクソン51を有する4つのクローンを観察した (図6B)。

30

【0180】

Cpf1媒介性リフレーミング後のDMD iPSC由来心筋細胞におけるジストロフィン発現の回復
リフレーミング戦略を使用してCRISPR-Cpf1によって編集されたRiken51 iPSCを、心筋細胞へ分化するように誘導した (Burridge et al., 2014) (図2A)。エクソン47を標的とするフォワードプライマーおよびエクソン52を標的とするリバースプライマーを使用したRT-PCRによって、リフレーミングされたDMD遺伝子を有する心筋細胞を同定し、PCR産物を配列決定した (図2B～C)。未修正のiPSC由来心筋細胞は、エクソン51によってコードされる最初の8つのアミノ酸の後に中途終止コドンを有し、これが中途停止コドンを生み出す (図2C)。エクソン47～52の増幅からのRT-PCR産物の配列決定によって明らかのように、Cpf1編集Riken51 iPSCから分化した心筋細胞は、DMD ORFの回復を示した (図2C)。

40

【0181】

LbCpf1編集Riken51 iPSCの混合物から、本発明者らは、異なるサイズのインフレームINDELを有する2つのクローン (クローン#2および#5) を採取し、このクローンを心筋細胞へと分化させた。クローン#2は、エクソン48～50の内部欠失と共に、エクソン51の5'端に8bpの欠失を有していた。合計405bpの欠失は、DMD ORFを回復させ、135アミノ酸の欠失を有

50

する短縮型ジストロフィンタンパク質の産生を可能にした。クローン#5は、エクソン51に17bpの欠失を有して、138アミノ酸の欠失を有するジストロフィンタンパク質を産生した。Cpf1による切断の効率は高いが、切断部位で挿入または欠失するDNAの量は変動する。加えて、INDELは、編集された遺伝子座に余分なコドンを生じ、ORFの変化を引き起こし得る。クローン#2の心筋細胞によって発現されたジストロフィンタンパク質は、エクソン47とエクソン51との間に追加の4つのアミノ酸（Leu-Leu-Leu-Arg）を生じしたが、クローン#5の心筋細胞によって発現されたジストロフィンタンパク質は、わずか1つの追加のアミノ酸（Leu）を生じさせた。クローン#2および#5の両方から、本発明者らは、ウエスタンブロット分析および免疫細胞化学によって、回復したジストロフィンタンパク質を観察した（図2F~G）。ジストロフィンの大きなサイズに起因して、内部欠失した形態は、WTジストロフィンと同様にSDS-PAGE上を移動した。

10

【0182】

本発明者らはまた、ミトコンドリアDNAのコピー数および細胞呼吸率を測定することによって、DMD iPSC由来心筋細胞の機能的分析を実施した。未修正のDMD iPSC由来心筋細胞は、LbCpf1で修正された心筋細胞よりも顕著に少ないミトコンドリアを有していた（図2H）。LbCpf1媒介性リフレーミングの後、両方の修正されたクローンは、ミトコンドリア数を、WT心筋細胞と同程度のレベルまで回復させた（図2H）。クローン#2のiPSC由来心筋細胞はまた、ベースラインで未修正のiPSC由来心筋細胞と比較して酸素消費率（OCR）の増加を示した（図2I）。OCRは、全てのiPSC由来心筋細胞においてオリゴマイシンによって抑制され、脱共役剤FCCPでの処置は、OCRを増強した。最後に、ロテノンおよびアンチマイシンAでの処置は、全ての心筋細胞においてOCRをさらに抑制した。これらの結果は、Cpf1媒介性DMD修正が、修正されたiPSC心筋細胞においてミトコンドリアの呼吸容量を改善したことを実証している。本発明者らの知見は、Cpf1媒介性リフレーミングが、ヒト心筋細胞におけるDMD表現型を回復させる高度に効率的な戦略であることを示す。

20

【0183】

Cpf1媒介性エクソンスキッピングによるDMD iPSC由来心筋細胞におけるジストロフィン発現の回復

小さいINDELを導入する単一gRNA媒介性リフレーミング法とは対照的に、エクソンスキッピングは、2つのgRNAを使用して、スプライス部位を破壊し、大きな欠失を生じさせる（図3A）。Riken51 iPSCにおいてジストロフィン発現を回復させる独立した戦略として、本発明者らは、イントロン50の3'端を標的とする2つのLbCpf1 gRNA（g2およびg3）を設計し、ヒト293T細胞において切断効率を試験した。T7E1アッセイは、g3と比較してg2がイントロン50内でより高い切断効率を有していたことを示した（図3B）。それ故、本発明者らは、エクソン51のスプライスアクセプター部位を破壊する目的で、LbCpf1、g2、およびg1（g1は、エクソン51の5'領域を標的とする）をRiken51 iPSCに共送達した。ゲノムPCRは、LbCpf1編集iPSCにおいてより低いバンドを示し（図3C）、配列決定データは、イントロン50とエクソン51との間に約200bpの欠失の存在を確認し、これが保存されたスプライスアクセプター部位を破壊した（図3D）。

30

【0184】

g1およびg2を用いたエクソンスキッピング戦略によって編集されたRiken51 iPSCを心筋細胞へと分化させた。エクソン47を標的とするフォワードプライマーおよびエクソン52を標的とするリバースプライマーを使用したRT-PCRによって、編集されたDMD対立遺伝子を保有する細胞を同定した；エクソン51のスキッピングを可能にするエクソン51スプライスアクセプター部位の欠失を示している（図3E）。RT-PCR産物の配列決定は、エクソン47がエクソン52にスプライスされたことを確認し、これがDMD ORFを回復させた（図3F）。ウエスタンブロット分析および免疫細胞化学は、LbCpf1編集心筋細胞とg1およびg2の混合物においてジストロフィンタンパク質発現の回復を確認した（図3G~H）。したがって、エクソンスキッピング戦略によるCpf1編集は、ヒト心筋細胞においてDMD表現型を回復させる際に高度に効率的である。

40

【0185】

50

Cpf1媒介性修正によるmdxマウスにおけるジストロフィンの回復

インビボでのCpf1媒介性Dmd修正の潜在性をさらに評価するために、本発明者らは、LbCpf1を使用して、HDR媒介性修正またはNHEJ媒介性リフレーミングによって、mdxマウスの生殖細胞系における変異を永続的に修正した。mdxマウスは、CからTへの転換に起因して、Dmd遺伝子のエクソン23にナンセンス変異を保有する（図4A）。エクソン23を標的とする3つのgRNA（g1、g2、およびg3）をスクリーニングし、マウス10T1/2線維芽細胞において切断効率を試験した（図4B）。T7E1アッセイは、LbCpf1およびAsCpf1がDmdエクソン23において異なる切断効率を有していたことを明らかにした（図4C）。配列決定結果に基づくと、g2を使用したLbCpf1媒介性ゲノム編集は、g3と比較して、マウス線維芽細胞においてより大きなINDELの発生をもたらした（図6C）。

10

【0186】

g2を用いたLbCpf1編集は、変異部位の9bp上流のPAM配列を認識し、変異部位の8bp下流に突出型二本鎖DNA切断を生じる（図4D）。ゲノム修飾を導入するのに二本鎖ドナープラスミドよりも一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ssODN）が効率的であることが示されているので（Wu et al., 2013; Long et al., 2014）、HDRゲノム編集を得るために、本発明者らは、180bpのssODNをLbCpf1およびg2と組み合わせて使用した。本発明者らは、過去に記載されている通り（Long et al., 2014）、4つのサイレント変異およびジェノタイピングを容易にするTseI制限部位を含む、切断部位に隣接する90bpの相同配列を含有するssODNを作製した。このssODNを、LbCpf1およびg2と共に使用して、Dmdエクソン23内のCからTへの変異を修正し、HDRによってmdxマウスにおけるジストロフィンを回復させるように設計した。

20

【0187】

LbCpf1媒介性HDRによるmdxマウスにおける筋ジストロフィーの修正

mdx接合体に、インビトロ転写されたLbCpf1 mRNA、インビトロ転写されたg2 gRNA、および180bp ssODNを共注射し、偽妊娠の雌に再移植した（図5A）。LbCpf1編集mdxマウスの3組の同腹仔を、T7E1アッセイおよびTseI RFLP（制限酵素断片長多型）によって分析した（図5B～C）。TseI RFLPおよび配列決定によって検出された通り、産まれた24匹の仔のうち、12匹がT7E1陽性であり、5匹が修正された対立遺伝子（mdx C1～C5）を保有していた（図5C～D）。WTマウス、mdxマウス、およびLbCpf1修正されたmdx-Cマウス由来の骨格筋（前脛骨筋および腓腹筋-足底筋）を、4週齢のときに分析した。筋肉のヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）染色は、mdx筋肉において線維化および炎症性浸潤を示したが、LbCpf1修正された（mdx-C）筋肉は、正常な筋肉形態を呈し、ジストロフィー表現型の兆候はなかった（図5Eおよび図7A～B）。免疫組織化学は、mdxマウスの筋肉切片においてジストロフィン陽性線維が存在しないことを示したが、LbCpf1媒介性HDRによって修正されたmdx-C筋肉は、筋線維の大部分でジストロフィタンパク質発現を示した（図5Fおよび図7A～B）。これらの知見は、生殖細胞系DNAのLbCpf1媒介性編集が、マウスにおいて筋ジストロフィーを効果的に予防できることを示す。

30

【0188】

実施例3 - 考察

この研究で、本発明者らは、新たに発見されたCRISPR-Cpf1ヌクレアーゼが、患者由来iPSCおよびmdxマウスにおいてDMD変異を効率的に修正でき、これによってジストロフィン発現の回復が可能となることを示す。DMDにおけるジストロフィンの欠如は、筋線維鞘の完全性を崩壊させ、ミトコンドリア機能不全および酸化ストレスを引き起こすことが示されている（Millay et al., 2008; Mourkioti et al., 2013）。本発明者らは、LbCpf1で修正されたiPSC由来心筋細胞において、未修正のDMD iPSC由来心筋細胞と比較して増加したミトコンドリアDNAおよびより高い酸素消費率を見いだした。また、Cpf1媒介性ゲノム編集によって、ヒトDMD iPSC由来心筋細胞の代謝異常も回復した。本発明者らの知見はまた、マウスゲノム編集におけるCpf1の堅固性および効率も実証した。HDR媒介性修正を使用することによって、マウスDmd遺伝子のORFは完全に回復し、線維化および炎症性浸潤などのジストロフィー表現型の病態生理学的特徴も回復した。

40

50

【0189】

LbCpf1媒介性ゲノム編集を使用してDMD遺伝子のORFを回復させることに、2つの異なる戦略、「リフレーミング」および「エクソンスキッピング」を適用した。リフレーミングは、小さいINDELを生じさせて、アウトオブフレームコドンインフレームに配置することによってORFを回復させる。リフレーミングには1つのgRNAのみが必要である。本発明者らは、免疫細胞化学によって、WTジストロフィンタンパク質とリフレーミングされたジストロフィンタンパク質との間で細胞内局在性に関していかなる差異も観察できなかったが、本発明者らは、別個の編集されたクローンで、ジストロフィン発現レベル、ミトコンドリアDNA量、および酸素消費率の差異を観察しており、このことは、リフレーミングされたジストロフィンが、WTジストロフィンと構造的にも機能的にも同一ではない可能性があることを示唆している。

10

【0190】

Cpf1編集で1つまたは2つのgRNAを使用することに関して様々な課題が考慮されるべきである。ここで、本発明者らは、リフレーミングと比較して、スプライスアクセプター部位の破壊には、1つのgRNAよりも2つのgRNAがより有効であることを示す。2つのgRNAを使用したとき、Cpf1編集は、介在領域を切除し、スプライスアクセプター部位を除去するだけでなく、有害な「AG」ヌクレオチドを除去するように設計することもでき、これによって偽スプライスアクセプター部位が生成する可能性を排除することができる。しかしながら、2つのgRNAでは、両方のgRNAが同時に切断する必要があるが、それが起こらない可能性がある。2つのgRNAのうちの1つだけが切断する場合、所望の欠失は生成されないであろう。しかしながら、2つのgRNAのうちの1つでの切断は、標的のエクソン領域でINDELを生成し、理論上INDELの3分の1がインフレームであるので、ORFをリフレーミングする可能性が残る。スプライスアクセプター部位を破壊するために1つのgRNAを使用することは、2つの同時切断が起こる必要性を排除するので、より効率的であると考えられる。しかしながら、1つのgRNA媒介性編集によって生成されるINDELの長さに関しては不確実性がある。より重要なことに、1つのgRNAでは、代替の偽スプライスアクセプター部位として働き得るエクソン「AG」ヌクレオチドを切断部位の近くに残す可能性が残る。

20

【0191】

Cpf1は、そのユニークなトリッチPAM配列によって、CRISPRファミリーのゲノム編集範囲をさらに拡大し、このことは、全ての変異部位がSpCas9のためのグリッチPAM配列または他のCas9オルソログのためのPAMを含有するわけではないので、他の疾患関連変異の潜在的な修正にとって重要である。さらに、Cpf1によって生じる突出型切断は、NHEJ媒介性ゲノム編集にも有利であり得る(Maresca et al., 2013)。最後に、この研究で使用されたLbCpf1は、最も広く利用されているSpCas9よりも140アミノ酸小さく、このことは、AAVによるパッケージングおよび送達を強化するであろう。Cpf1の標的特異性を評価するために、2つのグループ(Kim et al., 2016; Tsai et al., 2016)が、複数の方法によってLbCpf1およびAsCpf1のゲノムワイド編集効率を判定した。両研究共に、LbCpf1およびAsCpf1が、SpCas9に匹敵する高いゲノムワイド標的効率と、LbCpf1およびAsCpf1が5' PAM近位領域でミスマッチを許容しないという理由で高い標的特異性を有しており、これによってオフターゲット効果の頻度が低下することを示した。

30

40

【0192】

これらの知見は、ヒトDMD変異およびマウスDmd変異をインビトロおよびインビボで修正する際にCpf1が高度に効率的であることを示す。CRISPR-Cpf1媒介性ゲノム編集は、DMDおよび他の障害に関連する遺伝子変異を永続的に排除してその異常を回復させる、新規で強力なアプローチとなる。

【0193】

本明細書において開示および主張された組成物および/または方法は全て、本開示に照らして、過度の実験なしに作製および実施することができる。本開示の組成物および方法は、好ましい態様に関して記載されているが、本明細書に記載の組成物および/または方法ならびにその方法の工程または工程の順序に対して、本開示の概念、精神、および範囲

50

から逸脱することなしに変更を適用してよいことは、当業者に明らかなことであろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連しているある特定の作用物質を本明細書に記載の作用物質の代わりに使用しても、同じまたは類似の結果が達成されることが明らかであろう。当業者に明らかなそのような類似の代用物および修飾は全て、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の精神、範囲、および概念内にあるものと見なされる。

【 0 1 9 4 】

VI. 参考文献

以下の参考文献は、本明細書において記載されたものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供するという限りにおいて、参照によって本明細書に具体的に組み入れられる。

Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987a.

Angel *et al.*, *Cell*, 49:729, 1987b.

Aartsma-Rus *et al.*, *Hum. Mutat.* 30, 293–299, 2009.

Baichwal and Sugden, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed), NY, Plenum Press, 117-148, 1986.

Banerji *et al.*, *Cell*, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.

Banerji *et al.*, *Cell*, 33(3):729-740, 1983.

Barnes *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272(17):11510-7, 1997.

Baskin *et al.*, *EMBO Mol Med* 6, 1610–1621, 2014.

Benvenisty and Neshif, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:9551-9555, 1986.

Berkhout *et al.*, *Cell*, 59:273-282, 1989.

Bhavsar *et al.*, *Genomics*, 35(1):11-23, 1996.

Bikard *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 41(15): 7429-7437, 2013.

Blanar *et al.*, *EMBO J.*, 8:1139, 1989.

Bodine and Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.

Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521, 1985.

Bostick *et al.*, *Mol Ther* 19, 1826–1832, 2011.

Bosze *et al.*, *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.

Braddock *et al.*, *Cell*, 58:269, 1989.

Bulla and Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.

Burridge *et al.*, *Nat. Methods* 11, 855–860, 2014.

Bushby *et al.*, *Lancet Neurol.*, 9(1): 77-93 (2010).

Bushby *et al.*, *Lancet Neurol.*, 9(2): 177-198 (2010).

Campbell & Kahl, *Nature* 338, 259–262, 1989.

Campbell and Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.

Campere and Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.

Campo *et al.*, *Nature*, 303:77, 1983.

Celander and Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.

Celander *et al.*, *J. Virology*, 62:1314, 1988.

Chandler *et al.*, *Cell*, 33:489, 1983.

10

20

30

40

- Chang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
- Chang *et al.*, *Stem Cells.*, 27:1042-1049, 2009.
- Chatterjee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9114, 1989.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.
- Cho *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 31(3): 230-232, 2013.
- Choi *et al.*, *Cell*, 53:519, 1988.
- Cirak *et al.*, *The Lancet* 378, 595–605, 2011.
- Coffin, In: *Virology*, Fields *et al.* (Eds.), Raven Press, NY, 1437-1500, 1990. 10
- Cohen *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.
- Costa *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:81, 1988.
- Couch *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.
- Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.
- Cripe *et al.*, *EMBO J.*, 6:3745, 1987.
- Culotta and Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376, 1989.
- Dandolo *et al.*, *J. Virology*, 47:55-64, 1983. 20
- De Villiers *et al.*, *Nature*, 312(5991):242-246, 1984.
- Deschamps *et al.*, *Science*, 230:1174-1177, 1985.
- DeWitt *et al.*, *Sci Transl Med* 8, 360ra134–360ra134, 2016.
- Donnelly *et al.*, *J. Gen. Virol.* 82, 1027-1041, 2001.
- Dubensky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984.
- Edbrooke *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989.
- Edlund *et al.*, *Science*, 230:912-916, 1985.
- EP 0273085 30
- Fechheimer *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Feng and Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.
- Ferkol *et al.*, *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993.
- Firak and Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.
- Foecking and Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986.
- Fonfara *et al.*, *Nature* 532, 517–521, 2016.
- Fraley *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979 40
- Franz *et al.*, *Cardoscience*, 5(4):235-43, 1994.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Fujita *et al.*, *Cell*, 49:357, 1987.

- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu *et al.* (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.
- Gilles *et al.*, *Cell*, 33:717, 1983.
- Gloss *et al.*, *EMBO J.*, 6:3735, 1987.
- Godbout *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.
- Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
- Goncalves *et al.*, *Mol Ther*, 19(7): 1331-1341 (2011). 10
- Goodbourn and Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.
- Goodbourn *et al.*, *Cell*, 45:601, 1986.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Gopal-Srivastava *et al.*, *J. Mol. Cell. Biol.*, 15(12):7081-90, 1995.
- Graham and Prevec, In: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, Murray (Ed.), Humana Press, Clifton, NJ, 7:109-128, 1991.
- Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973. 20
- Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.
- Greene *et al.*, *Immunology Today*, 10:272, 1989
- Grosschedl and Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.
- Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Haslinger and Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985.
- Hauber and Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988.
- Hen *et al.*, *Nature*, 321:249, 1986. 30
- Hensel *et al.*, *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
- Hermonat and Muzycska, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- Herr and Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
- Hersdorffer *et al.*, *DNA Cell Biol.*, 9:713-723, 1990.
- Herz and Gerard, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:2812-2816, 1993.
- Hirochika *et al.*, *J. Virol.*, 61:2599, 1987.
- Holbrook *et al.*, *Virology*, 157:211, 1987. 40
- Hollinger & Chamberlain, *Current Opinion in Neurology* 28, 522–527, 2015.
- Horlick and Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Horwich *et al.*, *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- Hsu *et al.*, *Natl Biotechnol.* 31:827-832, 2013

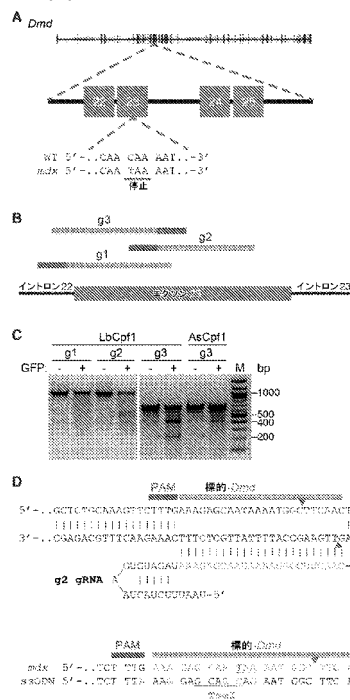
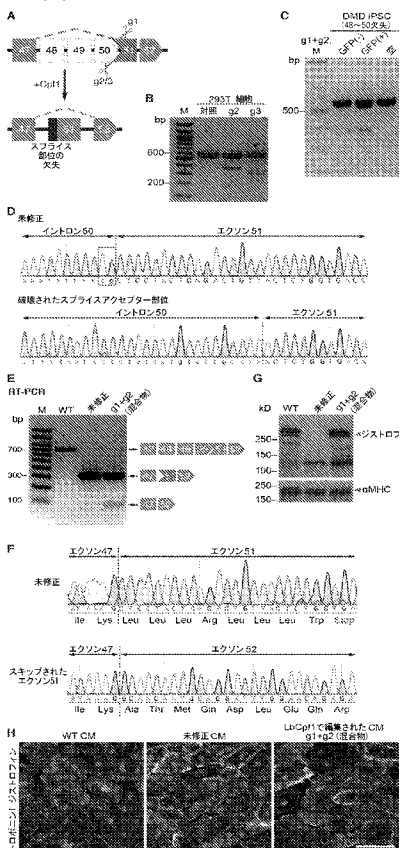
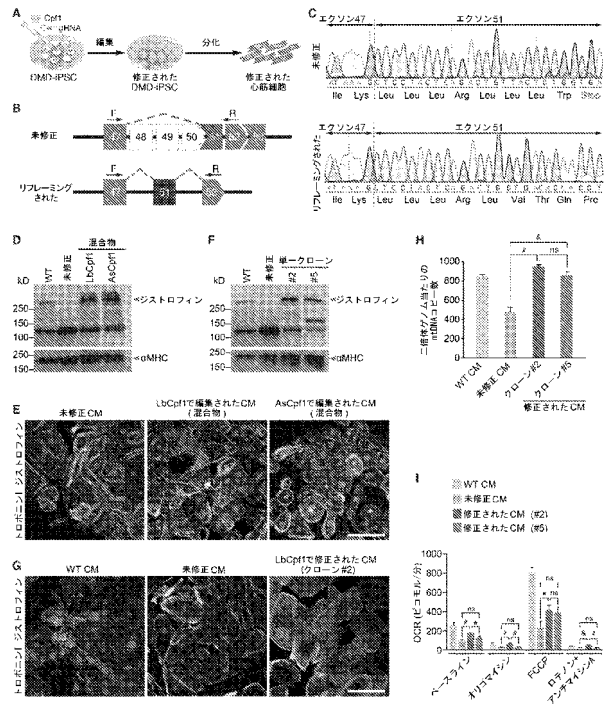
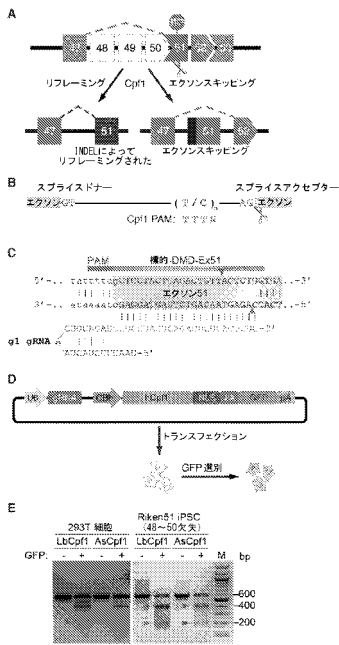
- Huang *et al.*, *Cell*, 27:245, 1981.
- Hug *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065, 1988.
- Hwang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Imagawa *et al.*, *Cell*, 51:251, 1987.
- Imbra and Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
- Imler *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
- Imperiale and Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- Jakobovits *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988. 10
- Jameel and Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- Jaynes *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
- Jinek *et al.*, *Science* 337, 816-821, 2012.
- Johnson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393, 1989.
- Jones and Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978.
- Kadesch and Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989. 20
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986.
- Katinka *et al.*, *Cell*, 20:393, 1980.
- Kato *et al.*, *J Biol Chem.*, 266(6):3361-3364, 1991.
- Kawamoto *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988.
- Kelly *et al.*, *J. Cell Biol.*, 129(2):383-96, 1995.
- Kiledjian *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.
- Kim *et al.*, *Nature Biotechnology*, 1-2, 2016. 30
- Kim *et al.*, *Nature Biotechnology* 34, 876-881, 2016.
- Kimura *et al.*, *Dev. Growth Differ.*, 39(3):257-65, 1997.
- Klamut *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.
- Klein *et al.*, *Nature*, 327:70-73, 1987.
- Koch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
- Kriegler and Botchan, *In: Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982. 40
- Kriegler and Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983.
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 38:483, 1984.
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 53:45, 1988.
- Kuhl *et al.*, *Cell*, 50:1057, 1987.

- Kunz *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
- LaPointe *et al.*, *Hypertension*, 27(3):715-22, 1996
- LaPointe *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263(19):9075-8, 1988.
- Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:8283, 1986.
- Laspia *et al.*, *Cell*, 59:283, 1989.
- Latimer *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.
- Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.
- Lee *et al.*, *Nature*, 294:228, 1981. 10
- Levinson *et al.*, *Nature*, 295:79, 1982.
- Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.
- Lin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
- Long *et al.*, *Science* 345:1184-1188, 2014.
- Long *et al.*, Genome Editing of Monogenic Neuromuscular Diseases: A Systematic Review.
JAMA Neurol, doi:10.1001/jamaneurol.2016.3388, 2016.
- Long *et al.*, *Science* 351, 400–403, 2016. 20
- Luria *et al.*, *EMBO J.*, 6:3307, 1987.
- Lusky and Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986.
- Lusky *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983.
- Majors and Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983.
- Mali *et al.*, *Science* 339, 823-826, 2013a.
- Mali *et al.*, *Nat Methods* 10, 957-963, 2013b.
- Mali *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 31:833-838, 2013c.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983. 30
- Maresca *et al.*, *Genome Research* 23, 539–546, 2013.
- Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.
- Martari, M., *et al. Hum Gene Ther*, 20(7):759-766 (2009).
- McNeall *et al.*, *Gene*, 76:81, 1989.
- Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986.
- Millay *et al.*, *Nat. Med.* 14, 442–447, 2008.
- Mojica *et al.*, *J. Mol. Evol.* 60, 174–182, 2005. 40
- Mordacq and Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- Moreau *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.
- Moss *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 108(6):473-84, 1996.
- Mourkioti *et al.*, *Nature Cell Biology* 15, 895–904, 2013.

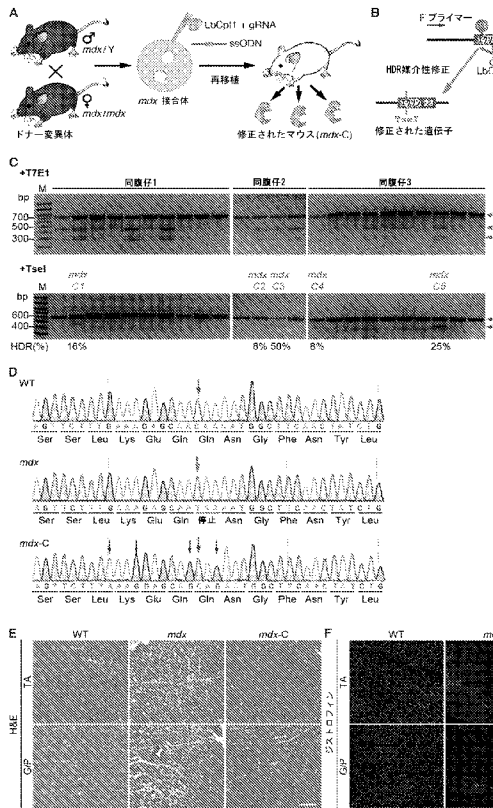
- Muesing *et al.*, *Cell*, 48:691, 1987.
- Nelson *et al.*, *Science* 351, 403–407, 2016.
- Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (Eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513, 1988.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Ondek *et al.*, *EMBO J.*, 6:1017, 1987.
- Ornitz *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987. 10
- Padgett, R.A., *Trends Genet.* 28, 147–154, 2012.
- Palmiter *et al.*, *Cell*, 29:701, 1982a.
- Palmiter *et al.*, *Nature*, 300:611, 1982b.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Pech *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.
- Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9):4086-4090, 1994.
- Perez-Stable and Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990. 20
- Picard and Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.
- Pinkert *et al.*, *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.
- Ponta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985.
- Porton *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.
- Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Queen and Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.
- Quinn *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.
- Racher *et al.*, *Biotech. Techniques*, 9:169-174, 1995. 30
- Ragot *et al.*, *Nature*, 361:647-650, 1993.
- Ran *et al.*, *Nature* 520, 186–191, 2015.
- Redondo *et al.*, *Science*, 247:1225, 1990.
- Reisman and Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.
- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
- Resendez Jr. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.
- Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993. 40
- Ridgeway, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988.
- Ripe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.

- Rittling *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:1619, 1989.
- Rosen *et al.*, *Cell*, 41:813, 1988.
- Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991.
- Roux *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Sakai *et al.*, *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.
- Satake *et al.*, *J. Virology*, 62:970, 1988.
- Schaffner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988. 10
- Searle *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.
- Sharp and Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
- Sherman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Shimizu-Motohashi *et al.*, *Am J Transl Res* 8, 2471–2489, 2016.
- Sleigh and Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Spalholz *et al.*, *Cell*, 42:183, 1985. 20
- Spandau and Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos and Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Stephens and Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
- Stratford-Perricaudet and Perricaudet, In: *Human Gene Transfer*, Cohen-Haguenauer and Boiron (Eds.), John Libbey Eurotext, France, 51-61, 1991.
- Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.
- Stuart *et al.*, *Nature*, 317:828, 1985.
- Sullivan and Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987. 30
- Swartzendruber and Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- Tabebordbar *et al.*, *Science* 351, 407–411, 2016.
- Takebe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- Tavernier *et al.*, *Nature*, 301:634, 1983.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.
- Taylor *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989. 40
- Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- Thiesen *et al.*, *J. Virology*, 62:614, 1988.
- Top *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971.
- Tóth *et al.*, *Biology Direct*, 1–14, 2016.

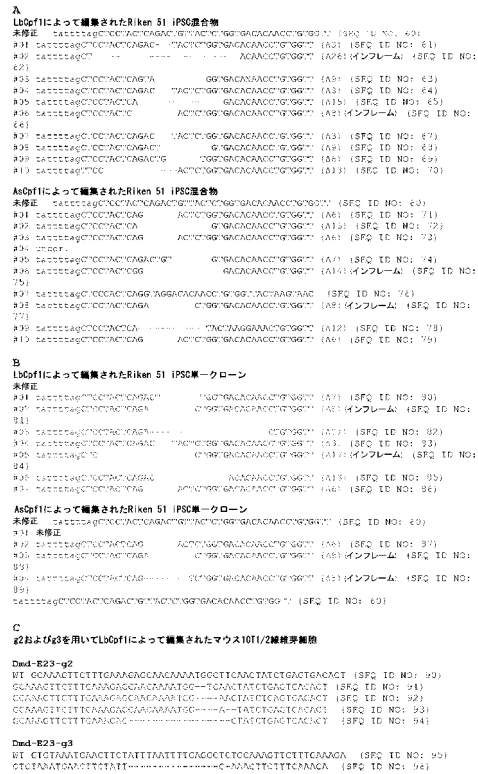
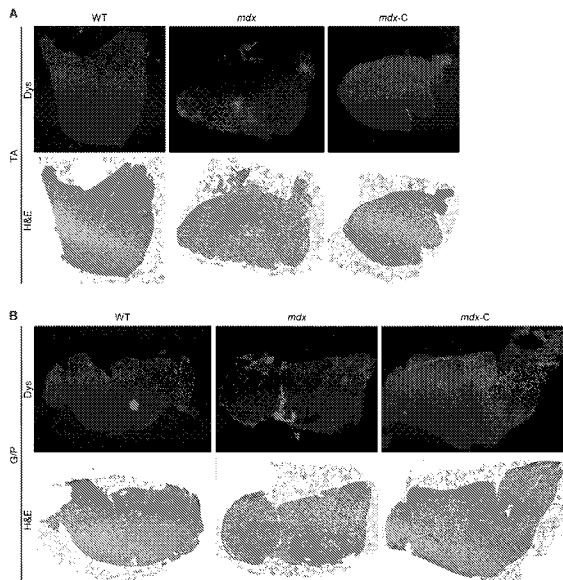
- Tronche *et al.*, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
- Trudel and Constantini, *Genes and Dev.* 6:954, 1987.
- Tsai *et al.*, *Nature Biotechnology* 34, 882–887, 2016.
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- Tyndell *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
- Vannice and Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.
- Varmus *et al.*, *Cell*, 25:23-36, 1981.
- Vasseur *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77:1068, 1980. 10
- Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(9):3410-3414, 1990.
- Wang *et al.*, *Cell*, 153:910-910, 2013.
- Weber *et al.*, *Cell*, 36:983, 1984.
- Weinberger *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 8:988, 1984.
- Winoto and Baltimore, *Cell*, 59:649, 1989.
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993. 20
- Wu and Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988.
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Wu *et al.*, *Cell Stem Cell* 13, 659-662, 2013.
- Wu *et al.*, *Nat Biotechnol* 32, 670-676, 2014.
- Xu *et al.*, *Mol Ther* 24, 564–569, 2016.
- Yamauchi-Takahara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(10):3504-3508, 1989.
- Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572, 1990.
- Yin *et al.*, *Nat Biotechnol* 32, 551-553, 2014. 30
- Yin *et al.*, *Physiol Rev* 93, 23-67, 2013.
- Young *et al.*, *Cell Stem Cell* 18, 533–540, 2016.
- Yutzey *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 9:1397, 1989.
- Zechner *et al.*, *Cell Metabolism* 12, 633–642, 2010.
- Zelenin *et al.*, *FEBS Lett.*, 280:94-96, 1991.
- Zetsche *et al.*, *Cell* 163, 759–771, 2015.
- Ziober and Kramer, *J. Bio. Chem.*, 271(37):22915-22922, 1996. 40



【 図 6 】



【 図 7 】



【配列表】

2019536782000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年10月24日(2019.10.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2019536782000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/063468

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/10 A61K48/00 C07K14/47 C12N15/113
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/197748 A2 (UNIV DUKE [US]) 11 December 2014 (2014-12-11) paragraph [0299] - paragraph [0317]; examples 4-15; sequence 150 -----	1-102
Y	WO 2016/025469 A1 (UNIV TEXAS [US]) 18 February 2016 (2016-02-18) examples 2,3; sequence 35 page 29 - page 30; figures 17-21 ----- -/--	1-102

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 March 2018

Date of mailing of the international search report

16/03/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rutz, Berthold

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/063468

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	C. LONG ET AL: "Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy", SCIENCE, vol. 351, no. 6271, 22 January 2016 (2016-01-22), pages 400-403, XP055454443, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aad5725 figures 1-3 -----	1-102
Y	US 2016/208243 A1 (ZHANG FENG [US] ET AL) 21 July 2016 (2016-07-21) page 167, paragraph 1479 - paragraph 1484; table B -----	1-102
Y	BERND ZETSCHE ET AL: "Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", CELL, vol. 163, no. 3, 1 October 2015 (2015-10-01), pages 759-771, XP055267511, AMSTERDAM, NL ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038 the whole document -----	1-102
A	WO 2015/138739 A2 (PREC BIOSCIENCES INC [US]) 17 September 2015 (2015-09-17) the whole document -----	1-102
A	DAVID G. OUSTEROUT ET AL: "Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 6, 18 February 2015 (2015-02-18), page 6244, XP055196515, DOI: 10.1038/ncomms7244 -----	1-102
A	LI XU ET AL: "CRISPR-mediated Genome Editing Restores Dystrophin Expression and Function in mdx Mice", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, vol. 24, no. 3, 1 March 2016 (2016-03-01), pages 564-569, XP055419710, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2015.192 ----- -/--	1-102

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/063468

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	C. LONG ET AL: "Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA", SCIENCE, vol. 345, no. 6201, 14 August 2014 (2014-08-14), pages 1184-1188, XP055159130, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1254445 -----	1-102
X,P	YU ZHANG ET AL: "CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice", SCIENCE, vol. 3, no. 4, 12 April 2017 (2017-04-12), page e1602814, XP055454449, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/sciadv.1602814 the whole document -----	1-102
X,P	WO 2017/072590 A1 (CRISPR THERAPEUTICS AG [CH]) 4 May 2017 (2017-05-04) the whole document -----	1-102

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/063468

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014197748 A2	11-12-2014	AU 2014274840 A1 CA 2914519 A1 CN 105658805 A EP 3004370 A2 JP 2016521555 A KR 20160023765 A US 2016201089 A1 WO 2014197748 A2	21-01-2016 11-12-2014 08-06-2016 13-04-2016 25-07-2016 03-03-2016 14-07-2016 11-12-2014
WO 2016025469 A1	18-02-2016	CA 2959130 A1 CN 106714845 A EP 3180034 A1 JP 2017525696 A US 2016058889 A1 WO 2016025469 A1	18-02-2016 24-05-2017 21-06-2017 07-09-2017 03-03-2016 18-02-2016
US 2016208243 A1	21-07-2016	AU 2016278990 A1 CA 2989834 A1 DK 3009511 T3 EP 3009511 A2 ES 2646140 T3 HK 1220726 A1 TW 201716572 A US 2016208243 A1 WO 2016205711 A1	18-01-2018 22-12-2016 11-09-2017 20-04-2016 12-12-2017 12-05-2017 16-05-2017 21-07-2016 22-12-2016
WO 2015138739 A2	17-09-2015	AU 2015229299 A1 CA 2942268 A1 EP 3116533 A2 JP 2017512767 A US 2017106055 A1 WO 2015138739 A2	22-09-2016 17-09-2015 18-01-2017 25-05-2017 20-04-2017 17-09-2015
WO 2017072590 A1	04-05-2017	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/34 (2015.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/34	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 35/545	
A 6 1 K 31/7115 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7115	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15 Z N A	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	
C 1 2 N 15/52 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/52 Z	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	
	C 1 2 N 15/09 1 0 0	

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

(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チャン ユ
アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイーンズ ブールバード 5 3 2 3

ケア オブ ユーティー サウスウエスタン メディカル ユニバーシティー

(72)発明者 ロン チェンツ

アメリカ合衆国 1 0 0 1 6 ニューヨーク州 ニューヨーク ファースト アベニュー 5 2 2
スミロウ 7 0 1 シー ケア オブ ニューヨーク ユニバーシティー スクール オブ メデ
ィスン

(72)発明者 バセル - デュビー ロンダ

アメリカ合衆国 7 5 2 4 8 テキサス州 ダラス シェイディバンク ドライブ 1 6 1 0 6

(72)発明者 オルソン エリック

アメリカ合衆国 7 5 2 2 5 テキサス州 ユニバーシティパーク サウスウエスタン ブールバ
ード 3 2 1 9

F ターム(参考) 4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA24 CA27 CA44

4C084 AA13 MA02 MA66 NA05 NA14 ZA211 ZA212 ZA221 ZA222 ZA941

ZA942 ZC411 ZC412 ZC751 ZC752

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA66 NA05 NA14 ZA21

ZA22 ZA94 ZC41 ZC75

4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA12 MA02 MA66 NA05 NA14 ZA21

ZA22 ZA94 ZC41 ZC75