

(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2019-524149

(P2019-524149A)

(43) 公表日 令和1年9月5日(2019.9.5)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/09	1 1 O 4 C 08 4
C 12 N 15/11 (2006.01)	C 12 N 15/11	Z N A Z 4 C 08 7
C 12 N 15/12 (2006.01)	C 12 N 15/12	4 H 04 5
A 61 P 27/02 (2006.01)	A 61 P 27/02	
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 1 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-510339 (P2019-510339)	(71) 出願人	515179406 アベリノ ラボ ユーエスエー インコ ポレイテッド A v e l l i n o L a b U S A, I n c. アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94 025, メンロー パーク, アダムズ ド ライブ 1505, スイート B-2
(86) (22) 出願日	平成29年8月21日 (2017.8.21)	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成31年4月19日 (2019.4.19)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2017/047861		
(87) 國際公開番号	W02018/039145		
(87) 國際公開日	平成30年3月1日 (2018.3.1)		
(31) 優先権主張番号	62/377,586		
(32) 優先日	平成28年8月20日 (2016.8.20)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/462,808		
(32) 優先日	平成29年2月23日 (2017.2.23)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

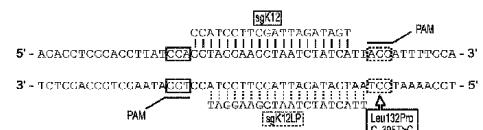
(54) 【発明の名称】一本鎖ガイドRNA、CRISPR/Cas9システム、及びそれらの使用方法

(57) 【要約】

本開示は、一本鎖ガイドRNA(sgRNA)、クラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドローミリピート(CRISPR)/CRISPR関連タンパク質9(Cas9)システム、及び角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療するためのそれらの使用方法に関する。

【選択図】図1

MUTANT KRT12 ALLELE



WILD TYPE KRT12 ALLELE



Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

角膜ジストロフィーの予防、改善、又は治療のための C R I S P R / C a s 9 システムのためにデザインされた一本鎖ガイド R N A (s g R N A)。

【請求項 2】

(i) 配列番号 (1 0 + 4 n) 又は配列番号 (1 1 + 4 n) (n は、 0 から 2 2 1 までの整数である) からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する C R I S P R 標的化 R N A (c r R N A) 配列と、 (i i) トランス活性化型 c r R N A (t r a c r R N A) 配列とを含み、前記 c r R N A 配列及び前記 t r a c r R N A 配列は、天然には一緒に存在しないものである、請求項 1 に記載の s g R N A 。

10

【請求項 3】

前記 t r a c r R N A は、配列番号 2 又は配列番号 6 のヌクレオチド配列と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 2 に記載の s g R N A 。

【請求項 4】

C R I S P R / C a s 9 システムのためにデザインされた s g R N A 対であって、 (i) (a) 病因性突然変異又は S N P の 3 ' 末端側にシスにある第 1 のプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) を生成する突然変異又は一塩基多型 (S N P) のための第 1 の c r R N A 配列と、 (b) t r a c r R N A 配列とを含み、該第 1 の c r R N A 配列及び該 t r a c r R N A 配列は、天然には一緒に存在しないものである、第 1 の s g R N A と、

20

(i i) (a) 病因性突然変異又は S N P の 5 ' 末端側にシスにある第 2 の P A M を生成する突然変異又は S N P のための第 2 の c r R N A ガイド配列と、 (b) t r a c r R N A 配列とを含み、該第 2 の c r R N A 配列及び該 t r a c r R N A 配列は、天然には一緒に存在しないものである、第 2 の s g R N A と、

を含む、 s g R N A 対。

【請求項 5】

前記 C R I S P R / C a s 9 システムは、角膜ジストロフィーの予防、改善、又は治療のためのシステムである、請求項 4 に記載の s g R N A 対。

【請求項 6】

前記 P A M を生成する突然変異又は前記 S N P は、 T G F B I 遺伝子中に存在する、請求項 4 又は 5 に記載の s g R N A 対。

30

【請求項 7】

前記 P A M を生成する突然変異又は前記 S N P は、 T G F B I 遺伝子のインtron中に存在する、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の s g R N A 対。

【請求項 8】

前記第 1 の c r R N A 配列及び前記第 2 の c r R N A 配列の少なくとも 1 つは、図 1 9 ~ 図 3 5 に列挙される配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み、及び / 又は前記第 1 の c r R N A 配列及び前記第 2 の c r R N A 配列の少なくとも 1 つは、表 2 に列挙される配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 4 ~ 7 のいずれか一項に記載の s g R N A 対。

40

【請求項 9】

(i) C a s 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子と請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の s g R N A とを含む少なくとも 1 つのベクター、又は (i i) C a s 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子と請求項 4 ~ 8 のいずれか一項に記載の s g R N A 対とを含む少なくとも 1 つのベクターを含み、前記ベクター中の前記 C a s 9 ヌクレアーゼ及び前記 s g R N A 対は、天然には一緒に存在しないものである、操作されたクラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドロームリピート (C R I S P R) / C R I S P R 関連タンパク質 9 (C a s 9) システム。

【請求項 10】

前記 C a s 9 ヌクレアーゼは、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、又はそれら

50

の変異体由来のヌクレアーゼである、請求項 9 に記載の操作された C R I S P R / C a s 9 システム。

【請求項 1 1】

前記 C a s 9 ヌクレアーゼは、配列番号 4 又は配列番号 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 9 又は 10 に記載の操作された C R I S P R / C a s 9 システム。

【請求項 1 2】

前記 C a s 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子は、配列番号 3 又は配列番号 7 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 85% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の操作された C R I S P R / C a s 9 システム。
10

【請求項 1 3】

修復ヌクレオチド分子を更に含む、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項に記載の操作された C R I S P R / C a s 9 システム。

【請求項 1 4】

1つ以上の核局在化シグナル (N L S) を更に含む、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の操作された C R I S P R / C a s 9 システム。

【請求項 1 5】

前記 s g R N A 及び前記 C a s 9 ヌクレアーゼは、同じベクター上に含まれている、請求項 9 ~ 14 のいずれか一項に記載の操作された C R I S P R / C a s 9 システム。
20

【請求項 1 6】

遺伝子産物の発現を変化させる方法であって、請求項 9 ~ 15 のいずれか一項に記載の操作された C R I S P R / C a s 9 システムを、標的配列を有すると共に前記遺伝子産物をコードする D N A 分子を含み発現する細胞中に導入することを含む、方法。

【請求項 1 7】

前記操作された C R I S P R / C a s 9 システムは、
(a) 前記標的配列とハイブリダイズする s g R N A に作動的に連結された第 1 の調節エレメントと、
(b) C a s 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子に作動的に連結された第 2 の調節エレメントと、
を含み、前記 s g R N A は、前記標的配列を標的とし、かつ前記 C a s 9 ヌクレアーゼは、前記 D N A 分子を開裂する、請求項 16 に記載の方法。
30

【請求項 1 8】

前記細胞は、真核細胞である、請求項 16 又は 17 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記細胞は、哺乳動物細胞又はヒト細胞である、請求項 16 又は 17 に記載の方法。

【請求項 2 0】

被験体における突然変異又は一塩基多型 (S N P) と関連する疾患を予防、改善、又は治療する方法であって、前記被験体の遺伝子産物の発現を請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法により変化させることを含み、前記 D N A 分子は、突然変異配列を含む、方法。
40

【請求項 2 1】

被験体における遺伝子突然変異又は一塩基多型 (S N P) と関連する角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療する方法であって、

前記被験体に、

(i) C a s 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子と、
(ii) プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) の 5' 末端に隣接する標的配列に相補性のヌクレオチド配列にハイブリダイズする C R I S P R 標的化 R N A (c r R N A) 配列と、
を含む少なくとも 1 つのベクターを含む操作された C R I S P R / C a s 9 システムを投
50

与することを含み、前記標的配列又は前記P A Mは、角膜ジストロフィーを引き起こす突然変異又はS N Pを含み、前記C a s 9ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子及び前記c r R N A配列は、天然には一緒に存在しないものである、方法。

【請求項22】

前記P A Mは、前記突然変異又は前記S N Pを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記c r R N A配列は、前記標的配列を含み、かつ前記c r R N A配列は、17ヌクレオチド長～24ヌクレオチド長である、請求項21又は22に記載の方法。

【請求項24】

前記c r R N A配列は、配列番号(10+4n)(nは、0から221までの整数である)からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる、請求項21～23のいずれか一項に記載の方法。
10

【請求項25】

前記P A M及び前記C a s 9ヌクレアーゼは、ストレプトコッカス又はスタフィロコッカス由来のヌクレアーゼである、請求項21～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記P A Mは、N G G又はN N G R R T(Nは、A、T、G、及びCのいずれかであり、かつRは、A又はGである)からなる、請求項21～25のいずれか一項に記載の方法。
。

【請求項27】

前記投与は、前記被験体の角膜中への前記操作されたC R I S P R / C a s 9システムの導入を含む、請求項21～26のいずれか一項に記載の方法。
20

【請求項28】

前記投与は、前記被験体の角膜中への前記操作されたC R I S P R / C a s 9システムの注射を含む、請求項21～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

前記投与は、前記標的配列を有するD N A分子を含み発現する細胞中への前記操作されたC R I S P R / C a s 9システムの導入を含む、請求項21～28のいずれか一項に記載の方法。
。

【請求項30】

前記角膜ジストロフィーは、上皮基底膜ジストロフィー(E B M D)、メースマン角膜ジストロフィー(M E C D)、ティール-ベーンケ角膜ジストロフィー(T B C D)、格子状角膜ジストロフィー(L C D)、顆粒状角膜ジストロフィー(G C D)、及びシュナイダー角膜ジストロフィー(S C D)からなる群から選択される、請求項21～29のいずれか一項に記載の方法。
30

【請求項31】

前記S N Pは、T G F B I、K R T 3、K R T 1 2、G S N、及びU B I A D 1からなる群から選択される遺伝子中に位置している、請求項21～30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

前記遺伝子突然変異又は前記S N Pを含む突然変異配列は、
40

(i) Leu 5 0 9 Arg、Arg 6 6 6 Ser、Gly 6 2 3 Asp、Arg 5 5 5 Gln、Arg 1 2 4 Cys、Val 5 0 5 Asp、Ile 5 2 2 Asn、Leu 5 6 9 Arg、His 5 7 2 Arg、Arg 4 9 6 Trp、Pro 5 0 1 Thr、Arg 5 1 4 Pro、Phe 5 1 5 Leu、Leu 5 1 8 Pro、Leu 5 1 8 Arg、Leu 5 2 7 Arg、Thr 5 3 8 Pro、Thr 5 3 8 Arg、Val 5 3 9 Asp、Phe 5 4 0 del、Phe 5 4 0 Ser、Asn 5 4 4 Ser、Ala 5 4 6 Thr、Ala 5 4 6 Asp、Phe 5 4 7 Ser、Pro 5 5 1 Gln、Leu 5 5 8 Pro、His 5 7 2 del、Gly 5 9 4 Val、Val 6 1 3 del、Val 6 1 3 Gly、Met 6 1 9 Lys、Ala 6 2 0 Asp、Asn 6 2 2 His、Asn 6 2 2 Lys、Asn 6 2 2 L

y s、G l y 6 2 3 A r g、G l y 6 2 3 A s p、V a l 6 2 4 _ V a l 6 2 5 d e l、V a l 6 2 4 M e t、V a l 6 2 5 A s p、H i s 6 2 6 A r g、H i s 6 2 6 P r o、V a l 6 2 7 S e r f s X 4 4、T h r 6 2 9 _ A s n 6 3 0 i n s A s n V a l P r o、V a l 6 3 1 A s p、A r g 6 6 6 S e r、A r g 5 5 5 T r p、A r g 1 2 4 S e r、A s p 1 2 3 d e l i n s、A r g 1 2 4 H i s、A r g 1 2 4 L e u、L e u 5 0 9 P r o、L e u 1 0 3 _ S e r 1 0 4 d e l、V a l 1 1 3 I l e、A s p 1 2 3 H i s、A r g 1 2 4 L e u、及び／又はT h r 1 2 5 _ G l u 1 2 6 d e lを含む突然変異T G F B Iタンパク質、

(i i) G l u 4 9 8 V a l、A r g 5 0 3 P r o、及び／又はG l u 5 0 9 L y s を有する突然変異K R T 3タンパク質、

(i i i) M e t 1 2 9 T h r、M e t 1 2 9 V a l、G l n 1 3 0 P r o、L e u 1 3 2 P r o、L e u 1 3 2 V a l、L e u 1 3 2 H i s、A s n 1 3 3 L y s、A r g 1 3 5 G l y、A r g 1 3 5 I l e、A r g 1 3 5 T h r、A r g 1 3 5 S e r、A l a 1 3 7 P r o、L e u 1 4 0 A r g、V a l 1 4 3 L e u、V a l 1 4 3 L e u、L l e 3 9 1 _ L e u 3 9 9 d u p、I l e 4 2 6 V a l、I l e 4 2 6 S e r、T y r 4 2 9 A s p、T y r 4 2 9 C y s、A r g 4 3 0 P r o、及び／又はL e u 4 3 3 A r g を有する突然変異K R T 1 2タンパク質、

(i v) A s p 2 1 4 T y r を有する突然変異G S N タンパク質、並びに、

(v) A l a 9 7 T h r、G l y 9 8 S e r、A s n 1 0 2 S e r、A s p 1 1 2 A s n、A s p 1 1 2 G l y、A s p 1 1 8 G l y、A r g 1 1 9 G l y、L e u 1 2 1 V a l、L e u 1 2 1 P h e、V a l 1 2 2 G l u、V a l 1 2 2 G l y、S e r 1 7 1 P r o、T y r 1 7 4 C y s、T h r 1 7 5 I l e、G l y 1 7 7 A r g、L y s 1 8 1 A r g、G l y 1 8 6 A r g、L e u 1 8 8 H i s、A s n 2 3 2 S e r、A s n 2 3 3 H i s、A s p 2 3 6 G l u、及び／又はA s p 2 4 0 A s n を有する突然変異U B I A D 1タンパク質、

からなる群から選択される突然変異タンパク質をコードする、請求項2 1～3 1のいずれか一項に記載の方法。

【請求項3 3】

(i) 前記遺伝子突然変異若しくは前記S N P を含む突然変異配列は、A r g 1 2 4 C y s を含む突然変異T G F B Iタンパク質をコードし、かつ前記c r R N A 配列は、配列番号5 8、配列番号5 4、配列番号5 0、若しくは配列番号4 2を含み、

(i i) 前記遺伝子突然変異若しくは前記S N P を含む突然変異配列は、A r g 1 2 4 H i s を含む突然変異T G F B Iタンパク質をコードし、かつ前記c r R N A 配列は、配列番号9 4、配列番号9 0、配列番号8 6、配列番号8 2、配列番号7 8、配列番号7 4、若しくは配列番号7 0を含み、

(i i i) 前記遺伝子突然変異若しくは前記S N P を含む突然変異配列は、A r g 1 2 4 L e u を含む突然変異T G F B Iタンパク質をコードし、かつ前記c r R N A 配列は、配列番号1 1 4、配列番号1 1 0、配列番号1 0 6、若しくは配列番号9 8を含み、

(i v) 前記遺伝子突然変異若しくは前記S N P を含む突然変異配列は、A r g 5 5 5 G l n を含む突然変異T G F B Iタンパク質をコードし、かつ前記c r R N A 配列は、配列番号1 7 8、配列番号1 7 4、配列番号1 7 0、配列番号1 6 6、配列番号1 6 2、若しくは配列番号1 5 8を含み、

(v) 前記遺伝子突然変異若しくは前記S N P を含む突然変異配列は、A r g 5 5 5 T r p を含む突然変異T G F B Iタンパク質をコードし、かつ前記c r R N A 配列は、配列番号1 4 6、配列番号1 4 2、配列番号1 3 8、配列番号1 3 4、配列番号1 3 0、若しくは配列番号1 2 6を含み、及び／又は、

(v i) 前記遺伝子突然変異若しくは前記S N P を含む突然変異配列は、L e u 5 2 7 A r g を含む突然変異T G F B Iタンパク質をコードし、かつ前記c r R N A 配列は、配列番号4 7 4、配列番号4 7 8、配列番号4 8 2、若しくは配列番号4 8 6を含む、

請求項2 1～3 2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記遺伝子突然変異又は前記 S N P を含む突然変異配列は、A r g 1 2 4 H i s を含む突然変異 T G F B I タンパク質をコードし、かつ前記 c r R N A は、配列番号 8 6 又は配列番号 9 4 を含む、請求項 2 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記角膜ジストロフィーは、前記 S N P と関連しており、かつ前記標的配列又は前記 P A M は、角膜ジストロフィーを引き起こす S N P 部位を含む、請求項 2 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記標的配列又は前記 P A M は、複数の S N P 部位を含む、請求項 2 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 3 7】

前記被験体は、ヒトである、請求項 2 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

被験体における遺伝子突然変異又は一塩基多型 (S N P) と関連する角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療する方法であって、

前記被験体に、

(i) C a s 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子と、

(i i) 病因性突然変異又は S N P の 3 ' 末端側にシスにある第 1 のプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) の 5 ' 末端に隣接する第 1 の標的配列に相補性のヌクレオチド配列にハイブリダイズする第 1 の C R I S P R 標的化 R N A (c r R N A) 配列であって、前記第 1 の標的配列又は前記第 1 の P A M が、第 1 の祖先型突然変異部位又は S N P 部位を含む、第 1 の c r R N A 配列と、 20

(i i i) 病因性突然変異又は S N P の 5 ' 末端側にシスにある第 2 の P A M の 5 ' 末端に隣接する第 2 の標的配列に相補性のヌクレオチド配列にハイブリダイズする第 2 の c r R N A 配列であって、前記第 2 の標的配列又は前記第 2 の P A M が、第 2 の祖先型突然変異部位又は S N P 部位を含む、第 2 の c r R N A 配列と、

を含む少なくとも 1 つのベクターを含む操作された C R I S P R / C a s 9 システムを投与することを含み、前記少なくとも 1 つのベクターは、天然に一緒に存在する c r R N A 配列及び C a s 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子を有しない、方法。 30

【請求項 3 9】

前記 P A M を生成する突然変異又は前記 S N P は、 T G F B I 遺伝子中に存在する、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記 P A M を生成する突然変異又は前記 S N P は、 T G F B I 遺伝子のインtron中に存在する、請求項 3 8 又は 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記第 1 の c r R N A 配列及び前記第 2 の c r R N A 配列の少なくとも 1 つは、図 1 9 ~ 図 3 5 に列挙される配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み、及び / 又は前記第 1 の c r R N A 配列及び前記第 2 の c r R N A 配列の少なくとも 1 つは、表 2 に列挙される配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 3 8 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 4 2】

前記第 1 の P A M は、前記第 1 の突然変異部位若しくは前記 S N P 部位を含み、及び / 又は前記第 2 の P A M は、前記第 2 の突然変異部位若しくは前記 S N P 部位を含む、請求項 3 8 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記第 1 の c r R N A 配列は、前記第 1 の標的配列を含み、

前記第 2 の c r R N A 配列は、前記第 2 の標的配列を含み、

前記第 1 の c r R N A 配列は、1 7 ヌクレオチド長 ~ 2 4 ヌクレオチド長であり、及び 50

/ 又は、

前記第2のc r R N A配列は、17ヌクレオチド長～24ヌクレオチド長である、請求項38～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

前記第1のP A M及び/又は前記第2のP A M並びに前記C a s 9ヌクレアーゼは、ストレプトコッカス又はスタフィロコッカス由来である、請求項38～43のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

前記第1のP A M及び前記第2のP A Mの両方は、ストレプトコッカス又はスタフィロコッカス由来である、請求項38～44のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項46】

前記P A Mは、N G G又はN N G R R T (Nは、A、T、G、及びCのいずれかであり、かつRは、A又はGである)からなる、請求項38～45のいずれか一項に記載の方法。

【請求項47】

前記投与は、前記被験体の角膜中への前記操作されたC R I S P R / C a s 9システムの導入を含む、請求項38～46のいずれか一項に記載の方法。

【請求項48】

前記投与は、前記被験体の角膜中への前記操作されたC R I S P R / C a s 9システムの注射を含む、請求項38～47のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項49】

前記投与は、前記標的配列を有するD N A分子を含み発現する細胞中への前記操作されたC R I S P R / C a s 9システムの導入を含む、請求項38～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

前記角膜ジストロフィーは、上皮基底膜ジストロフィー(E B M D)、メースマン角膜ジストロフィー(M E C D)、ティール-ペーンケ角膜ジストロフィー(T B C D)、格子状角膜ジストロフィー(L C D)、顆粒状角膜ジストロフィー(G C D)、及びシュナイダー角膜ジストロフィー(S C D)からなる群から選択される、請求項38～49のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項51】

前記病因性突然変異又は前記S N Pを含む突然変異配列は、Leu509Arg、Arg666Ser、Gly623Asp、Arg555Gln、Arg124Cys、Val505Asp、Ile522Asn、Leu569Arg、His572Arg、Arg496Trp、Pro501Thr、Arg514Pro、Phe515Leu、Leu518Pro、Leu518Arg、Leu527Arg、Thr538Pro、Thr538Arg、Val539Asp、Phe540del、Phe540Ser、Asn544Ser、Ala546Thr、Ala546Asp、Phe547Ser、Pro551Gln、Leu558Pro、His572del、Gly594Val、Val1613del、Val1613Gly、Met619Lys、Ala620Asp、Asn622His、Asn622Lys、Asn622Lys、Gly623Arg、Gly623Asp、Val624_Val625del、Val624Met、Val625Asp、His626Arg、His626Pro、Val627SerfsX44、Thr629_Asn630insAsnValPro、Val631Asp、Arg666Ser、Arg555Trp、Arg124Ser、Asp123delins、Arg124His、Arg124Leu、Leu509Pro、Leu103_Ser104del、Val1113Ile、Asp123His、Arg124Leu、及び/又はThr125_Glu126delを含む突然変異T G F B Iタンパク質からなる群から選択される突然変異タンパク質をコードする、請求項38～50のいずれか一項に記載の方法。

40

50

【請求項 5 2】

前記角膜ジストロフィーは、前記S N Pと関連しており、

前記第1の標的配列若しくは前記第1のP A Mは、前記第1の祖先型S N P部位を含み、及び／又は、

前記第2の標的配列若しくは前記第2のP A Mは、前記第2の祖先型S N P部位を含む、

請求項3 8～5 1のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記病因性突然変異又は前記S N Pを含む突然変異配列は、A r g 1 2 4 H i sを含む突然変異T G F B Iタンパク質をコードする、請求項3 8～5 2のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5 4】

前記標的配列又は前記P A Mは、複数の突然変異部位又はS N P部位を含む、請求項3 8～5 3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記被験体は、ヒトである、請求項3 8～5 4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

角膜ジストロフィーの治療を必要とする被験体における角膜ジストロフィーを治療する方法であって、

20

(a) 前記被験体から角膜ジストロフィー標的核酸中に核酸突然変異を含む複数の幹細胞を取得することと、

(b) 前記複数の幹細胞の1つ以上の幹細胞中の核酸突然変異を操作することで前記核酸突然変異を修正し、それにより1つ以上の操作された幹細胞を形成させることと、

(c) 前記1つ以上の操作された幹細胞を単離することと、

(d) 前記1つ以上の操作された幹細胞を前記被験体中に移植することと、

を含み、

前記複数の幹細胞の1つ以上の幹細胞における核酸突然変異を操作することは、請求項1 6～5 5に記載の方法のいずれかを実施することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】**【0 0 0 1】**

本開示は、一本鎖ガイドR N A (s g R N A)、クラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドロームリピート (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ; C R I S P R) / C R I S P R 関連タンパク質9 (C a s 9)システム、及び角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療するためのそれらの使用方法に関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

大部分の角膜ジストロフィーは、ドミナントネガティブな病理機序により常染色体優性に遺伝する。幾つかの遺伝子、例えばT G F B I及びK R T 1 2に関しては、それらの遺伝子がハプロ不全でないことが分かっている。つまり、正常な機能を維持するために上記遺伝子の1つの機能的コピーで十分である。突然変異アレルを特異的に標的とするs i R N Aを使用することにより、突然変異タンパク質のドミナントネガティブ効果に打ち勝ち、i n v i t r oで細胞に正常な機能を回復させることが可能である。s i R N Aの効果は一過性であり、s i R N Aが細胞中に十分に高い濃度で存在する間に限ってのみ継続するにすぎないが、C R I S P R / C a s 9遺伝子編集は、突然変異アレルを永続的に変更する機会を与える。

40

【0 0 0 3】

二本鎖D N Aを触媒的に開裂するための単純な内因性細菌システムの発見は、治療的遺伝子編集の分野に革命を起こした。I I型のクラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドロームリピート (C R I S P R) / C R I S P R 関連タンパク質9 (C a s 9

50

)は、プログラム可能なRNAガイド型エンドヌクレアーゼであり、それは最近では、哺乳動物細胞における遺伝子編集で効果的であることが分かっている(非特許文献1)。この特異性が高くかつ効果的なRNAガイド型DNAエンドヌクレアーゼは、広範囲の遺伝性疾患において治療的に重要である場合がある。CRISPR/Cas9システムは、単独の触媒性タンパク質、つまり2つのRNA分子(tracrRNA及びcrRNA)により特異的なDNA配列にガイドされるCas9に基づくものである(非特許文献1)。tracrRNA/crRNAを組み合わせて一本鎖ガイドRNA分子(sgRNA)にすることで(非特許文献2、非特許文献3)、ゲノム内の任意の標的に潜在的に特異的な遺伝子編集ツールの迅速な開発がもたらされた。sgRNA内のヌクレオチド配列を選択された標的に相補性の配列に置き換えることにより、特異性が高いシステムをほんの数日で作製することができる。このシステムの1つの注意事項は、該エンドヌクレアーゼがsgRNA結合部位の3'末端のすぐそばに位置するプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を必要とすることである。このPAM配列は、DNA標的の不变の部分であるが、sgRNA中には存在せず、その一方で、それがゲノム標的配列の3'末端に存在しないと、Cas9が該DNA標的を開裂することができなくなる(非特許文献4)。

【0004】

1つの態様において、本開示は、アレル特異的CRISPR/Cas9システムの、角膜ジストロフィーのための、例えばメースマン角膜ジストロフィー(MECD; OMIM: 122100)を引き起こすKRT12(ケラチン12をコードする、K12)中のドミナントネガティブ突然変異Leu132Pro(c.395T>C)に対する潜在能力を記載している(非特許文献5)。興味深いことに、本明細書に示されるように、この突然変異は、野生型アレルには存在しないストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)の新規PAMの出現をもたらす。幾つかの実施の形態において、本開示は、この新規PAMの5'末端にあるヌクレオチドをsgRNA中に導入することにより、突然変異アレルのアレル特異的開裂が誘導され得ることを示している。ヘテロ接合細胞において、この二本鎖破断は、フレームシフト及び未成熟終止コドンの出現をもたらし得る非相同末端結合(NHEJ)か、又は野生型アレルとの再結合により突然変異配列の修復が導かれる相同配列指向性修復のいずれかをもたらし得る。例えばKRT12の場合には、両結果とも治療的成功とみなすことができる。ドミナントネガティブ突然変異K12タンパク質の発現は、NHEJにより破壊されるが、それはKRT12がハプロ不全性を示さないことが分かっているため許容され(非特許文献6)、又は上記突然変異アレルは、相同配列指向性修復により修復されることで、K12-Leu132Proアレルの修復がもたらされる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; 157: 1262-1278

【非特許文献2】Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 2014; 343: 84-87

【非特許文献3】Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 2014; 343: 80-84

【非特許文献4】Westra ER, Semenova E, Datsenko KA, Jackson RN, Wiedenheft B, Severinov K et al. Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003742

【非特許文献5】Liao H, Irvine AD, Macewen CJ, Weed KH, Porter L, Corden LD et al. Development of allele-specific therapeutic siRNA in Meesmann epithelial corneal dystrophy. *PLoS One* 2011; 6: e28582

10

20

30

40

50

【非特許文献 6】Kao WW, Liu CY, Converse RL, Shiraishi A, Kao CW, Ishizaki M et al. Keratin 12-deficient mice have fragile corneal epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2572-2584

【発明の概要】

【0006】

1つの態様において、本開示は、一本鎖ガイドRNA(sgRNA)に関する。幾つかの実施の形態において、上記sgRNAは、(i) CRISPR標的化RNA(crrNA)配列と、(ii)トランスクレオチド配列とを含む。幾つかの実施の形態において、上記crrNA配列及び上記tracrRNA配列は、天然には一緒に存在しないものである。幾つかの実施の形態において、上記crrNA配列は、配列番号(10+4n)(nは、0から221までの整数である)からなる群から選択されるトランスクレオチド配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%、又は100%の配列同一性を有するトランスクレオチド配列を有する。更なる実施の形態において、上記tracrRNA配列は、配列番号2又は配列番号6の配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%、又は100%の配列同一性を有するトランスクレオチド配列を含む。

10

【0007】

別の態様において、本開示は、CRISPR/Cas9システムのためにデザインされたsgRNA対であって、(i)(a)病理性突然変異又はSNPの3'末端側にシスにある第1のプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を生成する突然変異又は一塩基多型(SNP)のための第1のcrrNA配列と、(b)tracrRNA配列とを含み、該第1のcrrNA配列及び該tracrRNA配列は、天然には一緒に存在しないものである、第1のsgRNAと、(ii)(a)病理性突然変異又はSNPの5'末端側にシスにある第2のPAMを生成する突然変異又はSNPのための第2のcrrNAガイド配列と、(b)tracrRNA配列とを含み、該第2のcrrNA配列及び該tracrRNA配列は、天然には一緒に存在しないものである、第2のsgRNAとを含む、sgRNA対に関する。幾つかの実施の形態において、上記CRISPR/Cas9システムは、角膜ジストロフィーの予防、改善、又は治療のためのシステムである。幾つかの実施の形態において、上記PAMを生成する突然変異又は上記SNPは、TGFBI遺伝子中に位置する。更なる実施の形態において、上記PAMを生成する突然変異又は上記SNPは、TGFBI遺伝子のイントロン中に存在する。例えば、図16に示されるように、上記PAMを生成する突然変異又は上記SNPは、TGFBI遺伝子の隣り合ったイントロン中にあり、上記病理性突然変異又は上記SNPは、隣り合ったイントロンの間のエキソン中にあり得る。なおも更なる実施の形態においては、上記第1のcrrNA配列及び上記第2のcrrNA配列の少なくとも1つは、図19～図35に列挙される配列からなる群から選択されるトランスクレオチド配列を含み、及び/又は上記第1のcrrNA配列及び上記第2のcrrNA配列の少なくとも1つは、表2に列挙される配列からなる群から選択されるトランスクレオチド配列を含む。

20

【0008】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載されるCas9トランスクレオチド分子とsgRNAとを含む少なくとも1つ若しくは2つのベクター、又は本明細書に記載されるCas9トランスクレオチド分子とsgRNA対とを含む少なくとも1つ、2つ、若しくは3つの異なるベクターを含む、操作されたクラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドロームリピート(CRISPR)/CRISPR関連タンパク質9(Cas9)システムに関する。幾つかの実施の形態において、上記Cas9トランスクレオチド分子及び上記sgRNAは、天然には一緒に存在しないものである。幾つかの実施の形態において、本明細書に記載されるCas9トランスクレオチド分子は、Slaymaker et al., 2016 *Science*, 351(6268), 84-88に記載される強化型Cas9トランスクレオチド分子であり得る。更なる実施の形態において、上記Cas9トランスクレオチド分子は、ストレプトコッカスに由来する。なおも更なる実施の形態において、上記Cas9トランスクレオチド分子は、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)(*Spy*)、ストレプト

30

40

50

コッカス・ディスガラクティエ (*Streptococcus dysgalactiae*)、ストレプトコッカス・カニス (*Streptococcus canis*)、ストレプトコッカス・エクイ (*Streptococcus equi*)、ストレプトコッカス・イニアエ (*Streptococcus iniae*)、ストレプトコッカス・フォカエ (*Streptococcus phocae*)、ストレプトコッカス・シュードポルシヌス (*Streptococcus pseudoporcinus*)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*)、ストレプトコッカス・シュードポルシヌス (*Streptococcus pseudoporcinus*)、ストレプトコッカス・インファンタリウス (*Streptococcus infantarius*)、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*)、ストレプトコッカス・アガラクティアエ (*Streptococcus agalactiae*)、ストレプトコッカス・カバリ (*Streptococcus caballi*)、ストレプトコッカス・エクイヌス (*Streptococcus equinus*)、ストレプトコッカス属種 oral taxon (*Streptococcus sp. oral taxon*)、ストレプトコッカス・ミティス (*Streptococcus mitis*)、ストレプトコッカス・ガロリティクス (*Streptococcus gallolyticus*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordoni*)、ストレプトコッカス・パストーリアヌス (*Streptococcus pasteurianus*)、又はそれらの変異体に由来する。更なる実施の形態において、上記 Cas 9 ヌクレアーゼは、スタフィロコッカスに由来する。なおも更なる実施の形態において、上記 Cas 9 ヌクレアーゼは、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、S. シミアエ (*S. simiae*)、S. アウリクラリス (*S. auricularis*)、S. カルノサス (*S. carnosus*)、S. コンディメンティ (*S. condimenti*)、S. マッシリエンシス (*S. massiliensis*)、S. ピスシフェルメンタンス (*S. piscifermentans*)、S. シムランス (*S. simulans*)、S. カピティス (*S. capitis*)、S. カプラエ (*S. caprae*)、S. エピデルミディス (*S. epidermidis*)、S. サッカロリティクス (*S. saccharolyticus*)、S. デブリエセイ (*S. devriesei*)、S. ヘモリティクス (*S. haemolyticus*)、S. ホミニス (*S. hominis*)、S. アグネティス (*S. agnetis*)、S. クロモゲネス (*S. chromogenes*)、S. フエリス (*S. felis*)、S. デルフィニ (*S. delphini*)、S. ハイカス (*S. hyicus*)、S. インテルメディウス (*S. intermedius*)、S. ルトラエ (*S. lutrae*)、S. ミクロティ (*S. microti*)、S. ムスカエ (*S. muscae*)、S. シュードインターメディウス (*S. pseudintermedius*)、S. ロストリ (*S. rostri*)、S. シュライフェリ (*S. schleiferi*)、S. ルグドゥネンシス (*S. lugdunensis*)、S. アーレッタエ (*S. arlettiae*)、S. コーニイ (*S. cohnii*)、S. エクオルム (*S. equorum*)、S. ガリナルム (*S. gallinarum*)、S. クローシイ (*S. kloosii*)、S. レエイ (*S. leei*)、S. ネパレンシス (*S. nepalensis*)、S. サプロフィティクス (*S. saprophyticus*)、S. スクシヌス (*S. succinus*)、S. キシロサス (*S. xylosus*)、S. フレウレティイ (*S. fleurettii*)、S. レンツス (*S. lentus*)、S. シウリ (*S. sciuri*)、S. ステパノヴィチイ (*S. stepanovicii*)、S. ヴィツリヌス (*S. vitulinus*)、S. シムランス (*S. simulans*)、S. パストーリ (*S. pastueri*)、S. ワルネリ (*S. warneri*)、又はそれらの変異体に由来する。更なる実施の形態において、上記 Cas 9 ヌクレアーゼは、配列番号 4 又は配列番号 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 60% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。なおも更なる実施の形態において、Cas 9 ヌクレアーゼをコードする上記ヌクレオチド分子は、配列番号 3 又は配列番号 7 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約 60% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施の形態において、本明細書に記載される C R I S P R / Cas 9 システム又はベクターは、修復ヌクレオチド分子及び / 又は少なくとも 1 つの核局在化シグナル (N L S) を除く、又は更に含む。更なる実施の形態において、上記 s g R N A 及び上記 Cas 9 ヌクレアーゼは、同じベクター上、又は異なるベクター上に含まれる。

【 0 0 0 9 】

別の態様において、本開示は、少なくとも 1 つの遺伝子産物の発現を変化させる方法であって、本明細書に記載される操作された C R I S P R / Cas 9 システムを、標的配列を有すると共に上記遺伝子産物をコードする D N A 分子を含み発現する細胞中に導入することを含む、方法に関する。幾つかの実施の形態において、上記操作された C R I S P R

10

20

30

40

50

/ Cas 9 システムは、(a) 上記標的配列とハイブリダイズする sg RNA に作動的に連結された第 1 の調節エレメントと、(b) Cas 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子に作動的に連結された第 2 の調節エレメントとを含み、その際、構成要素 (a) 及び構成要素 (b) は、該システムの同じベクター又は異なるベクター上に位置しており、該 sg RNA は、上記標的配列を標的とし、かつ上記 Cas 9 ヌクレアーゼは、上記 DNA 分子を開裂する。上記標的配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) の 5' 末端に隣接するヌクレオチド配列に相補性のヌクレオチド配列であり得る。更なる実施の形態において、上記細胞は、真核細胞、又は哺乳動物細胞若しくはヒト細胞である。幾つかの実施の形態において、上記 sg RNA は、Cas 9 ヌクレアーゼにより認識される PAM の 5' 末端に隣接するヌクレオチド配列を含む。更なる実施の形態において、上記 sg RNA は、16 ヌクレオチド配列から 25 ヌクレオチド配列までの長さを有し、又は 16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、若しくは 25 個のヌクレオチドを有する。

10

【0010】

別の態様において、本開示は、被験体における一塩基多型 (SNP) と関連する疾患を予防、改善、又は治療する方法であって、本明細書に記載される上記被験体の遺伝子産物の発現を変化させることを含み、上記 DNA 分子が、突然変異配列を含む、方法に関する。幾つかの実施の形態において、上記 DNA 分子は、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、又はそれより多くの SNP 部位又は突然変異部位を含み得て、かつ本明細書に記載される方法は、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、又はそれより多くの上記 SNP 部位又は上記突然変異部位に関連する遺伝子産物の発現を変化させる。

20

【0011】

別の態様において、本開示は、被験体における遺伝子突然変異又は SNP と関連する角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療する方法であって、上記被験体に (i) 本明細書に記載される Cas 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子と、(ii) 本明細書に記載される sg RNA を含む少なくとも 1 つ、又は 2 つのベクターを含む操作された CRISPR / Cas 9 システムを投与することを含み、上記 sg RNA が、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 部位の 5' 末端に隣接する標的配列に相補性のヌクレオチド配列にハイブリダイズするか、又は該標的配列を含み、かつ上記標的配列又は上記 PAM は、突然変異部位又は SNP 部位を含む、方法に関する。幾つかの実施の形態において、上記 sg RNA は、上記標的配列と少なくとも約 75%、80%、85%、90%、95%、又は 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態において、上記 Cas 9 ヌクレアーゼ及び上記 sg RNA は、天然には一緒に存在しないものである。更なる実施の形態において、上記 PAM は、上記突然変異部位又は上記 SNP 部位を含む。

30

【0012】

幾つかの実施の形態において、上記病因性遺伝子突然変異又は上記 SNP を含む突然変異配列は、(i) Leu 509 Arg、Arg 666 Ser、Gly 623 Asp、Arg 555 Gln、Arg 124 Cys、Val 505 Asp、Ile 522 Asn、Leu 569 Arg、His 572 Arg、Arg 496 Trp、Pro 501 Thr、Arg 514 Pro、Phe 515 Leu、Leu 518 Pro、Leu 518 Arg、Leu 527 Arg、Thr 538 Pro、Thr 538 Arg、Val 539 Asp、Phe 540 del、Phe 540 Ser、Asn 544 Ser、Ala 546 Thr、Ala 546 Asp、Phe 547 Ser、Pro 551 Gln、Leu 558 Pro、His 572 del、Gly 594 Val、Val 613 del、Val 613 Gly、Met 619 Lys、Ala 620 Asp、Asn 622 His、Asn 622 Lys、Asn 622 Lys、Gly 623 Arg、Gly 623 Asp、Val 624 Val 625 del、Val 624 Met、Val 625 Asp、His 626 Arg、His 626 Pro、Val 627 Ser fs X 44、Thr 629 Asn 630 ins Asn Val 1 Pro、Val 631 Asp、Arg 666 Ser、Arg 555 Trp、Arg 1

40

50

24Ser、Asp123delins、Arg124His、Arg124Leu、Leu509Pro、Leu103_Ser104del、Val113Ile、Asp123His、Arg124Leu、及び/又はThr125_Glu126delを含む突然変異TGFBIタンパク質、(i i)Glu498Val、Arg503Pro、及び/又はGlu509Lysを有する突然変異KRT3タンパク質、(i i i)Met129Thr、Met129Val、Gln130Pro、Leu132Pro、Leu132Val、Leu132His、Asn133Lys、Arg135Gly、Arg135Ile、Arg135Thr、Arg135Ser、Ala137Pro、Leu140Arg、Val1143Leu、Val1143Leu、Leu391_Leu399dup、Ile426Val、Ile426Ser、Tyr429Asp、Tyr429Cys、Arg430Pro、及び/又はLeu433Argを有する突然変異KRT12タンパク質、(i v)Asp214Tyrを有する突然変異GSNタンパク質、並びに(v)Ala97Thr、Gly98Ser、Asn102Ser、Asp112Asn、Asp112Gly、Asp118Gly、Arg119Gly、Leu121Val、Leu121Phe、Val122Glu、Val122Gly、Ser171Pro、Tyr174Cys、Thr175Ile、Gly177Arg、Lys181Arg、Gly186Arg、Leu188His、Asn232Ser、Asn233His、Asp236Glu、及び/又はAsp240Asnを有する突然変異UBIAD1タンパク質からなる群から選択される突然変異タンパク質をコードする。なおも更なる実施の形態において、請求項14~25のいずれか一項に記載の方法であって、上記被験体が、ヒト、動物、又は哺乳動物である、方法。

【0013】

幾つかの実施の形態において、上記SNP部位を含む突然変異配列は、Arg514Proを含む突然変異TGFBIタンパク質をコードし、かつ上記操作されたCRISPR/Cas9システムは、GAACCTAAATTACCATGCTAAA(配列番号897)を含むsgRNAを含む。幾つかの実施の形態において、上記SNP部位を含む突然変異配列は、Leu518Argを含む突然変異TGFBIタンパク質をコードし、かつ上記操作されたCRISPR/Cas9システムは、GAGACAAATCGCTTAGCATG(配列番号898)を含むsgRNAを含む。幾つかの実施の形態において、上記SNP部位を含む突然変異配列は、Leu509Argを含む突然変異TGFBIタンパク質をコードし、かつ上記操作されたCRISPR/Cas9システムは、配列番号186を含むsgRNAを含む。幾つかの実施の形態において、上記SNP部位を含む突然変異配列は、Leu527Argを含む突然変異TGFBIタンパク質をコードし、かつ上記操作されたCRISPR/Cas9システムは、配列番号474を含むsgRNAを含む。幾つかの実施の形態において、上記SNP部位を含む突然変異配列は、Arg124Cysを含む突然変異TGFBIタンパク質をコードし、かつ上記操作されたCRISPR/Cas9システムは、配列番号58、配列番号54、配列番号50、及び配列番号42のいずれかのヌクレオチド配列を含むsgRNAを含む。幾つかの実施の形態において、上記SNP部位を含む突然変異配列は、Arg124Hisを含む突然変異TGFBIタンパク質をコードし、かつ上記操作されたCRISPR/Cas9システムは、配列番号94、配列番号90、配列番号86、配列番号82、配列番号78、配列番号74、及び配列番号70のいずれかのヌクレオチド配列を含むsgRNAを含む。幾つかの実施の形態において、上記SNP部位を含む突然変異配列は、Arg124Hisを含む突然変異TGFBIタンパク質をコードし、かつ上記操作されたCRISPR/Cas9システムは、配列番号86又は配列番号94を含むsgRNAを含む。幾つかの実施の形態において、上記SNP部位を含む突然変異配列は、Arg124Leuを含む突然変異TGFBIタンパク質をコードし、かつ上記操作されたCRISPR/Cas9システムは、配列番号114、配列番号110、配列番号106、及び配列番号98のいずれかのヌクレオチド配列を含むsgRNAを含む。幾つかの実施の形態において、上記SNP部位を含む突然変異配列は、Arg555Glnを含む突然変異TGFBIタンパク質をコードし、

かつ上記操作された C R I S P R / C a s 9 システムは、配列番号 1 7 8 、配列番号 1 7 4 、配列番号 1 7 0 、配列番号 1 6 6 、配列番号 1 6 2 、及び配列番号 1 5 8 のいずれかのヌクレオチド配列を含む s g R N A を含む。幾つかの実施の形態において、上記 S N P 部位を含む突然変異配列は、 A r g 5 5 5 T r p を含む突然変異 T G F B I タンパク質をコードし、かつ上記操作された C R I S P R / C a s 9 システムは、配列番号 1 4 6 、配列番号 1 4 2 、配列番号 1 3 8 、配列番号 1 3 4 、配列番号 1 3 0 、及び配列番号 1 2 6 のいずれかのヌクレオチド配列を含む s g R N A を含む。幾つかの実施の形態において、上記 S N P 部位を含む突然変異配列は、 L e u 5 2 7 A r g を含む突然変異 T G F B I タンパク質をコードし、かつ上記操作された C R I S P R / C a s 9 システムは、配列番号 1 4 6 、配列番号 1 4 2 、配列番号 1 3 8 、配列番号 1 3 4 、配列番号 1 3 0 、及び配列番号 1 2 6 のいずれかのヌクレオチド配列を含む s g R N A を含む。

【 0 0 1 4 】

別の態様において、本開示は、被験体における遺伝子突然変異又は S N P と関連する角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療する方法であって、上記被験体に(i) 本明細書に記載される C a s 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子と、(i i) 本明細書に記載される s g R N A とを含む少なくとも 1 つ、又は 2 つのベクターを含む操作された C R I S P R / C a s 9 システムを投与することを含み、上記 s g R N A が、プロトスペーサー隣接モチーフ(P A M) 部位の 5' 末端に隣接する第 2 の標的配列に相補性の第 1 の標的配列にハイブリダイズし、かつ上記第 1 の標的配列又は上記 P A M は、上記突然変異部位又は上記 S N P 部位を含む、方法に関する。別の態様において、本開示は、被験体における遺伝子突然変異又は一塩基多型(S N P) と関連する角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療する方法であって、上記被験体に(i) C a s 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子と、(i i) 病因性突然変異又は S N P の 3' 末端側にシスにある第 1 のプロトスペーサー隣接モチーフ(P A M) の 5' 末端に隣接する第 1 の標的配列に相補性のヌクレオチド配列にハイブリダイズする第 1 の C R I S P R 標的化 R N A (c r R N A) 配列であって、上記第 1 の標的配列又は上記第 1 の P A M が、第 1 の祖先型突然変異部位又は S N P 部位を含む、第 1 の c r R N A 配列と、(i i i) 病因性突然変異又は S N P の 5' 末端側にシスにある第 2 の P A M の 5' 末端に隣接する第 2 の標的配列に相補性のヌクレオチド配列にハイブリダイズする第 2 の c r R N A 配列であって、上記第 2 の標的配列又は上記第 2 の P A M が、第 2 の祖先型突然変異部位又は S N P 部位を含む、第 2 の c r R N A 配列とを含む少なくとも 1 つのベクターを含む操作された C R I S P R / C a s 9 システムを投与することを含み、上記少なくとも 1 つのベクターは、天然に一緒に存在する c r R N A 配列及び C a s 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子を有しない、方法に関する。幾つかの実施の形態において、 P A M を生成する突然変異又は S N P は、 T G F B I 遺伝子中に、例えば、 T G F B I 遺伝子のイントロン中に存在する。別の実施の形態において、上記第 1 の c r R N A 配列及び上記第 2 の c r R N A 配列の少なくとも 1 つは、図 1 9 ~ 図 3 5 に列挙される配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み、及び / 又は上記第 1 の c r R N A 配列及び上記第 2 の c r R N A 配列の少なくとも 1 つは、表 2 に列挙される配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。なおも更なる実施の形態において、上記第 1 の P A M は、上記第 1 の突然変異部位若しくは上記 S N P 部位を含み、及び / 又は上記第 2 の P A M は、上記第 2 の突然変異部位若しくは上記 S N P 部位を含む。更なる実施の形態において、上記第 1 の c r R N A 配列は、上記第 1 の標的配列を含み、及び / 又は上記第 2 の c r R N A 配列は、上記第 2 の標的配列を含む。なおも更なる実施の形態において、上記 c r R N A は、 1 7 ヌクレオチド長 ~ 2 4 ヌクレオチド長である。幾つかの実施の形態において、上記第 1 の P A M 及び / 又は上記第 2 の P A M の両方は、ストレプトコッカス又はスタフィロコッカス由来である。更なる実施の形態において、上記病因性突然変異又は上記 S N P を含む突然変異配列は、 L e u 5 0 9 A r g 、 A r g 6 6 6 S e r 、 G l y 6 2 3 A s p 、 A r g 5 5 5 G l n 、 A r g 1 2 4 C y s 、 V a l 5 0 5 A s p 、 I l e 5 2 2 A s n 、 L e u 5 6 9 A r g 、 H i s 5 7 2 A r g 、 A r g 4 9 6 T r p 、 P r o 5 0 1 T h r 、 A r g 5 1 4

10

20

30

40

50

Pro、Phe515Leu、Leu518Pro、Leu518Arg、Leu527Arg、Thr538Pro、Thr538Arg、Val539Asp、Phe540del、Phe540Ser、Asn544Ser、Ala546Thr、Ala546Asp、Phe547Ser、Pro551Gln、Leu558Pro、His572del、Gly594Val、Val613del、Val613Gly、Met619Lys、Ala620Asp、Asn622His、Asn622Lys、Asn622Lys、Gly623Arg、Gly623Asp、Val624_Val625del、Val624Met、Val625Asp、His626Arg、His626Pro、Val627SerfsX44、Thr629_Asn630insAsnValPro、Val631Asp、Arg666Ser、Arg555Trp、Arg124Ser、Asp123delins、Arg124His、Arg124Leu、Leu509Pro、Leu103_Ser104del、Val1113Ile、Asp123His、Arg124Leu、及び/又はThr125_Glu126delを含む突然変異TGFBIタンパク質からなる群から選択される突然変異タンパク質をコードする。
10

【0015】

なおも更なる実施の形態において、上記PAMは、NGG及びNNGRRT (Nは、A、T、G、及びCのいずれかであり、かつRは、A又はGである)からなる群から選択されるPAMからなる。更なる実施の形態において、上記投与は、上記操作されたCRISP/Cas9システムを上記被験体の角膜(例えば、角膜実質)中に注射することにより、及び/又は上記操作されたCRISPR/Cas9システムを、上記標的配列を有するDNA分子を含み発現する細胞中に導入することにより、上記操作されたCRISPR/Cas9システムを上記被験体の角膜(例えば、角膜実質)中に導入することを含む。
20

【0016】

幾つかの実施の形態において、上記角膜ジストロフィーは、上皮基底膜ジストロフィー(EBMD)、メースマン角膜ジストロフィー(MECD)、ティール・ベーンケ角膜ジストロフィー(TBCD)、格子状角膜ジストロフィー(LCD)、顆粒状角膜ジストロフィー(GCD)、及びシュナイダー角膜ジストロフィー(SCD)からなる群から選択される。更なる実施の形態において、上記SNP部位は、TGFBI、KRT3、KRT12、GSN、及びUb1Aプレニルトランスフェラーゼドメイン含有タンパク質1(UB1AD1)からなる群から選択される遺伝子中に位置している。
30

【0017】

幾つかの実施の形態において、本明細書に記載されるCRISPR/Cas9システム及び該システムを使用する方法は、複数のSNP部位又は祖先型SNPでの突然変異配列を変化させ得る。

【0018】

別の態様において、本開示は、角膜ジストロフィーの治療を必要とする被験体における角膜ジストロフィーを治療する方法であって、(a)上記被験体から角膜ジストロフィー標的核酸中に核酸突然変異を含む複数の幹細胞を取得することと、(b)上記複数の幹細胞の1つ以上の幹細胞中の核酸突然変異を操作することで上記核酸突然変異を修正し、それにより1つ以上の操作された幹細胞を形成させることと、(c)上記1つ以上の操作された幹細胞を単離することと、(d)上記1つ以上の操作された幹細胞を上記被験体中に移植することとを含み、上記複数の幹細胞の1つ以上の幹細胞中の核酸突然変異を操作することが、本明細書に記載される遺伝子産物の発現を変化させる方法、又は被験体における突然変異若しくはSNPと関連する疾患を予防、改善、若しくは治療する方法のいずれかを実施することを含む、方法に関する。
40

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】野生型及び突然変異のケラチン12(K12)アレルを標的とするためのsgRNAの例示的デザインを示す図である。K12-L132Pアレルに見られるSNPに誘導されたPAMを使用するsgRNAをデザインした(赤色)。このPAMは、野生型ア
50

レルには存在しない。野生型及び突然変異のK12アレルの両方を標的とする第2のsgRNA（緑色）もデザインし、ポジティブコントロールとして使用した。

【図2】外因性発現構築物を使用したsgK12LPのアレル特異性及び有効性の評価を示す図である。野生型及び突然変異のK12のための外因性発現構築物を使用して、sgK12LPのアレル特異性及び有効性を試験した。（A）デュアルルシフェラーゼアッセイにより、sgK12LPプラスミドのアレル特異性が裏付けられ、その一方で、有効性はsgK12構築物の有効性に匹敵することが示された（N=8）。（B）ウェスタンブロッティングにより、これらはsgK12LPで処理された細胞中のK12-L132Pタンパク質が、処理されたがK12野生型タンパク質を発現する細胞と比較して著しく減少することに起因すると裏付けられた。-アクチンをローディングコントロールとして使用した。（C）野生型アレル及び突然変異アレルの両方を発現する細胞における全K12に関する定量的逆転写酵素PCRにより、mRNA発現のノックダウンが裏付けられた（N=4）。（D）このmRNAノックダウンのアレル割合を、次いでパイロシーケンシングにより定量することで、両方のKRT12アレルを同時発現するとともに、sgK12LPで処理された細胞における突然変異アレルのアレルノックダウンが確認された（N=4、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001）。

【図3】in vivoでのsgK12LPに誘導されるNHEJを示す図である。GFP発現が、実質内注射後24時間の時点でマウスの角膜上皮に観察されることから、角膜上皮のトランスフェクションのための実質内プラスミド注射の効力が裏付けられた（A、N=2）。GFP発現は、注射後48時間の時点で観察されなかった。sgK12LP構築物が注射されたヒトK12-L132Pヘテロ接合マウス由来のgDNAのシーケンシングにより、大きな欠失と、KRT12-L132Pアレルの開裂によるNHEJの誘導とが裏付けられた。シーケンシングされた13個のクローンのうち、5個がNHEJを経たことが判明した（B）。

【図4】TGFBI突然変異R514P（A）、L518R（B）、L509R（C）、L527R（D）のためにデザインされたSNPに誘導されるPAMのガイドRNAを使用した結果を示す図である。ルシフェラーゼ発現を使用して、野生型アレル及び突然変異アレルの発現を評価した。ポジティブコントロール（sgWT）のガイドは、野生型（WT、青色の棒）アレル及び突然変異型（MUT、赤色の棒）アレルの両方を切断するようにデザインされ、上記に示されるように予想通りに両方のアレルを切断した。L518Rのために使用されるガイド（sgMut）は、最大のアレル特異性と共にWTアレルの最小の切断を示す（青色の棒）。ネガティブコントロールのガイド（sgNSC）は、予想通りにWTのDNAもMUTのDNAもどちらも切断しなかった。

【図5】項目A～項目Eは、R124及びR555のTGFBI突然変異のためにデザインされた突然変異アレル特異的なガイドRNAを使用した結果を示す図である。ルシフェラーゼ発現を使用して、野生型アレル及び突然変異アレルの発現を評価した。該アッセイは、16マーから22マーまでの範囲の種々の長さのガイドを用いて実施した。ガイドの長さに加えて、特異性の改善を補助するためのガイドの5'末端への二重のゲアニンの付加も評価した。青色の棒は、WTのTGFBI配列を表し、橙色の棒は、突然変異のTGFBI配列を示す。上記突然変異のガイドは、該ガイドの長さに基づいて様々な効率で切断した（図5、項目A～項目E）。R124（図5、項目A、項目B、及び項目C）に関しては、アッセイにより、アレル特異性の傾向と共に上記突然変異のガイドが突然変異配列を優先的に標的とすることが示される（橙色の棒は青色の棒と比較して更に減少した）。項目Fは、R124H突然変異の20マーのガイドが、非標的化結合を減らすように操作された強化型Cas9ヌクレアーゼを用いて試験された場合の特異性の改善を示している。項目Gは、DNAが開裂されたことを確認するためのCas9によるin vitro開裂からの断片分析を示す。6種の共通のTGFBI突然変異（例えば、R124C、R124H、R124L、R555Q、R555W、及びL527R）のそれぞれについて、野生型配列及び突然変異配列に関して開裂テンプレートを調製した。野生型配列及び突然変異配列を含むガイドRNA分子（20ヌクレオチド及び18ヌクレオチド）をデザ

インし合成した。次いで、開裂テンプレートを、*in vitro*で Cas9-sgRNA 複合体により消化し、断片分析をアガロースゲル上で実施した（図 5、項目 G、（a）～（f））。R124C 開裂反応の断片分析（図 5、項目 G、（a））は、デュアルルシフェラーゼアッセイの結果（図 5、項目 A）に匹敵する結果を示す。R124H 及び R124L の両方についての開裂反応の分析（図 5、項目 G、（b）及び（c））も、デュアルルシフェラーゼアッセイの結果（図 5、項目 B 及び C）と同様の結果を示し、これらの結果は、2 つの大きく異なるアッセイの間で一致している。R555Q 及び R555W の開裂反応の試験（図 5、項目 G、（d）及び（e））も、デュアルルシフェラーゼアッセイ（項目 5、項目 D 及び項目 E）との同等性を示す。L527R についての開裂反応の分析（図 5、項目 G、（f））は、該ガイドの長さに基づいて様々な切断効率を示している。

10

【図 6】（A）は、Luc2 に特異的であり、かつ Luc2 遺伝子の 5' 領域を標的とするようにデザインされた例示的な一本鎖ガイド RNA（sgRNA）標的配列（紫色にハイライトして示される）を示す図である。該ガイドを Luc2 遺伝子の 5' 領域において結合するようにデザインすることで、フレームシフトを起こす欠失を誘導する可能性が高まり、標的 DNA 中に未成熟終止コドンを生成することによりルシフェラーゼ（Luc2）活性がノックアウトされる。（B）は、この Luc2 を標的とするガイドを、ルシフェラーゼを発現する細胞に添加し、ルシフェラーゼ発現に基づいて遺伝子編集を測定した後に得られた結果を示す図である。幾つかの細胞は処理されておらず（unt）、他の細胞は、細胞中の DNA に結合しない非特異的なネガティブコントロールのガイド RNA（sgNSC）で処理され、そしてまた sgLuc2P である Luc2 に対する試験ガイドで処理された。

20

【図 7】*in vivo* でマウスの角膜上皮において、CRISPR Cas9 遺伝子編集が、標的遺伝子を切断し、その発現を低下させることができ、その結果、該遺伝子から発現されるタンパク質がより少なくなることを裏付ける図である。ルシフェラーゼのヒートマップは、タンパク質発現のレベルを表しており、そこでは Luc2 タンパク質に関して、黒色は発現なしを表し、青色は低い発現を表し、そして赤色は高い発現を表す。

【図 8】F. Ran et al., Nat. Protoc. 2013, 8(11) 2281-2308 に記載される CRISPR / Cas9 システムを示す図である。S. ピオゲネス由来の Cas9 ヌクレアーゼ（黄色）は、20 ヌクレオチドのガイド配列（青色）及びスキャフォールド（赤色）からなる sgRNA によりゲノム DNA（例えば、ヒト EMX1 座位が示される）に標的化される。上記ガイド配列は、必須の 5' - NGG 隣接モチーフ（PAM、ピンク色）のすぐ上流で DNA 標的（上側の鎖上の青色の棒）と対をなす。Cas9 は、PAM の約 3 塩基対上流（赤色の三角形）で DS B をもたらす。

30

【図 9】8 種の細菌種からの II 型の CRISPR - Cas 座位及び sgRNA の図式を含む、F. Ran et al., Nature 2015, 520(7546):186-91 に記載される CRISPR / Cas9 システムを示す図である。スペーサー又は「ガイド」配列は青色で示され、その後にダイレクトリピート（灰色）が続く。予測される tracrRNA は赤色で示され、制約生成 RNA フォールディングモデルに基づいて折り畳まれている。

【図 10】F. Ran et al., Nature 2015, 520(7546):186-91 に記載される CRISPR / Cas9 システムを示す更なる図である。この図は、哺乳動物細胞における SaCas9 の sgRNA スキャフォールドの最適化を示している。（A）スタフィロコッカス・アウレウス亜種アウレウスの CRISPR 座位の図。（B）21 ヌクレオチドのガイド、crRNA リピート（灰色）、テトラループ（黒色）及び tracrRNA（赤色）を有する SaCas9 の sgRNA の図。crRNA リピートと tracrRNA アンチリピートとの塩基対形成の番号は、灰色のボックスの上に示されている。SaCas9 は、（C）HEK293FT 細胞系及び（D）Hepa1-6 細胞系において、様々なリピート：アンチリピート長さで有する標的を開裂する（n = 3、エラーバーは、平均値の標準誤差を示す）。

40

【図 11】ストレプトコッカス・ピオゲネスの Cas9 ヌクレアーゼを使用する pSpC

50

as9 (BB) - 2A - Puro (PX459) を含む CRISPR / Cas9 システムのための例示的なベクターを示す図である。

【図12】スタフィロコッカス・アウレウスを使用する CRISPR / Cas9 システムのための例示的なベクター pX601 - AAV - CMV : : NLS - SaCas9 - NLS - 3xHA - bGHPA ; U6 : : Bsal - sgRNA を示す図である。

【図13】ストレプトコッカス・ピオゲネス (Spy) 及びスタフィロコッカス・アウレウス (Sau) からの Cas9 ヌクレアーゼの例示的な sgRNA 配列、ヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列を示す図である。

【図14】Cas9 開裂を導く 1 対の sgRNA と密集しているメースマン角膜ジストロフィー (MECD) 関連 KRT12 突然変異の HDR 媒介型修復のための例示的デザインを示す図である。図14に示される修復オリゴ (ssODN) は、L132P のためのものであるが、該クラスター中のその他の突然変異のために働くこととなる。突然変異及び修復の部位は、アスタリスクで示されている。2つの矢じりは、修復されたアレル中に同義置換を導入するが、PAM 部位を再コード化するため Cas9 による更なる切断は阻止されることとなる修復オリゴ中のヌクレオチド変化を示す。

【図15】新規 PAM を生成する 10 % より大きな MAF を有する TGFBI における全ての SNP を示す図である。番号付けされたボックスは、TGFBI 内のエキソンを示す。多数の病理性突然変異が見られる TGFBI 中のホットスポットは、赤色のボックスにより示される。青色の矢印は、新規 PAM を生成する SNP の位置を示す。新規 PAM はそれぞれの矢印の方向に示されており、その際、必要な変異体は赤色でハイライトされている。

【図16】隣接 SNP による新規 PAM を利用する sgRNA が第 1 のイントロン中にデザインされている例示的な実施形態を示す図である。さらに、野生型アレル及び突然変異アレルの両方に共通の sgRNA は、第 2 のイントロン中にデザインされている。野生型アレルにおいて、一本鎖 sgRNA は、第 2 のイントロン中に NHEJ を引き起こし、それは機能的効果を有しない。しかしながら、突然変異アレルにおいて、隣接 SNP に誘導される PAM を利用する sgRNA 及び共通の sgRNA は、突然変異アレルのノックアウトをもたらす大きな欠失をもたらす。

【図17】CRISPR / Cas9 でヌクレオフェクションされた R124H のアベリノ角膜ジストロフィー突然変異を有する患者から得られた例示的なリンパ球細胞系統を使用することによる実験結果を示す図である。そのガイドは、rs3805700 SNP により生成される新規 PAM を利用した。この PAM は、その患者の R124H 突然変異と同じ染色体上に存在するが、野生型染色体上には存在しない。セルソーティング後に、単クローニングを単離して、インデルが生じたかどうかを調べた。6 個の単クローニングは、未編集の野生型染色体を有することから、このガイドの厳密なアレル特異性が指摘される。上記単離されたクローニングのうち 4 個は突然変異染色体を有し、これらのうちの 3 個が編集を示すことから、突然変異染色体の 75 % の編集効率が指摘される。3 個のクローニングのうち 2 個がフレームシフトを起こすインデルを示した。したがって、編集の少なくとも 66.6 % が遺伝子破壊を誘導した。

【図18】例示的な標的部位、ガイド配列、及びそれらの相補性の配列を示す図である。

【図19】角膜ジストロフィーと関連する SNP 部位を含む例示的な標的配列を示す図である。

【図20】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。

【図21】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。

【図22】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。

【図23】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。

10

20

30

40

50

【図 24】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【図 25】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【図 26】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【図 27】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【図 28】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【図 29】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【図 30】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【図 31】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【図 32】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【図 33】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【図 34】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【図 35】TGFBI 遺伝子のイントロン領域中の例示的な共通のガイドを示す図である。
。

【発明を実施するための形態】

【0020】

全体を通して使用されるように、範囲は、その範囲内にあるあらゆる値を記載するための簡略記載として使用される。範囲内の任意の値を、その範囲の端点として選択することができる。さらに、本明細書で引用された全ての参考文献は、全ての目的について引用することによりその全体が本明細書の一部をなす。本開示における定義と引用文献の定義とが対立する場合には、本開示を優先する。

【0021】

1つの態様において、本開示は、角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療するための、例えばCRISPR/Cas9システムのためにデザインされたsgRNAを含む一本鎖ガイドRNA(sgRNA)に関する。上記sgRNAは、人工的なsgRNA、人造のsgRNA、合成のsgRNA、及び/又は天然に存在しないsgRNAであり得る。幾つかの実施形態において、上記sgRNAは、(i)CRISPR標的化RNA(crrNA)配列と、(ii)「sgRNAスキャフォールド」とも呼ばれるトランスクレアーゼ活性化型crrRNA(tracrRNA)配列とを含む。幾つかの実施形態において、上記crrNA配列及び上記tracrRNA配列は、天然には一緒に存在しないものである。本明細書で使用される場合に「sgRNA」という用語は、(i)ガイド配列(crrNA配列)と、(ii)Cas9ヌクレアーゼ動員配列(tracrRNA)とを含む一本鎖ガイドRNAを指し得る。例示的なガイド配列には、図18～図19に開示される配列が含まれる。上記crrNA配列は、関心が持たれた遺伝子中の領域に対して相同であり、Cas9ヌクレアーゼ活性を導き得る配列であり得る。上記crrNA配列及び上記tracrRNA配列は、天然には一緒に存在しないものである。上記sgRNAは、RNAとして、又はプロモーター下でsgRNAをコードする配列(sgRNA遺伝子)を有するプラスミドによる形質転換により送達され得る。

【0022】

幾つかの実施形態において、上記sgRNA又は上記crrNAは、標的配列(例えば

10

20

30

40

50

、標的ゲノム配列)の少なくとも一部分にハイブリダイズし、該 c r R N A は、該標的配列に相補性の配列を有し得る。幾つかの実施形態において、本明細書における標的配列は、本明細書に記載される P A M 部位に隣接する第 2 の標的配列にハイブリダイズする第 1 の標的配列である。幾つかの実施形態において、上記 s g R N A 又は上記 c r R N A は、上記第 1 の標的配列又は上記第 2 の標的配列を含み得る。「相補性」は、1 つの核酸がもう 1 つの核酸配列と慣例的なワトソン - クリック型又はその他の慣例的でない型のいずれかにより 1 つ以上の水素結合を形成する能力を指す。相補性のパーセントは、第 2 の核酸配列と水素結合(例えば、ワトソン - クリック塩基対形成)を形成し得る 1 つの核酸分子中の残基のパーセンテージを示す(例えば、10 個のうち 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個は、50% 相補性、60% 相補性、70% 相補性、80% 相補性、90% 相補性、及び 100% 相補性である)。「完全に相補性」とは、1 つの核酸配列の連続した残基の全てが、第 2 の核酸配列中の同じ数の連続的な残基と水素結合することを意味する。本明細書で使用される「本質的に相補性」は、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、30 個、35 個、40 個、45 個、50 個以上のヌクレオチドの領域にわたって、少なくとも 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、若しくは 100% である相補性の度合いを指すか、又は 2 個の核酸がストリンジエントな条件下でハイブリダイズすることを指す。本明細書で使用される場合に、ハイブリダイゼーションのための「ストリンジエントな条件」は、標的配列に相補性を有する核酸が、該標的配列と優先的にハイブリダイズし、非標的配列には本質的にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジエントな条件は、一般的に配列に依存しており、数多くの要因に応じて変動する。一般的に、配列が長くなるほど、該配列がその標的配列に特異的にハイブリダイズする温度は高くなる。ストリンジエントな条件の非限定的な例は、Tijssen (1993), *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part 1, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay"*, Elsevier, N.Y. に詳細に記載されている。「ハイブリダイゼーション」は、1 つ以上のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基の間の水素結合を介して安定化されている複合体を形成する反応を指す。上記水素結合は、ワトソン - クリック塩基対形成、フーゲスティーン結合によって、又は任意のその他の配列特異的な様式において生じ得る。上記複合体は、二重鎖構造を形成する 2 つの鎖、多重鎖複合体を形成する 3 つ以上の鎖、一本鎖の自己ハイブリダイズする鎖、又はこれらの任意の組み合わせを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、より広範な過程、例えば P C R の開始、又は酵素によるポリヌクレオチドの開裂における 1 つの工程を構成し得る。所与の配列とハイブリダイズすることが可能な配列は、所与の配列の「相補体」と呼ばれる。幾つかの実施形態において、上記 c r R N A 配列は、配列番号(10 + 4 n)(n は、0 から 221 までの整数である)からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約 80%、85%、90%、95%、又は 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を有する。本明細書で使用される場合に「約」という用語は、示された参照値と類似した値の範囲を指し得る。或る特定の実施形態においては「約」という用語は、示された参照値の 15 パーセント、10 パーセント、9 パーセント、8 パーセント、7 パーセント、6 パーセント、5 パーセント、4 パーセント、3 パーセント、2 パーセント、1 パーセント以下の範囲内に含まれる値の範囲を指す。幾つかの実施形態において、上記 c r R N A 配列は、配列番号(10 + 4 n)(n は、0 から 221 までの整数である)からなる群から選択されるヌクレオチド配列から 1 個、2 個、3 個、4 個、又は 5 個のヌクレオチドの付加、欠失、及び/又は置換を有するヌクレオチド配列を有する。そのような付加、欠失、及び/又は置換は、上記ヌクレオチド配列の 3' 末端又は 5' 末端に存在し得る。更なる実施形態において、上記 c r R N A 又は上記ガイド配列は、約 17 ヌクレオチド長、18 ヌクレオチド長、19 ヌクレオチド長、20 ヌクレオチド長、21 ヌクレオチド長、22 ヌクレオチド長、23 ヌクレオチド長、又は 24 ヌクレオチド長である。更なる実施形態において、上記 c r

10

20

30

40

50

R N A は、配列番号 1 0 のヌクレオチド配列を有する c r R N A 配列を除く。なおも更なる実施形態において、上記 c r R N A は、ケラチン 1 2 タンパク質中に L 1 3 2 P 突然変異をもたらす S N P を含むヌクレオチド配列にハイブリダイズする c r R N A 配列を除く。なおも更なる実施形態において、上記 c r R N A は、ケラチン 1 2 タンパク質中に 1 つの突然変異をもたらす S N P を含むヌクレオチド配列にハイブリダイズする c r R N A 配列を除く。

(0 0 2 3)

幾つかの実施形態において、*tracrRNA*は、*Cas9*を活性化して、*crrNA*配列の結合のためにdsDNAを開放するヘアピン構造を提供する。上記*tracrRNA*は、パリンドロームリピートに相補性の配列を有し得る。該*tracrRNA*が短いパリンドロームリピートにハイブリダイズする場合に、それは、細菌の二本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼのRNase IIIによるプロセシングを惹起し得る。更なる実施形態において、上記*tracrRNA*は、SPIDR（スペーサー散在型ダイレクトリピート（SPacer Interspersed Direct Repeats））を有し、特定の細菌種に通常特異的であるDNA座位のファミリーを構成し得る。CRISPR座位は、E.コリにおいて認識された異なるクラスの散在型の短配列リピート（interspersed short sequence repeats）（SSR）（Ishino et al., *J. Bacteriol.*, 169:5429-5433 [1987]、及びNakata et al., *J. Bacteriol.*, 171:3553-3556 [1989]）、及び関連遺伝子を含む。同様の散在型のSSRは、ハロフェラックス・メディテラネイ（*Haloferax mediterranei*）、ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）、アナバエナ（*Anabaena*）、及びマイコバクテリウム・ツベルクロシス（*Mycobacterium tuberculosis*）において同定された（Groenen et al., *Mol. Microbiol.*, 10:1057-1065 [1993]、Hoe et al., *Emerg. Infect. Dis.*, 5:254-263 [1999]、Masepohl et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1307:26-30 [1996]、及びMojica et al., *Mol. Microbiol.*, 17:85-93 [1995]を参照のこと）。CRISPR座位は、リピートの構造の点でその他のSSRとは異なり得て、それらは、短い規則正しい間隔を持つリピート（short regularly spaced repeats）（SRSR）と呼ばれている（Janssen et al., *OMICS J. Integ. Biol.*, 6:23-33 [2002]、及びMojica et al., *Mol. Microbiol.*, 36:244-246 [2000]）。或る特定の実施形態において、上記リピートは、本質的に一定の長さを有する固有の介在配列により規則正しい間隔を持つクラスターで存在する短いエレメントである（上記のMojica et al., [2000]）。上記リピート配列は株間で高度に保存されているが、散在型のリピートの数及びスペーサー領域の配列は一般的に株ごとに異なる（van Embden et al., *J. Bacteriol.*, 182:2393-2401 [2000]）。上記*tracrRNA*配列は、当該技術分野で既知のCRISPR/Cas9システムのための*tracrRNA*に関する任意の配列であり得る。更なる実施形態において、上記*tracrRNA*は、配列番号2及び配列番号6のヌクレオチド配列と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。上記*tracrRNA*配列は、当該技術分野で既知のCRISPR/Cas9システムのための*tracrRNA*のための任意の配列であり得る。例示的なCRISPR/Cas9システム、sgRNA、crrNA及び*tracrRNA*、並びにそれらの製造方法及び使用は、米国特許第8697359号、米国特許出願公開第20150232882号、同第20150203872号、同第20150184139号、同第20150079681号、同第20150073041号、同第20150056705号、同第20150031134号、同第20150020223号、同第20140357530号、同第20140335620号、同第20140310830号、同第20140273234号、同第20140273232号、同第20140273231号、同第20140256046号、同第20140248702号、同第20140242700号、同第20140242699号、同第20140242664号、同第20140234972号、同第20140227787号、同第20140189896号、同第20140186958号、同第20140186919号、同第20140186843号、同第20140179770号、同第20140179006号、同第20140179007号、同第20140179008号、同第20140179009号、同第201401790010号、同第201401790011号、同第201401790012号、同第201401790013号、同第201401790014号、同第201401790015号、同第201401790016号、同第201401790017号、同第201401790018号、同第201401790019号、同第201401790020号、同第201401790021号、同第201401790022号、同第201401790023号、同第201401790024号、同第201401790025号、同第201401790026号、同第201401790027号、同第201401790028号、同第201401790029号、同第201401790030号、同第201401790031号、同第201401790032号、同第201401790033号、同第201401790034号、同第201401790035号、同第201401790036号、同第201401790037号、同第201401790038号、同第201401790039号、同第201401790040号、同第201401790041号、同第201401790042号、同第201401790043号、同第201401790044号、同第201401790045号、同第201401790046号、同第201401790047号、同第201401790048号、同第201401790049号、同第201401790050号、同第201401790051号、同第201401790052号、同第201401790053号、同第201401790054号、同第201401790055号、同第201401790056号、同第201401790057号、同第201401790058号、同第201401790059号、同第201401790060号、同第201401790061号、同第201401790062号、同第201401790063号、同第201401790064号、同第201401790065号、同第201401790066号、同第201401790067号、同第201401790068号、同第201401790069号、同第201401790070号、同第201401790071号、同第201401790072号、同第201401790073号、同第201401790074号、同第201401790075号、同第201401790076号、同第201401790077号、同第201401790078号、同第201401790079号、同第201401790080号、同第201401790081号、同第201401790082号、同第201401790083号、同第201401790084号、同第201401790085号、同第201401790086号、同第201401790087号、同第201401790088号、同第201401790089号、同第201401790090号、同第201401790091号、同第201401790092号、同第201401790093号、同第201401790094号、同第201401790095号、同第201401790096号、同第201401790097号、同第201401790098号、同第201401790099号、同第2014017900100号、同第2014017900101号、同第2014017900102号、同第2014017900103号、同第2014017900104号、同第2014017900105号、同第2014017900106号、同第2014017900107号、同第2014017900108号、同第2014017900109号、同第2014017900110号、同第2014017900111号、同第2014017900112号、同第2014017900113号、同第2014017900114号、同第2014017900115号、同第2014017900116号、同第2014017900117号、同第2014017900118号、同第2014017900119号、同第2014017900120号、同第2014017900121号、同第2014017900122号、同第2014017900123号、同第2014017900124号、同第2014017900125号、同第2014017900126号、同第2014017900127号、同第2014017900128号、同第2014017900129号、同第2014017900130号、同第2014017900131号、同第2014017900132号、同第2014017900133号、同第2014017900134号、同第2014017900135号、同第2014017900136号、同第2014017900137号、同第2014017900138号、同第2014017900139号、同第2014017900140号、同第2014017900141号、同第2014017900142号、同第2014017900143号、同第2014017900144号、同第2014017900145号、同第2014017900146号、同第2014017900147号、同第2014017900148号、同第2014017900149号、同第2014017900150号、同第2014017900151号、同第2014017900152号、同第2014017900153号、同第2014017900154号、同第2014017900155号、同第2014017900156号、同第2014017900157号、同第2014017900158号、同第2014017900159号、同第2014017900160号、同第2014017900161号、同第2014017900162号、同第2014017900163号、同第2014017900164号、同第2014017900165号、同第2014017900166号、同第2014017900167号、同第2014017900168号、同第2014017900169号、同第2014017900170号、同第2014017900171号、同第2014017900172号、同第2014017900173号、同第2014017900174号、同第2014017900175号、同第2014017900176号、同第2014017900177号、同第2014017900178号、同第2014017900179号、同第2014017900180号、同第2014017900181号、同第2014017900182号、同第2014017900183号、同第2014017900184号、同第2014017900185号、同第2014017900186号、同第2014017900187号、同第2014017900188号、同第2014017900189号、同第2014017900190号、同第2014017900191号、同第2014017900192号、同第2014017900193号、同第2014017900194号、同第2014017900195号、同第2014017900196号、同第2014017900197号、同第2014017900198号、同第2014017900199号、同第2014017900200号、同第2014017900201号、同第2014017900202号、同第2014017900203号、同第2014017900204号、同第2014017900205号、同第2014017900206号、同第2014017900207号、同第2014017900208号、同第2014017900209号、同第2014017900210号、同第2014017900211号、同第2014017900212号、同第2014017900213号、同第2014017900214号、同第2014017900215号、同第2014017900216号、同第2014017900217号、同第2014017900218号、同第2014017900219号、同第2014017900220号、同第2014017900221号、同第2014017900222号、同第2014017900223号、同第2014017900224号、同第2014017900225号、同第2014017900226号、同第2014017900227号、同第2014017900228号、同第2014017900229号、同第2014017900230号、同第2014017900231号、同第2014017900232号、同第2014017900233号、同第2014017900234号、同第2014017900235号、同第2014017900236号、同第2014017900237号、同第2014017900238号、同第2014017900239号、同第2014017900240号、同第2014017900241号、同第2014017900242号、同第2014017900243号、同第2014017900244号、同第2014017900245号、同第2014017900246号、同第2014017900247号、同第2014017900248号、同第2014017900249号、同第2014017900250号、同第2014017900251号、同第2014017900252号、同第2014017900253号、同第2014017900254号、同第2014017900255号、同第2014017900256号、同第2014017900257号、同第2014017900258号、同第2014017900259号、同第2014017900260号、同第2014017900261号、同第2014017900262号、同第2014017900263号、同第2014017900264号、同第2014017900265号、同第2014017900266号、同第2014017900267号、同第2014017900268号、同第2014017900269号、同第2014017900270号、同第2014017900271号、同第2014017900272号、同第2014017900273号、同第2014017900274号、同第2014017900275号、同第2014017900276号、同第2014017900277号、同第2014017900278号、同第2014017900279号、同第2014017900280号、同第2014017900281号、同第2014017900282号、同第2014017900283号、同第2014017900284号、同第2014017900285号、同第2014017900286号、同第2014017900287号、同第2014017900288号、同第2014017900289号、同第2014017900290号、同第2014017900291号、同第2014017900292号、同第2014017900293号、同第2014017900294号、同第2014017900295号、同第2014017900296号、同第2014017900297号、同第2014017900298号、同第2014017900299号、同第2014017900300号、同第2014017900301号、同第2014017900302号、同第2014017900303号、同第2014017900304号、同第2014017900305号、同第2014017900306号、同第2014017900307号、同第2014017900308号、同第2014017900309号、同第2014017900310号、同第2014017900311号、同第2014017900312号、同第2014017900313号、同第2014017900314号、同第2014017900315号、同第2014017900316号、同第2014017900317号、同第2014017900318号、同第2014017900319号、同第2014017900320号、同第2014017900321号、同第2014017900322号、同第2014017900323号、同第2014017900324号、同第2014017900325号、同第2014017900326号、同第2014017900327号、同第2014017900328号、同第2014017900329号、同第2014017900330号、同第2014017900331号、同第2014017900332号、同第2014017900333号、同第2014017900334号、同第2014017900335号、同第2014017900336号、同第2014017900337号、同第2014017900338号、同第2014017900339号、同第2014017900340号、同第2014017900341号、同第2014017900342号、同第2014017900343号、同第2014017900344号、同第2014017900345号、同第2014017900346号、同第2014017900347号、同第2014017900348号、同第2014017900349号、同第2014017900350号、同第2014017900351号、同第2014017900352号、同第2014017900353号、同第2014017900354号、同第2014017900355号、同第2014017900356号、同第2014017900357号、同第2014017900358号、同第2014017900359号、同第2014017900360号、同第2014017900361号、同第2014017900362号、同第2014017900363号、同第2014017900364号、同第2014017900365号、同第2014017900366号、同第2014017900367号、同第2014017900368号、同第2014017900369号、同第2014017900370号、同第2014017900371号、同第2014017900372号、同第2014017900373号、同第2014017900374号、同第2014017900375号、同第2014017900376号、同第2014017900377号、同第2014017900378号、同第2014017900379号、同第2014017900380号、同第2014017900381号、同第2014017900382号、同第2014017900383号、同第2014017900384号、同第2014017900385号、同第2014017900386号、同第2014017900387号、同第2014017900388号、同第2014017900389号、同第2014017900390号、同第2014017900391号、同第2014017900392号、同第2014017900393号、同第2014017900394号、同第2014017900395号、同第2014017900396号、同第2014017900397号、同第2014017900398号、同第2014017900399号、同第2014017900400号、同第2014017900401号、同第2014017900402号、同第2014017900403号、同第2014017900404号、同第2014017900405号、同第2014017900406号、同第2014017900407号、同第2014017900408号、同第2014017900409号、同第2014017900410号、同第2014017900411号、同第2014017900412号、同第2014017900413号、同第2014017900414号、同第2014017900415号、同第2014017900416号、同第2014017900417号、同第2014017900418号、同第2014017900419号、同第2014017900420号、同第2014017900421号、同第2014017900422号、同第2014017900423号、同第2014017900424号、同第2014017900425号、同第2014017900426号、同第2014017900427号、同第2014017900428号、同第2014017900429号、同第2014017900430号、同第2014017900431号、同第2014017900432号、同第2014017900433号、同第2014017900434号、同第2014017900435号、同第2014017900436号、同第2014017900437号、同第2014017900438号、同第2014017900439号、同第2014017900440号、同第2014017900441号、同第2014017900442号、同第2014017900443号、同第2014017900444号、同第2014017900445号、同第2014017900446号、同第2014017900447号、同第2014017900448号、同第2014017900449号、同第2014017900450号、同第2014017900451号、同第2014017900452号、同第2014017900453号、同第2014017900454号、同第2014017900455号、同第2014017900456号、同第2014017900457号、同第2014017900458号、同第2014017900459号、同第2014017900460号、同第2014017900461号、同第2014017900462号、同第2014017900463号、同第2014017900464号、同第2014017900465号、同第2014017900466号、同第2014017900467号、同第2014017900468号、同第2014017900469号、同第2014017900470号、同第2014017900471号、同第2014017900472号、同第2014017900473号、同第2014017900474号、同第2014017900475号、同第2014017900476号、同第2014017900477号、同第2014017900478号、同第2014017900479号、同第2014017900480号、同第2014017900481号、同第2014017900482号、同第2014017900483号、同第2014017900484号、同第2014017900485号、同第2014017900486号、同第2014017900487号、同第2014017900488号、同第2014017900489号、同第2014017900490号、同第2014017900491号、同第2014017900492号、同第2014017900493号、同第2014017900494号、同第2014017900495号、同第2014017900496号、同第2014017900497号、同第2014017900498号、同第2014017900499号、同第2014017900500号、同第2014017900501号、同第2014017900502号、同第2014017900503号、同第2014017900504号、同第2014017900505号、同第2014017900506号、同第2014017900507号、同第2014017900508号、同第2014017900509号、同第2014017900510号、同第2014017900511号、同第2014017900512号、同第2014017900513号、同第2014017900514号、同第2014017900515号、同第2014017900516号、同第2014017900517号、同第2014017900518号、同第2014017900519号、同第2014017900520号、同第2014017900521号、同第2014017900522号、同第2014017900523号、同第2014017900524号、同第2014017900525号、同第2014017900526号、同第2014017900527号、同第2014017900528号、同第2014017900529号、同第2014017900530号、同第2014017900531号、同第2014017900532号、同第2014017900533号、同第2014017900534号、同第2014017900535号、同第2014017900536号、同第2014017900537号、同第2014017900538号、同第2014017900539号、同第2014017900540号、同第2014017900541号、同第2014017900542号、同第2014017900543号、同第2014017900544号、同第2014017900545号、同第2014017900546号、同第2014017900547号、同第2014017900548号、同第2014017900549号、同第2014017900550号、同第2014017900551号、同第2014017900552号、同第2014017900553号、同第2014017900554号、同第2014017900555号、同第2014017900556号、同第2014017900557号、同第2014017900558号、同第2014017900559号、同第2014017900560号、同第2014017900561号、同第2014017900562号、同第2014017900563号、同第2014017900564号、同第2014017900565号、同第2014017900566号、同第2014017900567号、同第2014017900568号、同第2014017900569号、同第2014017900570号、同第2014017900571号、同第2014017900572号、同第2014017900573号、同第2014017900574号、同第2014017900575号、同第2014017900576号、同第2014017900577号、同第2014017900578号、同第2014017900579号、同第2014017900580号、同第2014017900581号、同第2014017900582号、同第2014017900583号、同第2014017900584号、同第2014017900585号、同第2014017900586号、同第2014017900587号、同第2014017900588号、同第2014017900589号、同第2014017900590号、同第2014017900591号、同第2014017900592号、同第2014017900593号、同第2014017900594号、同第2014017900595号、同第2014017900596号、同第2014017900597号、同第2014017900598号、同第2014017900599号、同第2014017900600号、同第2014017900601号、同第2014017900602号、同第2014017900603号、同第2014017900604号、同第2014017900605号、同第2014017900606号、同第2014017900607号、同第2014017900608号、同第2014017900609号、同第2014017900610号、同第2014017900611号、同第2014017900612号、同第2014017900613号、同第2014017900614号、同第2014017900615号、同第2014017900616号、同第2014017900617号、同第2014017900618号、同第2014017900619号、同第2014017900620号、同第2014017900621号、同第2014017900622号、同第2014017900623号、同第2014017900624号、同第2014017900625号、同第2014017900626号、同第2014017900627号、同第2014017900628号、同第2014017900629号、同第2014017900630号、同第2014017900631号、同第2014017900632号、同第2014017900633号、同第2014017900634号、同第2014017900635号、同第2014017900636号、同第2014017900637号、同第2014017900638号、同第2014017900639号、同第2014017900640号、同第2014017900641号、同第2014017900642号、同第2014017900643号、同第2014017900644号、同第2014017900645号、同第2014017900646号、同第201401790064

10
20
30
40
50

20140170753号、同第20140093913号、同第20140080216号、及び国際公開第2016049024号に開示されており、それら全ては、引用することによりその全体が本出願の一部をなす。

【0024】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載されるc r R N A配列を含むプライマーを含む、C R I S P R / C a s 9システムのためのベクター中に挿入されるべきオリゴヌクレオチド対に関する。該プライマーは、c r R N A配列に隣接する2個、3個、4個、5個、又は6個のヌクレオチドのロケーター配列を更に含み得て、上記ロケーター配列は、天然にはc r R N A配列に隣接して存在しない。幾つかの実施形態において、本開示は、C R I S P R / C a s 9システムのためのc r R N Aをコードするためのベクター、例えばp S p C a s 9 (B B) - 2 A - P u r o (P X 4 5 9) 及びp X 6 0 1 - A A V - C M V : : N L S - S a C a s 9 - N L S - 3 x H A - b G H p A ; U 6 : : B s a l - s g R N A中に導入されるべき、配列番号(10+4n)(nは、0から221までの整数である)のヌクレオチド配列を含むプライマーを含むオリゴヌクレオチド対に関する。更なる実施形態において、上記オリゴヌクレオチド対は、配列番号Xのヌクレオチド配列を有する第1のプライマーと、配列番号Yのヌクレオチド配列を有する第2のプライマーとを含み、その際、Xは、11+4nであり、Yは、12+4nであり、かつnは、1から221までの整数である。幾つかの実施形態において、上記c r R N Aは、配列番号58、配列番号54、配列番号50、配列番号42、配列番号94、配列番号90、配列番号86、配列番号82、配列番号78、配列番号74、配列番号70、配列番号114、配列番号100、配列番号106、配列番号98、配列番号178、配列番号174、配列番号170、配列番号166、配列番号162、配列番号158、配列番号146、配列番号142、配列番号138、配列番号134、配列番号130、及び配列番号126からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0025】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載されるC a s 9ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子及びs g R N Aを含む少なくとも1つのベクターを含む、操作されたクラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドロームリピート(C R I S P R) / C R I S P R関連タンパク質9(C a s 9)システムに関する。「天然に存在しない」又は「操作された」という用語は、区別なく使用され、人の手の介入を示す。該用語は、核酸分子又はポリペプチドに適用する場合には、該核酸分子又は該ポリペプチドが、天然では本来関連があり、自然界に見られる少なくとも1種のその他の成分を少なくとも本質的に含まないことを意味する。幾つかの実施形態において、上記C a s 9ヌクレアーゼ及び上記s g R N Aは、天然には一緒に存在しないものである。

【0026】

一般的に「C R I S P Rシステム」は、C a s遺伝子をコードする配列、t r a c r(トランス活性化C R I S P R)配列(例えば、t r a c r R N A又は活性の部分的t r a c r R N A)、t r a c r - m a t e配列(「ダイレクトリピート」及び内因性C R I S P Rシステムにおけるt r a c r R N Aのプロセシングされた部分的ダイレクトリピート)、ガイド配列(本明細書では「c r R N A」とも、又は内因性C R I S P Rシステムにおける「スペーサー」とも呼ばれる)、及び/又はその他の配列を含むC R I S P R関連(「C a s」)遺伝子の発現に関連する又は該活性を導く転写物及びその他のエレメント並びにC R I S P R座位からの転写物をひとまとめにして指す。上記のように、s g R N Aは、少なくともt r a c r R N A及びc r R N Aの組み合わせである。幾つかの実施形態において、C R I S P Rシステムの1つ以上のエレメントは、I I型のC R I S P Rシステムから誘導される。幾つかの実施形態において、C R I S P Rシステムの1つ以上のエレメントは、内因性C R I S P Rシステムを含む特定の生物、例えばストレプトコッカス・ピオゲネス又はスタフィロコッカス・アウレウスから誘導される。一般的に、C R I S P Rシステムは、標的配列(内因性C R I S P Rシステムにおいてプロトスペーサーとも呼ばれる)の部位でC R I S P R複合体の形成を促進するエレメントを特徴とする。C

R I S P R 複合体の形成において「標的配列」は、ガイド配列が相補性を有するようにデザインされる配列であって、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがC R I S P R 複合体の形成を促進する配列を指し得るか、又は図8に示されるように「標的配列」は、ガイド配列が有するP A M部位に隣接する、配列を指し得る。完全な相補性は必ずしも必要ではないが、但し、ハイブリダイゼーションを引き起こし、かつC R I S P R 複合体の形成を促進するのに十分な相補性が存在するものとする。本開示においては「標的部位」は、標的配列及びその相補性配列の両方を、例えば二本鎖ヌクレオチドで含む標的配列の部位を指す。幾つかの実施形態において、本明細書に記載される標的部位は、C R I S P R / C a s 9システムのs g R N A若しくはc r R N Aにハイブリダイズする第1の標的配列、及び/又はP A Mの5'末端に隣接する第2の標的配列を意味し得る。標的配列は、任意のポリヌクレオチド、例えばD N A又はR N Aポリヌクレオチドを含み得る。幾つかの実施形態において、標的配列は、細胞の核又は細胞質中に位置している。幾つかの実施形態において、上記標的配列は、真核細胞の細胞小器官、例えばミトコンドリア又は葉緑体内に存在し得る。

10

【0027】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載されるC a s 9ヌクレアーゼは既知である。例えば、S . ピオゲネスのC a s 9タンパク質のアミノ酸配列は、S w i s s P r o tデータベースにおいてアクセション番号Q 9 9 Z W 2として見出すことができる。C a s 9ヌクレアーゼは、C a s 9のホモログ又はオルソログであり得る。改善された特異性を示す突然変異C a s 9ヌクレアーゼを使用することもできる（例えば、Ann Ran et al. Cell 154(6) 1380-89 (2013)を参照のこと、これは全ての目的について、特に標的核酸に関する改善された特異性を有する突然変異C a s 9ヌクレアーゼに関連する全ての教示について引用することによりその全体が本出願の一部をなす）。核酸操作試薬は、失活されたC a s 9ヌクレアーゼ(d C a s 9)も含み得る。核酸エレメントに結合する失活されたC a s 9は単独で、立体障害性R N Aポリメラーゼ機構により転写を抑制し得る。さらに、失活されたC a s 9は、標的核酸に不可逆的な突然変異を導入することなく標的部位での遺伝子発現に影響を及ぼす他のタンパク質（例えば、転写リプレッサー、アクチベーター、及び動員ドメイン）のためのホーミング装置として使用され得る。例えば、d C a s 9は、K R A B又はS I Dエフェクター等の転写リプレッサードメインに融合されて、標的部位でのエピジェネティックサイレンシングを促進することができる。C a s 9はまた、V P 1 6 / V P 6 4又はp 6 4活性化ドメインへの融合により合成的転写アクチベーターへと変換され得る。幾つかの場合には、強化型C a s 9(e C a 9)ヌクレアーゼと呼ばれる突然変異のI I型ヌクレアーゼが、野生型C a s 9ヌクレアーゼの代わりに使用される。強化型C a s 9は、非標的結合を弱めることにより特異性を改善させよう適切に操作されている。これは、非標的鎖の溝内の正に荷電した残基を中和することにより実現されている(Slaymaker et al., 2016)。

20

【0028】

幾つかの実施形態において、上記C a s 9ヌクレアーゼは、標的配列の位置で、例えば標的配列内で、及び/又は標的配列の相補体内で一方の鎖又は両方の鎖の開裂を導く。幾つかの実施形態において、上記C a s 9ヌクレアーゼは、標的配列の最初のヌクレオチド又は最後のヌクレオチドから約1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個、50個、100個、200個、500個以上の塩基対内で一方の鎖又は両方の鎖の開裂を導く。

30

【0029】

C a s 9ヌクレアーゼにより導かれたD N A開裂の後に、2つの方式のD N A修復、つまり相同配列指向性修復(H D R)及び非相同末端結合(N H E J)が細胞に利用可能である。突然変異部位の近くでのC a s 9開裂の後のH D Rによる突然変異の継ぎ目ない修正は魅力的であるが、この方法の効率は、該方法が幹細胞又は誘導多能性幹細胞(i P S C)のin vitro/ex vivo変換のためだけに使用することができるにすぎず、修復が行われた細胞を選択し、これらの変更された細胞のみを純化する追加の工程

40

50

を伴うことを意味する。H D R は、細胞中で高い頻度では生じない。幸いなことに、N H E J は、はるかに高い効率で生じ、角膜ジストロフィーの多くに記載されるドミナントネガティブ変異のために適切であり得る。更なる実施形態において、上記 C a s 9 ヌクレアーゼは、ストレプトコッカスに由来する。なおも更なる実施形態において、上記 C a s 9 ヌクレアーゼは、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) (S p y)、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ (*Streptococcus dysgalactiae*)、ストレプトコッカス・カニス (*Streptococcus canis*)、ストレプトコッカス・エクイ (*Streptococcus equi*)、ストレプトコッカス・イニアエ (*Streptococcus iniae*)、ストレプトコッカス・フォカエ (*Streptococcus phocae*)、ストレプトコッカス・シュードポルシヌス (*Streptococcus pseudoporcinus*)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*)、ストレプトコッカス・シュードポルシヌス (*Streptococcus pseudoporcinus*)、ストレプトコッカス・インファンタリウス (*Streptococcus infantarius*)、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*)、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*)、ストレプトコッカス・カバリ (*Streptococcus caballi*)、ストレプトコッカス・エクイヌス (*Streptococcus equinus*)、ストレプトコッカス属種 o r a l t a x o n (*Streptococcus sp. oral taxon*)、ストレプトコッカス・ミティス (*Streptococcus mitis*)、ストレプトコッカス・ガロリティクス (*Streptococcus gallolyticus*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordoni*)、ストレプトコッカス・パストーリアヌス (*Streptococcus pasteurianus*)、又はそれらの変異体に由来する。そのような変異体には、D 1 0 A ニッカーゼ、Klein et al., 2016 *Nature*, 529, 490-495に記載される S p y C a s 9 - H F 1、又は Slaymaker et al., 2016 *Science*, 351 (6268), 84-88に記載される S p y e C a s 9 が含まれ得る。更なる実施形態において、上記 C a s 9 ヌクレアーゼは、スタフィロコッカスに由来する。なおも更なる実施形態において、上記 C a s 9 ヌクレアーゼは、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、S . シミアエ (*S. simiae*)、S . アウリクラリス (*S. auricularis*)、S . カルノサス (*S. carnosus*)、S . コンディメンティ (*S. condimenti*)、S . マッシリエンシス (*S. massiliensis*)、S . ピスシフェルメンタンス (*S. piscifermentans*)、S . シムランス (*S. simulans*)、S . カピティス (*S. capitis*)、S . カプラエ (*S. caprae*)、S . エピデルミディス (*S. epidermidis*)、S . サッカロリティクス (*S. saccharolyticus*)、S . デブリエセイ (*S. devriesei*)、S . ヘモリティクス (*S. haemolyticus*)、S . ホミニス (*S. hominis*)、S . アグネティス (*S. agnetis*)、S . クロモゲネス (*S. chromogenes*)、S . フェリス (*S. felis*)、S . デルフィニ (*S. delphini*)、S . ハイカス (*S. hyicus*)、S . インテルメディウス (*S. intermedius*)、S . ルトラエ (*S. lutrae*)、S . ミクロティ (*S. microti*)、S . ムスカエ (*S. muscae*)、S . シュードインターメディウス (*S. pseudointermedius*)、S . ロストリ (*S. rostri*)、S . シュライフェリ (*S. schleiferi*)、S . ルグドゥネンシス (*S. lugdunensis*)、S . アーレッタエ (*S. arlettae*)、S . コーニイ (*S. cohnii*)、S . エクオルム (*S. equorum*)、S . ガリナルム (*S. gallinarum*)、S . クローシイ (*S. kloosii*)、S . レエイ (*S. leei*)、S . ネパレンシス (*S. nepalensis*)、S . サプロフィティクス (*S. saprophyticus*)、S . スクシヌス (*S. succinus*)、S . キシロサス (*S. xylosus*)、S . フレウレティイ (*S. fleurettii*)、S . レンツス (*S. lentus*)、S . シウリ (*S. sciuri*)、S . ステパノヴィチイ (*S. stepanovicii*)、S . ヴィツリヌス (*S. vitulinus*)、S . シムランス (*S. simulans*)、S . パストーリ (*S. pasteurii*)、S . ワルネリ (*S. warneri*)、又はそれらの変異体に由来する。

【 0 0 3 0 】

更なる実施形態において、上記 C a s 9 ヌクレアーゼは、ストレプトコッカス・ピオゲネス由来の C a s 9 ヌクレアーゼを除く。

【 0 0 3 1 】

更なる実施形態において、上記 C a s 9 ヌクレアーゼは、配列番号 4 又は配列番号 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 6 0 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、

10

20

30

40

50

6 6 %、 6 7 %、 6 8 %、 6 9 %、 7 0 %、 7 1 %、 7 2 %、 7 3 %、 7 4 %、 7 5 %、 7 6 %、 7 7 %、 7 8 %、 7 9 %、 8 0 %、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。なおも更なる実施形態において、上記 Cas 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子は、配列番号 3 又は配列番号 7 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約 6 0 %、 6 3 %、 6 4 %、 6 5 %、 6 6 %、 6 7 %、 6 8 %、 6 9 %、 7 0 %、 7 1 %、 7 2 %、 7 3 %、 7 4 %、 7 5 %、 7 6 %、 7 7 %、 7 8 %、 7 9 %、 8 0 %、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 又は 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。
10

【 0 0 3 2 】

幾つかの実施形態において、上記 Cas 9 ヌクレアーゼは、該 Cas 9 ヌクレアーゼの特異性を改善する 1 つ以上の突然変異を有する強化型 Cas 9 ヌクレアーゼである。更なる実施形態において、上記強化型 Cas 9 ヌクレアーゼは、該 Cas 9 ヌクレアーゼ中の H N H、R u v C、及び P A M 相互作用ドメインの間に位置する正に荷電した溝を中和する 1 つ以上の突然変異を有するストレプトコッカス・ピオゲネス由来の Cas 9 ヌクレアーゼに由来するものである。なおも更なる実施形態において、上記 Cas 9 ヌクレアーゼは、(i) K 8 5 5 A、(i i) K 8 1 0 A、K 1 0 0 3 A、及び R 1 0 6 0 A、並びに(i i i) K 8 4 8 A、K 1 0 0 3 A、及び R 1 0 6 0 A からなる群から選択される 1 つ以上の突然変異を有するストレプトコッカス・ピオゲネス由来の Cas 9 ヌクレアーゼの突然変異アミノ酸配列(例えば、配列番号 4)と少なくとも約 6 0 %、 6 3 %、 6 4 %、 6 5 %、 6 6 %、 6 7 %、 6 8 %、 6 9 %、 7 0 %、 7 1 %、 7 2 %、 7 3 %、 7 4 %、 7 5 %、 7 6 %、 7 7 %、 7 8 %、 7 9 %、 8 0 %、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。なおも更なる実施形態において、上記 Cas 9 ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子は、上記突然変異アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と少なくとも約 6 0 %、 6 3 %、 6 4 %、 6 5 %、 6 6 %、 6 7 %、 6 8 %、 6 9 %、 7 0 %、 7 1 %、 7 2 %、 7 3 %、 7 4 %、 7 5 %、 7 6 %、 7 7 %、 7 8 %、 7 9 %、 8 0 %、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、 又は 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。
20

【 0 0 3 3 】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載される C R I S P R / Cas 9 システム及び該 C R I S P R / Cas 9 システムを使用する方法は、N H E J により D N A 配列を変化させる。更なる実施形態において、本明細書に記載される C R I S P R / Cas 9 システム又はベクターは、修復ヌクレオチド分子を含まない。
30

【 0 0 3 4 】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載される方法は、例えば図 1 4 に示されるように H D R により D N A 配列を変化させる。更なる実施形態において、この H D R アプローチは、M E C D における遺伝子治療のための e x v i v o アプローチにおいて使用され得る。更なる実施形態において、このアプローチは、アレル特異的でなくともよく、K R T 1 2 コドン 1 2 9、1 3 0、1 3 2、1 3 3、及び 1 3 5 における突然変異を修復するために使用され得る。
40

【 0 0 3 5 】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載される C R I S P R / Cas 9 システム又はベクターは、修復ヌクレオチド分子を更に含み得る。Cas 9 ヌクレアーゼにより開裂される標的ポリヌクレオチドは、外因性のテンプレートポリヌクレオチドである修復ヌクレオチド分子との相同組み換えにより修復され得る。この修復は、上記標的ポリヌクレオ
50

チドの1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含む突然変異をもたらし得る。上記修復ヌクレオチド分子は、H D R 経路によるI I型のヌクレアーゼ誘導型D S Bの修復に際して、特異的アレル（例えば、野生型アレル）を、複数の幹細胞の1つ以上の細胞のゲノム中に導入する。幾つかの実施形態において、上記修復ヌクレオチド分子は、一本鎖D N A (s s D N A)である。その他の実施形態において、上記修復ヌクレオチド分子は、プラスミドベクターとして細胞中に導入される。幾つかの実施形態において、上記修復ヌクレオチド分子は、20ヌクレオチド～25ヌクレオチド、25ヌクレオチド～30ヌクレオチド、30ヌクレオチド～35ヌクレオチド、35ヌクレオチド～40ヌクレオチド、40ヌクレオチド～45ヌクレオチド、45ヌクレオチド～50ヌクレオチド、50ヌクレオチド～55ヌクレオチド、55ヌクレオチド～60ヌクレオチド、60ヌクレオチド～65ヌクレオチド、65ヌクレオチド～70ヌクレオチド、70ヌクレオチド～75ヌクレオチド、75ヌクレオチド～80ヌクレオチド、80ヌクレオチド～85ヌクレオチド、85ヌクレオチド～90ヌクレオチド、90ヌクレオチド～95ヌクレオチド、95ヌクレオチド～100ヌクレオチド、100ヌクレオチド～105ヌクレオチド、105ヌクレオチド～110ヌクレオチド、110ヌクレオチド～115ヌクレオチド、115ヌクレオチド～120ヌクレオチド、120ヌクレオチド～125ヌクレオチド、125ヌクレオチド～130ヌクレオチド、130ヌクレオチド～135ヌクレオチド、135ヌクレオチド～140ヌクレオチド、140ヌクレオチド～145ヌクレオチド、145ヌクレオチド～150ヌクレオチド、150ヌクレオチド～155ヌクレオチド、155ヌクレオチド～160ヌクレオチド、160ヌクレオチド～165ヌクレオチド、165ヌクレオチド～170ヌクレオチド、170ヌクレオチド～175ヌクレオチド、175ヌクレオチド～180ヌクレオチド、180ヌクレオチド～185ヌクレオチド、185ヌクレオチド～190ヌクレオチド、190ヌクレオチド～195ヌクレオチド、又は195ヌクレオチド～200ヌクレオチドの長さである。幾つかの実施形態において、上記修復ヌクレオチド分子は、200ヌクレオチド～300ヌクレオチド、300ヌクレオチド～400ヌクレオチド、400ヌクレオチド～500ヌクレオチド、500ヌクレオチド～600ヌクレオチド、600ヌクレオチド～700ヌクレオチド、700ヌクレオチド～800ヌクレオチド、800ヌクレオチド～900ヌクレオチド、900ヌクレオチド～1000ヌクレオチドの長さである。その他の実施形態において、上記修復ヌクレオチド分子は、1000ヌクレオチド～2000ヌクレオチド、2000ヌクレオチド～3000ヌクレオチド、3000ヌクレオチド～4000ヌクレオチド、4000ヌクレオチド～5000ヌクレオチド、5000ヌクレオチド～6000ヌクレオチド、6000ヌクレオチド～7000ヌクレオチド、7000ヌクレオチド～8000ヌクレオチド、8000ヌクレオチド～9000ヌクレオチド、又は9000ヌクレオチド～10000ヌクレオチドの長さである。幾つかの実施形態において、上記修復ヌクレオチド分子は、本明細書に記載される角膜ジストロフィーと関連する突然変異を含む幹細胞ゲノム（すなわち「角膜ジストロフィー標的核酸」）の領域でH D R 経路により相同組み換えを受けることができる。或る特定の実施形態において、上記修復核酸は、T G F B I 遺伝子、K R T 3 遺伝子、K R T 1 2 遺伝子、G S N 遺伝子、及びU B I A D 1 遺伝子内の標的核酸と相同組み換えすることができる。特定の実施形態において、上記修復ヌクレオチド分子は、本明細書に記載される突然変異アミノ酸（例えば、L e u 1 3 2 P r o ）をコードするK R T 1 2 遺伝子中の核酸と相同組み換えすることが可能である。幾つかの実施形態において、上記ベクターは、多数の修復ヌクレオチド分子を含む。

【0036】

上記修復ヌクレオチド分子は、特定の突然変異を含む本明細書に記載される細胞の同定及びソーティングのための標識を更に含み得る。上記修復ヌクレオチド分子と共に含まれる例示的な標識には、蛍光標識及び長さ又は配列により特定可能な核酸バーコードが含まれる。

【0037】

更なる実施形態において、本明細書に記載されるC R I S P R / C a s 9 システム又は

10

20

30

40

50

ベクターは、少なくとも 1 つの核局在化シグナル (NLS) を含み得る。更なる実施形態において、上記 sgRNA 及び上記 Cas9 ヌクレアーゼは、同じベクター上、又は異なるベクター上に含まれる。

【0038】

別の様において、本開示は、少なくとも 1 つの遺伝子産物の発現を変化させる方法であって、本明細書に記載される操作された CRISPR / Cas9 システムを、標的配列を有すると共に上記遺伝子産物をコードする DNA 分子を含み発現する細胞中に導入することを含む、方法に関する。上記操作された CRISPR / Cas9 システムは、任意の適切な方法を使用して細胞中に導入され得る。幾つかの実施形態において、上記導入は、培養物中の細胞に又は宿主生物中に本明細書に記載される操作された CRISPR / Cas9 システムを投与することを含み得る。

10

【0039】

操作された CRISPR / Cas9 システムを導入するための例示的な方法には、限定されるものではないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、及びウイルスベースの方法が含まれる。幾つかの場合には、1種以上の細胞内取り込み試薬は、トランスフェクション試薬である。トランスフェクション試薬には、例えばポリマーベース（例えば、DEAE デキストラン）のトランスフェクション試薬、及びカチオン性リポソーム媒介性トランスフェクション試薬が含まれる。エレクトロポレーション法はまた、核酸操作試薬の取り込みを促進するために使用され得る。外部場を印加することにより、細胞において膜内外電位差の変化が引き起こされ、膜内外電位差の正味の値（印加された電位差と静止電位差との合計）が閾値よりも大きい場合に、膜内に一過的な透過構造が生成されて、エレクトロポレーションが達成される（例えば、Gehl et al., *Acta Physiol. Scand.* 177:437-447 (2003) を参照のこと）。上記操作された CRISPR / Cas9 システムはまた、ウイルス形質導入を通じて細胞中に送達される。適切なウイルス送達システムには、限定されるものではないが、アデノ随伴ウイルス (AAV) 送達システム、レトロウイルス送達システム、及びレンチウイルス送達システムが含まれる。そのようなウイルス送達システムは、細胞がトランスフェクションされにくい場合に有益である。ウイルス媒介性送達システムを使用する方法は、核酸操作試薬をコードするウイルスベクターを準備する工程と、該ベクターをウイルス粒子中にパッケージングする工程とを更に含み得る。核酸試薬のその他の送達方法には、限定されるものではないが、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、パーティクルガン (biolistics)、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン又は脂質：核酸コンジュゲート、裸の DNA、人工的ビリオン、及び作用物質により向上された核酸の取り込みが含まれる (Neiwoehner et al., *Nucleic Acids Res.* 42:1341-1353 (2014)、並びに米国特許第 5,049,386 号、同第 4,946,787 号、及び同第 4,897,355 号も参照のこと、これらは全ての目的について、特に試薬送達システムに関連する全ての教示について引用することによりその全体が本出願の一部をなす）。幾つかの実施形態において、上記導入は、DNA プラスミド、RNA（例えば、本明細書に記載されるベクターの転写物）、裸の核酸、及びリポソーム等の送達運搬体と複合体化された核酸を含む非ウイルスベクター送達システムにより行われる。送達は、細胞（例えば、in vitro 投与又は ex vivo 投与）、又は標的組織（例えば、in vivo 投与）に対するものであり得る。

20

【0040】

核酸変化イベントを経た細胞（すなわち「変化された」細胞）は、任意の適切な方法を使用して単離され得る。幾つかの実施形態において、上記修復ヌクレオチド分子は、選択マーカーをコードする核酸を更に含む。これらの実施形態において、修復ヌクレオチド分子と宿主幹細胞ゲノムとの好結果の相同組み換えは、選択マーカーの組み込みも伴う。したがって、そのような実施形態において、変化された細胞の選択のためにポジティブマーカーが使用される。幾つかの実施形態において、上記選択マーカーは、ともすれば細胞を死滅させることとなる薬物の存在下で、該変化された細胞が生存することを可能にする。

30

40

50

そのような選択マーカーには、限定されるものではないが、ネオマイシン、ピューロマイシン、又はハイグロマイシンBへの耐性を授けるポジティブ選択マーカーが含まれる。さらに、選択マーカーは、同型の細胞の集団であって、その幾つかが該選択マーカーを含まない集団の中から変化された細胞を視覚的に同定することを可能にする製品であり得る。そのような選択マーカーの例には、限定されるものではないが、蛍光により可視化され得る緑色蛍光タンパク質 (GFP)、基質であるルシフェリンに曝されたときに発光により可視化され得るルシフェラーゼ遺伝子、及び基質と接触されたときに特徴的な色を生ずる - ガラクトシダーゼ (- gal) が含まれる。そのような選択マーカーは、当該技術分野でよく知られており、これらのマーカーをコードする核酸配列は市販されている（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 1989を参照のこと）。蛍光により可視化され得る選択マーカーを使用する方法は、蛍光活性化セルソーティング (FACS) 技術を使用して更にソーティングされ得る。単離された操作された細胞を使用して、移植のための細胞系統を樹立することができる。単離された変化された細胞を任意の適切な方法を使用して培養することで、安定な細胞系統を生成することができる。

【0041】

幾つかの実施形態において、上記操作されたCRISPR/Cas9システムは、(a)本明細書に記載される標的配列とハイブリダイズするsgRNAに作動的に連結された第1の調節エレメントと、(b)Cas9ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子に作動的に連結された第2の調節エレメントとを含み、その際、構成要素(a)及び構成要素(b)は、該システムの同じベクター又は異なるベクター上に位置しており、該sgRNAは、上記標的配列を標的とし、かつ上記Cas9ヌクレアーゼは、上記DNA分子を開裂する。上記標的配列は、PAMの5'末端に隣接する16個～25個のヌクレオチドに相補性のヌクレオチド配列であり得る。本明細書における「隣接」しているとは、参照部位の2ヌクレオチド又は3ヌクレオチドの範囲内であることを意味し、それは、直接隣接したヌクレオチド配列の間に介在ヌクレオチドが存在しないことを意味する「直接隣接」を含み、それらの直接隣接したヌクレオチド配列は互いに1ヌクレオチドの範囲内である。更なる実施形態において、上記細胞は、真核細胞、又は哺乳動物細胞若しくはヒト細胞であり、かつ上記調節エレメントは、真核性レギュレーターである。更なる実施形態において、上記細胞は、本明細書に記載される幹細胞である。幾つかの実施形態において、上記Cas9ヌクレアーゼは、真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。

【0042】

幾つかの実施形態において、上記第1の調節エレメントは、ポリメラーゼIIプロモーターである。幾つかの実施形態において、上記第2の調節エレメントは、ポリメラーゼIIプロモーターである。「調節エレメント」という用語は、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位 (IRES)、及びその他の発現制御エレメント（例えば、転写終結シグナル、例えばポリアデニル化シグナル、及びポリU配列）を含むと解釈される。そのような調節エレメントは、例えばGoeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。調節エレメントには、多くの種類の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的な発現を導く調節エレメント、及び或る特定の宿主細胞だけでヌクレオチド配列の発現を導く調節エレメント（例えば、組織特異的調節配列）が含まれる。組織特異的プロモーターは、主として、所望の対象組織、例えば筋肉、ニューロン、骨、皮膚、血液、特定臓器（例えば、肝臓、脾臓）、又は特定の細胞型（例えば、リンパ球）において発現に向けることができる。調節エレメントはまた、時間依存的な様式で、例えば細胞周期依存的又は発生段階依存的な様式で発現を導くこともでき、上記様式は、組織特異的又は細胞型特異的であってもそうでなくともよい。幾つかの実施形態において、ベクターは、1個以上のpol IIプロモーター（例えば、1個、2個、3個、4個、5個以上のpol IIプロモーター）、1個以上のpol IIプロモーター（例えば、1個、2個、3個、4個、5個以上のpol IIプロモーター）、1個以上のpol Iプロモーター（例えば、

10

20

30

40

50

1個、2個、3個、4個、5個以上のp o l I プロモーター)、又はそれらの組み合せを含む。p o l I I I プロモーターの例には、限定されるものではないが、U 6 プロモーター及びH 1 プロモーターが含まれる。p o l I I プロモーターの例には、限定されるものではないが、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルス(R S V) L T R プロモーター(任意に、R S V エンハンサーを伴う)、サイトメガロウイルス(C M V) プロモーター(任意に、C M V エンハンサーを伴う)(例えば、Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)を参照のこと)、S V 4 0 プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、-アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ(P G K) プロモーター、及びE F 1 プロモーターが含まれる。また「調節エレメント」という用語に含まれるのは、エンハンサーエレメント、例えばW P R E、C M V エンハンサー、H T L V - I のL T R 中のR - U 5' セグメント(Mol. Cell. Biol., Vol. 8(1), p. 466-472, 1988)、S V 4 0 エンハンサー、及びウサギ-グロブリンのエキソン2とエキソン3との間のイントロン配列(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 78(3), p. 1527-31, 1981)である。

【0043】

幾つかの実施形態において、本明細書に示されるC a s 9 ヌクレアーゼは、時間依存的又は細胞型依存的な様式で発現に最適化されたC a s 9 ヌクレアーゼを誘導可能であり得る。第1の調節エレメントは、限定されるものではないが、テトラサイクリン誘導性プロモーター、メタロチオネインプロモーター、テトラサイクリン誘導性プロモーター、メチオニン誘導性プロモーター(例えば、M E T 2 5 プロモーター、M E T 3 プロモーター)及びガラクトース誘導性プロモーター(G A L 1 プロモーター、G A L 7 プロモーター、及びG A L 1 0 プロモーター)を含むC a s 9 ヌクレアーゼに結合され得る誘導性プロモーターであり得る。その他の適切なプロモーターには、A D H 1 及びA D H 2 アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター(グルコース中で抑制され、グルコースが排出されてエタノールが作られたときに誘導される)、C U P 1 メタロチオネインプロモーター(C u²⁺、Z n²⁺ の存在下で誘導される)、P H O 5 プロモーター、C Y C 1 プロモーター、H I S 3 プロモーター、P G K プロモーター、G A P D H プロモーター、A D C 1 プロモーター、T R P 1 プロモーター、U R A 3 プロモーター、L E U 2 プロモーター、E N O プロモーター、T P 1 プロモーター、及びA O X 1 プロモーターが含まれる。

【0044】

当業者によれば、発現ベクターのデザインは、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望の発現のレベル等のような要因に依存し得ると理解されるであろう。ベクターを宿主細胞中に導入することにより、本明細書に記載される核酸によりコードされる転写物、融合タンパク質又はペプチドを含むタンパク質又はペプチド(例えば、クラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドロームリピート(C R I S P R)転写物、タンパク質、酵素、その突然変異体形、その融合タンパク質等)が産生され得る。

【0045】

「ベクター」という用語は、結合された別の核酸を輸送することを可能にする核酸分子を指す。ベクターには、限定されるものではないが、一本鎖、二本鎖、又は部分的二本鎖である核酸分子、1つ以上の開放端を有する、開放端を有しない(例えば、環状)核酸分子、D N A、R N A、又は両方を含む核酸分子、及び当該技術分野で既知のその他の多様なポリヌクレオチドが含まれる。ベクターの1つの種類は「プラスミド」であり、それは、更なるD N Aセグメントが、例えば標準的な分子クローニング技術により挿入され得る環状の二本鎖D N A環を指す。ベクターのもう1つの種類はウイルスベクターであり、その際、ウイルス由来のD N A配列又はR N A配列はウイルス(例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、及びアデノ隨伴ウイルス)中へのパッケージングのためにベクター中に存在する。ウイルスベクターはまた、宿主細胞中へのトランスフェクションのためにウイルスにより保有されるポリヌクレオチドを含む。或る特定のベクターは、導入される宿主細胞中で自己複製が可能である(例えば、細菌性複製起点を有する細菌ベクター、及びエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞中への導入に際し

10

20

30

40

50

て宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それにより宿主ゲノムと一緒に複製される。さらにも、或る特定のベクターは、作動的に連結される遺伝子の発現を導くことが可能である。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。組み換えDNA技術において利用される通常の発現ベクターは、しばしばプラスミドの形で存在する。組み換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞中での該核酸の発現のために適した形で含み得る、つまり、該組み換え発現ベクターは、発現のために使用されるべき宿主細胞に基づいて選択され得る、すなわち発現されるべき核酸配列に作動的に連結されている1つ以上の調節エレメントを含む。組み換え発現ベクターの範囲内で「作動的に連結される」は、対象ヌクレオチド配列が1つ以上の調節エレメントへと(例えば、in vitro 転写/翻訳システムにおける、又は該ベクターが宿主細胞中に導入される場合には宿主細胞における)、該ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で連結されていることを意味すると解釈される。有利なベクターには、レンチウイルス及びアデノ隨伴ウイルスが含まれ、そのようなベクターの種類は、特定の種類の細胞を標的とするように選択することができる。

10

【0046】

別の態様において、本開示は、被験体における遺伝子突然変異又は一塩基多型(SNP)と関連する疾患を予防、改善、又は治療する方法であって、上記被験体の遺伝子産物の発現を上記の方法により変化させることを含み、上記DNA分子が、突然変異配列又はSNP突然変異配列を含む、方法に関する。

20

【0047】

別の態様において、本開示は、被験体における遺伝子突然変異又はSNPと関連する角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療する方法に関する。該方法で治療され得る被験体には、限定されるものではないが、哺乳動物被験体、例えばマウス、ラット、イヌ、ヒヒ、ブタ、又はヒトが含まれる。幾つかの実施形態において、該被験体はヒトである。該方法は、少なくとも1年、2年、3年、5年、10年、15年、20年、25年、30年、35年、40年、45年、50年、55年、60年、65年、70年、75年、80年、85年、90年、95年、又は100年の年齢の被験体を治療するために使用され得る。幾つかの実施形態において、該被験体は、少なくとも1つ、2つ、3つ、又は4つの角膜ジストロフィーのために処置される。例えば、単独又は多重のc r RNA又はs g RNAが、單一又は多重の角膜ジストロフィーと関連する複数の突然変異部位若しくはSNP部位で、又は祖先型の突然変異部位若しくはSNP部位でヌクレオチドを変化させるようにデザインされ得る。

30

【0048】

本明細書で使用される場合に「角膜ジストロフィー」は、眼の外層(角膜)中の遺伝病の群のいずれか1つを指す。例えば、角膜ジストロフィーは、角膜中の物質の両眼の異常沈着により特徴付けられ得る。角膜ジストロフィーには、限定されるものではないが、角膜ジストロフィーの以下の4つのI C 3 D カテゴリー(例えば、Weiss et al., Cornea 34(2): 117-59 (2015)を参照のこと):上皮及び上皮下ジストロフィー、上皮-実質T G F I ジストロフィー、実質ジストロフィー、並びに内皮ジストロフィーが含まれる。幾つかの実施形態において、上記角膜ジストロフィーは、上皮基底膜ジストロフィー(E B M D)、メースマン角膜ジストロフィー(M E C D)、ティール-ペーンケ角膜ジストロフィー(T B C D)、格子状角膜ジストロフィー(L C D)、顆粒状角膜ジストロフィー(G C D)、及びシュナイダー角膜ジストロフィー(S C D)からなる群から選択される。更なる実施形態において、本明細書における角膜ジストロフィーは、M E C Dを除く。

40

【0049】

更なる実施形態において、上記角膜ジストロフィーは、SNPを含む1つ以上の突然変異により引き起こされ、上記SNPは、トランスフォーミング成長因子誘導(T G F B I)、ケラチン3(K R T 3)、ケラチン12(K R T 1 2)、G S N、及びU b i A プレニルトランスフェラーゼドメイン含有タンパク質1(U B I A D 1)からなる群から選

50

択される遺伝子中に位置している。更なる実施形態において、上記突然変異部位又は上記 SNP 部位は、本明細書に示される突然変異タンパク質中の突然変異アミノ酸のコード化をもたらす。更なる実施形態において、上記突然変異部位又は上記 SNP 部位を含む突然変異配列は、(i) 例えばタンパク質アクセッショングループ番号 Q15582 の TGFB1 における Leu509Arg、Arg666Ser、Gly623Asp、Arg555Gln、Arg124Cys、Val505Asp、Ile522Asn、Leu569Arg、His572Arg、Arg496Trp、Pro501Thr、Arg514Pro、Phe515Leu、Leu518Pro、Leu518Arg、Leu527Arg、Thr538Pro、Thr538Arg、Val539Asp、Phe540Del、Phe540Ser、Asn544Ser、Ala546Thr、Ala546Asp、Phe547Ser、Pro551Gln、Leu558Pro、His572Del、Gly594Val、Val613Del、Val613Gly、Met619Lys、Ala620Asp、Asn622His、Asn622Lys、Asn622Lys、Gly623Arg、Gly623Asp、Val624_Val625Del、Val624Met、Val625Asp、His626Arg、His626Pro、Val627SerfsX44、Thr629_Asn630insAsnValPro、Val631Asp、Arg666Ser、Arg555Trp、Arg124Ser、Asp123Delins、Arg124His、Arg124Leu、Leu509Pro、Leu103_Ser104Del、Val113Ile、Asp123His、Arg124Leu、及び/又は Thr125_Glu126Del に相当する突然変異を含む突然変異 TGFB1 タンパク質、(ii) 例えばタンパク質アクセッショングループ番号 P12035 又は NP_476429.2 のケラチン3タンパク質における Glu498Val、Arg503Pro、及び/又は Glu509Lys に相当する突然変異を含む突然変異 KRT3 タンパク質、(iii) 例えばタンパク質アクセッショングループ番号 Q99456.1 又は NP_000214.1 の KRT12 における Met129Thr、Met129Val、Gln130Pro、Leu132Pro、Leu132Val、Leu132His、Asn133Lys、Arg135Gly、Arg135Ile、Arg135Thr、Arg135Ser、Ala137Pro、Leu140Arg、Val143Leu、Val143Leu、Leu391_Leu399Dup、Ile426Val、Ile426Ser、Tyr429Asp、Tyr429Cys、Arg430Pro、及び/又は Leu433Arg を有する突然変異 KRT12 タンパク質、(iv) 例えばタンパク質アクセッショングループ番号 P06396 の GSN における Asp214Tyr を有する突然変異 GSNT タンパク質、並びに(v) 例えばタンパク質アクセッショングループ番号 Q9Y5Z9 の UBIAD1 における Ala97Thr、Gly98Ser、Asn102Ser、Asp112Asn、Asp112Gly、Asp118Gly、Arg119Gly、Leu121Val、Leu121Phe、Val122Glu、Val122Gly、Ser171Pro、Tyr174Cys、Thr175Ile、Gly177Arg、Lys181Arg、Gly186Arg、Leu188His、Asn232Ser、Asn233His、Asp236Glu、及び/又は Asp240Asn に相当する突然変異を含む突然変異 UBIAD1 タンパク質からなる群から選択される突然変異タンパク質をコードする。例えば、上記突然変異部位又は上記 SNP 部位を含む突然変異配列は、タンパク質アクセッショングループ番号 Q15582 のアミノ酸位置 509 に相当するアミノ酸位置で Leu を Arg で置き換えることにより突然変異された突然変異 TGFB1 タンパク質の少なくとも一部分をコードする。この場合に、上記突然変異部位又は上記 SNP 部位での突然変異は、タンパク質アクセッショングループ番号 Q15582 のアミノ酸位置 509 に相当するアミノ酸位置での突然変異アミノ酸のコード化の原因であり得る。本明細書で使用される場合に、ヒトタンパク質における特定の突然変異「に相当する」突然変異は、ヒトタンパク質の特定の突然変異の相応の部位に存在する異なる種における突然変異を含み得る。また本明細書で使用される場合に、突然変異タンパク質が、例えば Leu509Arg の特定の突然変異を含むと記載される場合に、そのような突然変異タンパ

10

20

30

40

50

ク質は、関連のヒトタンパク質、例えば本明細書に記載されるタンパク質アクセッショングループ番号Q15582のTGFBIタンパク質における特定の突然変異に相当する突然変異部位に存在する任意の突然変異を含み得る。

【0050】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載される突然変異は、KRT12タンパク質におけるあらゆる突然変異を除く。幾つかの実施形態において、本明細書に記載される突然変異は、例えばタンパク質アクセッショングループ番号Q99456.1のKRT12におけるLeu132Proに相当する突然変異を除く。更なる実施形態において、本明細書に記載される突然変異又はSNPは、KRT12遺伝子中に存在するあらゆるSNPを除く。なお更なる実施形態において、本明細書に記載される突然変異又はSNPは、KRT12タンパク質におけるLeu132Pro突然変異をもたらすあらゆるSNPを除く。上記突然変異又は上記SNPは、KRT12タンパク質におけるLeu132Pro突然変異をもたらすPAM部位でのSNP(AAG>AGG)を更に除き得る。

10

【0051】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載されるCRISP/Cas9システム及び該システムを使用する方法は、複数のSNP部位又は祖先型SNPでの突然変異配列を変化させ得る。そのような方法は、図15～図16に示されるように隣接PAMを利用することとなる。更なる実施形態において、本明細書に記載される突然変異配列は、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、又はそれより多くのSNP部位を含み得て、かつ本明細書に記載される方法は、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、又はそれより多くの上記SNP部位に関連する遺伝子産物の発現を変化させる。例えば、本明細書に記載される方法は、突然変異TGFBIタンパク質の発現をR514P及びL518Rの両方で変化させ得るか、又はKRT12タンパク質の発現をR135T及びL132Pの両方で変化させ得る。幾つかの実施形態において、sgRNAは、突然変異アレルに特異的なPAM部位に隣接するsgRNAと並行して、野生型アレル及び突然変異アレルの両方に共通の隣接イントロン中に位置するPAM部位に隣接する標的配列を含み得る。

20

【0052】

ヒトゲノムは本来、二倍体であり、男性のX染色体及びY染色体を除く全ての染色体は、一方が男性から、そして一方は女性から対として遺伝される。数千塩基対より大きな連続的なDNA配列の範囲を調べる場合に、遺伝形質の決定はこれらのDNAの区画がどちらの親に由来するかを理解するために非常に重要である。さらに、殆どのSNPは、ヒトゲノム内でヘテロ接合体として、すなわち男性又は女性のいずれか一方から遺伝されて存在する。より長い配列を読むシーケンシング技術は、ハプロタイプ判定済みゲノム配列を生成する試み、すなわちハプロタイプフェーディングにおいて利用されている。したがって、50kbより長いDNAの特定の範囲のゲノム配列を調査する場合に、ハプロタイプフェーディングによる配列分析は、対合染色体のどちらが対象配列を有するかを決定するために利用され得る。より長いフェーディングシーケンスのリードは、対象SNPが本明細書に記載されるCRISP/Cas9遺伝子編集システムのための標的として適切であるかどうかを決定するために使用され得る。

30

【0053】

1つの態様において、本明細書に記載される方法は、病理性突然変異又はSNPのどちらか一方の側での標的可能な突然変異又はSNPを特定して、病理性突然変異又はSNPをサイレンシングさせることを含む。幾つかの実施形態において、フェーディングシーケンス実験においてDNAの区画が特定される。幾つかの実施形態において、対象の突然変異又はSNPは、CRISP/Cas9システムのための適切な基質ではなく、CRISP/Cas9開裂のために適した病理性突然変異又はSNPの両方の側での突然変異又はSNPの特定は、該病理性突然変異又は該SNPを含むDNAの区画の除去を可能にする。幾つかの実施形態において、リードの長さを増やすことで、より長い連続的なリードを得ることができ、Weisenfeld NI, Kumar V, Shah P, Church DM, Jaffe DB. Direct determination of diploid genome sequences. *Genome research.* 2017; 27(5):757-767 (

40

50

これは引用することによりその全体が本出願の一部をなす)に記載の技術を使用することによりハプロタイプフェージングされたゲノムを得ることができる。

【0054】

本明細書に示される方法の幾つかの実施形態において、疾患又は状態(例えば、角膜ジストロフィー)に関して肯定的な治療応答をもたらすために治療が用いられる。「肯定的な治療応答」とは、疾患若しくは状態における改善、及び/又は該疾患若しくは状態と関連する症状における改善と解釈される。主題の治疗方法の治療効果は、任意の適切な方法を使用して評価され得る。幾つかの実施形態において、角膜でのタンパク質沈着を伴う角膜ジストロフィーの場合には、治療は、治療後の被験体の角膜におけるタンパク質沈着の、コントロール(例えば、治療前のタンパク質沈着の量)と比較した低下により評価される。或る特定の実施形態において、主題の方法は、被験体における角膜タンパク質沈着の量を、治療を受ける前の角膜と比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%だけ減少させる。角膜混濁も、主題の方法を使用した治療効果を評価するために使用することができる。さらに、幾つかの実施形態において、治療は視覚機能により評価される。被験体における視覚機能の評価は、限定されるものではないが、裸眼視力(UCVA)、最良矯正視力(BCVA)、及び輝度視力試験(BAT)の評価を含む当該技術分野で既知の任意の適切な試験を使用して実施することができる(例えば、Awaad et al., Am J Ophthalmol. 145(4): 656-661 (2008)、及びSharhan et al., Br J Ophthalmol 84:837-841 (2000)を参照のこと、これらは全ての目的について、特に視力評価のための標準に関連する全ての教示について引用することによりその全体が本出願の一部をなす)。或る特定の実施形態において、被験体の視力は、治療を受ける前と比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%だけ改善する。

10

20

30

40

50

【0055】

幾つかの実施形態において、被験体におけるSNPと関連する角膜ジストロフィーを予防、改善、又は治療する方法は、該被験体に、有効量の本明細書に記載される操作されたCRISPR/Cas9システムを投与することを含み得る。「有効量」又は「治療的有効量」という用語は、有益な効果又は所望の効果をもたらすのに十分な作用物質の量を指す。治療的有効量は、治療される被験体及び疾患状態、被験体の体重及び年齢、疾患状態の重症度、投与方式等の1つ以上に依存して変動し得て、その量は当業者により容易に決定され得る。その用語は、本明細書に記載されるイメージング法のいずれか1つによる検出のためのイメージをもたらす用量にも該当する。具体的な用量は、選択される特定の作用物質、従うべき投薬計画、その他の化合物と組み合わせて投与されるか否か、投与のタイミング、イメージングされるべき組織、及び特定の作用物質を運搬する物理的送達システムの1つ以上に依存して変動し得る。

【0056】

本明細書に記載される操作されたCRISPR/Cas9システムは、(i)本明細書に記載されるCas9ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子と、(ii)本明細書に記載されるsgRNAとを含む少なくとも1つのベクターを含み得る。上記sgRNAは、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の5'末端に隣接する標的配列を含み得る、及び/又はPAMの5'末端に隣接する第2の標的配列に相補性の第1の標的配列にハイブリダイズし得る。幾つかの実施形態において、上記標的配列又は上記PAMは、SNP部位を含む。幾つかの実施形態において、上記Cas9ヌクレアーゼ及び上記sgRNAは、天然には一緒に存在しないものである。幾つかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼによるDNA開裂は、ガイドRNA分子と標的DNAとの間の配列特異的アニーリングに加えて、ガイドRNA結合部位の3'のすぐそばにあるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の存在を必要とする。このPAM部位の配列は、使用されるCas9ヌクレアーゼに特異的である。更なる実施形態において、上記PAMは、上記SNP部位を

含む。なおも更なる実施形態において、上記PAMは、NGG及びNNGRRT（Nは、A、T、G、及びCのいずれかであり、かつRは、A又はGである）からなる群から選択されるPAMからなる。更なる実施形態において、上記投与は、上記操作されたCRISP/RCas9システムを上記被験体の角膜（例えば、角膜実質）中に注射することにより、及び/又は上記操作されたCRISPR/Cas9システムを、上記標的配列を有するDNA分子を含み発現する細胞中に導入することにより、上記操作されたCRISPR/Cas9システムを上記被験体の角膜（例えば、角膜実質）中に導入することを含む。

【0057】

別の態様において、本開示は、角膜ジストロフィーの治療を必要とする被験体における角膜ジストロフィーを治療する方法であって、（a）上記被験体から角膜ジストロフィー標的核酸中に核酸突然変異を含む複数の幹細胞を取得することと、（b）上記複数の幹細胞の1つ以上の幹細胞中の核酸突然変異を操作することで上記核酸突然変異を修正し、それにより1つ以上の操作された幹細胞を形成させることと、（c）上記1つ以上の操作された幹細胞を単離することと、（d）上記1つ以上の操作された幹細胞を上記被験体中に移植することとを含み、上記複数の幹細胞の1つ以上の幹細胞中の核酸突然変異を操作することが、本明細書に記載される遺伝子産物の発現を変化させる方法、又は被験体におけるSNPと関連する疾患を予防、改善、若しくは治療する方法のいずれかを実施することを含む、方法に関する。

10

【0058】

主題の方法は、複数の幹細胞を取得することを含み得る。任意の適切な幹細胞は、治療されるべき角膜ジストロフィーの種類に応じて、主題の方法のために使用され得る。或る特定の実施形態において、上記幹細胞は、異種ドナーから取得される。そのような実施形態において、異種ドナーの幹細胞及び治療される被験体は、ドナー-レシピエント組織適合性である。或る特定の実施形態において、自己幹細胞は、角膜ジストロフィーのための治療の必要がある患者から取得される。取得された幹細胞は、治療されるべき特定の角膜ジストロフィーと関連する遺伝子中に突然変異を有する（例えば、上述のように上皮-実質ジストロフィーを伴う被験体のTGFBI中に突然変異を有する幹細胞）。適切な幹細胞には、限定されるものではないが、歯髄幹細胞、毛包幹細胞、間葉系幹細胞、臍帯内膜幹細胞、胚性幹細胞、口腔粘膜上皮幹細胞、及び縁上皮幹細胞が含まれる。

20

【0059】

幾つかの実施形態において、複数の幹細胞は、縁上皮幹細胞を含む。縁上皮幹細胞（LESC）は、角膜の輪部領域に位置しており、角膜表面の保全及び修復の役割を果たす。何らかの特定の動作原理に縛られるものではないが、LESCは、幹細胞プールを再生するための幹細胞ニッチに残る幹細胞と早期に一過的に増幅する娘細胞（eTAC）とを生成する非対称細胞分裂を経ると考えられる。このより分化されたeTACは、幹細胞ニッチから除去され分裂することで、更に一過的に増幅する細胞（TAC）が生成され得て、こうして最後には最終分化細胞（DC）がもたされる。LESCは、例えば被験体の眼から生検試料を採取することにより取得することができる（例えば、Pellegrini et al., Lancet 349: 990-993 (1997)を参照のこと）。輪部生検試料から取得されたLESCは、主題の方法において使用するために、限定されるものではないが、蛍光活性化セルソーティング（FACS）及び遠心分離技術を含む任意の適切な技術を使用して単離及びソーティングすることができる。LESCは、幹細胞関連マーカーの陽性発現及び分化マーカーのネガティブな発現を使用して生検試料からソーティングされ得る。ポジティブな幹細胞マーカーには、限定されるものではないが、転写因子p63、ABC-G2、C/EBP、及びBmi-1が含まれる。ネガティブな角膜特異的マーカーには、限定されるものではないが、サイトケラチン3（CK3）、サイトケラチン12（CK12）、コネキシン43、及びインボルクリンが含まれる。幾つかの実施形態において、複数の幹細胞は、p63、ABC-G2、又はそれらの組み合わせの発現についてポジティブである。或る特定の実施形態において、複数の幹細胞中の細胞の少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%

30

40

50

%、96%、97%、98%、又は99%は、p63、ABC G2、C/EBP、及びBmi-1、又はそれらの組み合わせを発現する。幾つかの実施形態において、複数の幹細胞は、CK3、CK12、コネキシン43、インポルクリン、又はそれらの組み合わせの発現についてネガティブである。或る特定の実施形態において、複数の幹細胞中の細胞の少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%は、CK12、コネキシン43、インポルクリン、又はそれらの組み合わせを発現しない。LES Cのために有用なその他のマーカーは、例えばTakacs et al., Cytometry A 75: 54-66 (2009) (これは全ての目的について、特にLES Cマーカーに関連する全ての教示について引用することによりその全体が本出願の一部をなす)に記載されている。細胞サイズ及び高い核対細胞質比率等の幹細胞の特徴は、LES Cの同定における補助のために使用することもできる。
10

【0060】

LES Cの他に、被験体の角膜から単離されたその他の幹細胞を、主題の方法で使用することもできる。例示的な角膜幹細胞には、限定されるものではないが、実質幹細胞、実質線維芽様細胞、実質間葉系細胞、神経堤由来の角膜幹細胞、及び推定内皮幹細胞が含まれる。

【0061】

幾つかの実施形態において、主題の方法で使用される細胞は、被験体の角膜から単離される実質幹細胞である。実質幹細胞は、限定されるものではないが、Funderburgh et al., FASEB J 19: 1371-1373 (2005)、Yoshida et al., Invest Ophtalmol Vis Sci 46: 1653-1658 (2005)、Du et al. Stem Cells 1266-1275 (2005)、Dravida et al., Brain Res Dev Brain Res 160:239-251 (2005)、及びPolisetty et al. Mol Vis 14: 431-442 (2008) (これらは全ての目的について、特に様々な実質幹細胞の単離及び培養に関連する全ての教示について引用することによりその全体が本出願の一部をなす)に記載される方法を含む任意の適切な方法を使用して単離され得る。

【0062】

これらの実質幹細胞に特徴的なマーカーには、限定されるものではないが、Bmi-1、Kit、Notch-1、Six2、Pax6、ABC G2、Spag10、及びp62/OSILが含まれる。幾つかの実施形態において、複数の幹細胞中の細胞の少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%は、Bmi-1、Kit、Notch-1、Six2、Pax6、ABC G2、Spag10、若しくはp62/OSIL、又はそれらの組み合わせを発現する。或る特定の実施形態において、上記実質幹細胞は、CD31、SSEA-4、CD73、CD105について陽性であり、かつCD34、CD45、CD123、CD133、CD14、CD106、及びHLA-DRについて陰性である。或る特定の実施形態において、複数の幹細胞中の細胞の少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%は、CD31、SSEA-4、CD73、CD105について陽性であり、かつCD34、CD45、CD123、CD133、CD14、CD106、及びHLA-DRについて陰性である。なお他の実施形態において、上記実質幹細胞は、CD105、CD106、CD54、CD166、CD90、CD29、CD71、Pax6について陽性であり、かつSSEA-1、Tra1-81、Tra1-61、CD31、CD45、CD11a、CD11c、CD14、CD138、Flk1、Flt1、及びVE-カドヘリンについて陰性である。或る特定の実施形態において、複数の幹細胞中の細胞の少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%は、CD105、CD106、CD54、CD166、CD90、CD29、CD71、Pax6について陽性であり、かつSSEA-1、Tra1-81、Tra1-61、CD31、CD45、

20

30

30

40

50

CD11a、CD11c、CD14、CD138、FLK1、FLT1、及びVE-カドヘリンについて陰性である。

【0063】

或る特定の実施形態において、主題の方法で使用される細胞は、被験体の角膜から単離される内皮幹細胞である。そのような幹細胞の単離方法は、例えばEngelmann et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 29: 1656-1662 (1988) (これは全ての目的について、特に角膜内皮幹細胞の単離及び培養に関連する全ての教示について引用することによりその全体が本出願の一部をなす)に記載されている。

【0064】

単離後に、複数の幹細胞(例えば、LESC)を任意の適切な方法を使用して培養することで、安定な細胞系統を作製することができる。例えば、培養は、フィーダー細胞としての線維芽細胞(例えば、3T3)の存在又は不存在下で維持することができる。その他の場合には、ヒト羊膜上皮細胞又はヒト胚性線維芽細胞が、培養のためのフィーダー層として使用される。LESCの培養のために適切な技術はさらに、Takacs et al. Cytometry A 75: 54-66 (2009), Shortt et al., Surv Ophthalmol Vis Sci 52: 483-502 (2007)、及びCauchi et al. Am J Ophthalmol 146: 251-259 (2008) (これらは全ての目的について、特にLESCの培養に関連する全ての教示について引用することによりその全体が本出願の一部をなす)に記載されている。

10

【0065】

複数の幹細胞の単離後に、複数の幹細胞における1つ以上の幹細胞中の核酸突然変異を、本明細書に記載される方法により操作する又は変化させることで、角膜ジストロフィー標的核酸中の核酸突然変異が修正される。本明細書で使用される場合に「角膜ジストロフィー標的核酸」は、本明細書に記載される角膜ジストロフィーの1つ以上と関連する突然変異を含む核酸を指す。

20

【0066】

操作されるべき幹細胞には、個々の単離された幹細胞、又は該単離された幹細胞から樹立された幹細胞系統からの幹細胞が含まれる。任意の適切な遺伝子操作法は、幹細胞における核酸突然変異を修正するために使用され得る。

【0067】

別の態様において、角膜ジストロフィーの治療のためのCRISPR/Cas9システムを含むキットが、本明細書において提供される。幾つかの実施形態において、上記キットは、本明細書に記載される1つ以上のsgRNA、Cas9ヌクレアーゼ、及び本明細書に記載されるように修復されるべき突然変異の野生型アレルを含む修復ヌクレオチド分子を含む。幾つかの実施形態において、上記キットはまた、細胞による核酸操作(nucleic acid manipulation)の取り込みを促進する作用物質、例えばトランスフェクション剤、又はエレクトロポレーションバッファーを含む。幾つかの実施形態において、本明細書で提供される主題のキットは、幹細胞の検出又は単離のための1種以上の試薬、例えばFACSと一緒に使用され得る1種以上のポジティブな幹細胞マーカーのための標識された抗体を含む。

30

【0068】

別の態様において、本開示は、病原因性突然変異又はSNPをサイレンシングするための、例えば角膜ジストロフィーの予防、改善、又は治療のための、sgRNA対、及びCRISPR/Cas9システムのための少なくとも2種のsgRNAを含むsgRNA対を含むキットに関する。幾つかの実施形態において、上記sgRNA対は、TGFBI遺伝子における病原因性突然変異又はSNPをサイレンシングするためのsgRNA対である。該sgRNA対は、TGFBI遺伝子における、例えばイントロン中の病原因性突然変異又はSNPとシスにある祖先型突然変異又はSNPを生成するPAMのためのガイド配列を含むsgRNAを含む。更なる実施形態において、上記sgRNA対は、TGFBI遺伝子のイントロン領域に祖先型SNPを生成するPAMのための共通のガイド配列を含むsgRNAを含む。

40

50

【0069】

幾つかの実施形態において、本開示は、C R I S P R / C a s 9 システムのためにデザインされた s g R N A 対であって、(i) (a) 病因性突然変異又は S N P の 3' 末端側にシスにある第 1 のプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) を生成する突然変異又は一塩基多型 (S N P) のための第 1 の c r R N A 配列と、(b) t r a c r R N A 配列とを含み、該第 1 の c r R N A 配列及び該 t r a c r R N A 配列は、天然には一緒に存在しないものである、第 1 の s g R N A と、(i i) (a) 病因性突然変異又は S N P の 5' 末端側にシスにある第 2 の P A M を生成する突然変異又は S N P のための第 2 の c r R N A ガイド配列と、(b) t r a c r R N A 配列とを含み、該第 2 の c r R N A 配列及び該 t r a c r R N A 配列は、天然には一緒に存在しないものである、第 2 の s g R N A とを含む、s g R N A 対に関する。 10

【0070】

更なる実施形態において、上記 C R I S P R / C a s 9 システムは、角膜ジストロフィーの予防、改善、又は治療のためのシステムである。上記 P A M を生成する突然変異又は S N P は、T G F B I 遺伝子中に存在することができる。更なる実施形態において、上記 P A M を生成する突然変異又は S N P は、T G F B I 遺伝子のイントロン中に存在する。なお更なる実施形態において、上記第 1 の c r R N A 配列及び上記第 2 の c r R N A 配列の少なくとも 1 つは、図 19 ~ 図 35 に列挙される配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み、及び / 又は上記第 1 の c r R N A 配列及び上記第 2 の c r R N A 配列の少なくとも 1 つは、表 2 に列挙される配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。 20

【実施例】

【0071】

以下の実施例は、本発明の様々な実施形態を説明するために表される。そのような実施例は、排他的な実施形態を表さず、かつ排他的な実施形態を表すと解釈されないものと理解され、そのような実施例は、本発明の実施を単に説明する目的を果たすものである。

【0072】

突然変異解析：様々な角膜ジストロフィーと関連する突然変異を解析して、どれが単独でミスセンス突然変異又はインフレームインデルであるかを決定した。この解析は、K 1 2 及び T G F B I 疾患の大部分について、ナンセンス突然変異又はフレームシフトを起こすインデル突然変異が疾患と関連しないことを指摘している。さらに、エクソーム変異体データベースの解析により、これらの遺伝子中に見られるあらゆる天然に存在するナンセンス突然変異、フレームシフトを起こすインデル突然変異、又はスプライス部位突然変異が、これらの個体における疾患と関連すると報告されないことが確認された。 30

【0073】

突然変異解析により、以下の角膜ジストロフィー遺伝子が、標的ヌクレアーゼ遺伝子治療のために適していることが明らかになった（表 1）。

【0074】

【表1】

表1：C R I S P R / C a s 9 介在型アプローチのために適した遺伝子及びそれらの関連の角膜ジストロフィー

遺伝子	関連する角膜ジストロフィー
TGFB1	アベリノ角膜ジストロフィー
	ライス-ビュックラース角膜ジストロフィー
	ティールーベーンケ角膜ジストロフィー
	グレイソーン-ウィルブラント角膜ジストロフィー
	格子状角膜ジストロフィー I 及び I I
	顆粒状角膜ジストロフィー I 、 I I 、及び I I I
	角膜上皮基底膜変性症
KRT3	メースマン角膜ジストロフィー
KRT12	メースマン角膜ジストロフィー
UBIAD1	シュナイダー角膜ジストロフィー

【0075】

適切な角膜ジストロフィー遺伝子の調査をこの報告のために実施して、P A M 特異的アプローチ又はガイドアレル特異的アプローチのいずれかにより標的化可能な突然変異の数を調べた。P A M 特異的アプローチは、新規P A M の生成のために病理性S N P を必要とするが、アレル特異的アプローチは、病理性S N P を含むガイドのデザインを要する。10 %より大きいマイナーアレル頻度 (M A F) を有する新規P A M を生成するT G F B I 中の全ての非病理性S N P を特定し、Benchlingのオンラインゲノム編集デザインツールにより解析した。10 %より大きいM A F を有するS N P の選択は、新規P A M を生ずるS N P が、病理性突然変異とシスに見られる十分な機会を提供し得る。病理性突然変異と「シスにある」とは、病理性突然変異と同じD N A 又は染色体の分子上にあることを指す。新規P A M を生ずるS N P は、例えばT G F B I 遺伝子中のイントロン又はエキソン中に、病理性突然変異とシスに存在し得る。T G F B I 内の全ての変異体を解析して、新規P A M が作製されたかどうかを調べた(表2)。

【0076】

10

20

30

【表2】

0.3	0.3	0.32	A/G	ATTATA TAGAAGA AAGGAA	+
A: 70%	A: 70%	C: 32% G:	G:30%		
A: 70%	A: 70%	C: 3% G:	G:30%		
A: 67%	A: 67%	C: 45% G:	G:33%		
A: 63%	A: 63%	C: 45% G:	G:33%		
A: 60%	A: 60%	C: 40% G:	G:37%		
A: 40%	A: 40%	C: 40% G:	G:37%		
A: 41%	A: 41%	C: 40% G:	G:37%		
0.41	0.41	0.41	A/G	ATTATA TAGAAGA AAGGAA	+
136043042 ~ 136043142	rs380 5700	rs380 5700	A/G	ATTATA TAGAAGA AAGGAA	+
136044058	136044122				
136044123	136046334				
136046335	136046495				
136046496	136046850				
136046851	136047015				
136047016	136047273				
136047274	136047420	rs144 2	G/C	TTGCATG GGGTGCG GCTTC	-
136047420	136047350		CCT		
136047421	136049438	rs764 567	A/G	CCGGT GGGAAC ATAGAG	
136047421	136049438	rs764 567	A/G	CTCCTGT AGGGAA CATAGA	
136047421	136047489	rs764 567	A/G	CCGGT GGGAAC ATAGAG	
136047489	136047589	rs764 567	A/G	CTCCTGT AGGGAA CATAGA	

図15に示されるように、TGFBI内の変異体の位置は、殆どのSNPではイントロン中にクラスターが形成されている。このように、エキソン11、エキソン12、及びエキソン14中のホットスポットに位置する多数のTGFBI突然変異は、このアプローチを使用して同時に標的化され得る。したがって、CRISPR/Cas9システムは、突然変異を有する2人以上の患者又は1つの家系を標的化することができる。このようにデザインされた1つのCRISPR/Cas9システムは、種々のTGFBI突然変異を治療するために使用することができる。上記CRISPR/Cas9システムは、突然変異アレルに特異的なPAM部位に隣接するsgRNAと並行して、野生型アレル及び突然変異アレルの両方に共通の隣接イントロン中に位置するPAM部位に隣接するsgRNAを使用することができる(図16)。これにより、機能的効果を有しないとされる野生型アレルのイントロン中のNHEJがもたらされることとなり、突然変異アレルにおいて、2つの切断部位間にDNAを含む欠失がもたらされることとなる。この技術は、適切なSNPプロファイルを有する患者から単離された白血球において裏付けられる。

10

【0078】

構築物：Cas9及びsgRNAを発現する3種のプラスミドを使用した。使用される非標的化プラスミドは、pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)(ブロード研究所、MIT、Addgeneプラスミド48139、図7)であった。発表されたプロトコル(Ran FA, et al., Nat Protoc 2013; 8: 2281-2308)に従って、K12-L132Pアレルに特異的なsgRNAを含むプラスミドを、アニーリング並びに以下の2つのプライマー(Life Technologies社、英国、ペイズリー)：5' - CACCGTA 20 GGAAGCTAATCTATCATT-3' 及び 5' - AAACAAATGATAGAT TAGCTTCCTAC-3'をpSpCas9(BB)-2A-Puro中にクローニングすることによりデザインした。このsgRNAは、K12-L132Pアレルに見られるアレル特異的PAMの3'に隣接する20個のヌクレオチドに相当し(図1、赤色)、以下でsgK12LPと呼ぶ。野生型及び突然変異のK12配列の両方を標的とするCas9/sgRNAプラスミドを構築し(Sigma社、英国、ジリンガム)、ポジティブコントロールとして使用した(図1、緑色)。

20

【0079】

以前に記載された更なるK12発現構築物を使用して、アレルの特異性及び有効性を評価した。K12-WT又はK12-L132Pのいずれかについての完全mRNA配列が終止コドンの3'に挿入されたホタルルシフェラーゼプラスミド(以下でそれぞれK12WT-Luc及びK12LP-Lucと呼ばれる)(Liao H, et al. PLoS One 2011; 6: e28582.)、並びに成熟ヘマグルチニン(HA)タグ付きのK12-WT及びK12-L132Pタンパク質のための発現プラスミド(Courtney DG, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: 3352-3360.) (以下で、それぞれK12WT-HA及びK12LP-HAとして知られる)を使用した。ウミシイタケルシフェラーゼのための発現構築物(pRL-CMV、Promega社、英国、サウサンプトン)を、デュアルルシフェラーゼアッセイのために使用して、トランスフェクション効率を正規化した。

30

【0080】

デュアルルシフェラーゼアッセイ：デュアルルシフェラーゼアッセイを使用して、外因性構築物中の3種の試験sgRNAの有効性及びアレル特異性を、以前に記載された(Courtney DG, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: 977-985、Allen EHA, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013; 54: 494-502、Atkinson SD, et al. J Invest Dermatol 2011; 131: 2079-2086)ように適合された方法を使用して定量した。手短に言えば、HEK AD293細胞(Life Technologies社)を、リポフェクタミン2000(Life Technologies社)を使用して、K12WT-Luc発現構築物又はK12LP-Luc発現構築物とsgNSC構築物、sgK12構築物、又はsgK12LP構築物との両方で1:4の比率でトランスフェクションさせた。細胞を溶解前に72時間にわたりインキュベートし、ホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼの両方の活性を定量した。全体で8回の反復実験を、各々のトランスフェクション条件につき実施した。

40

50

【0081】

ウェスタンブロッティング：H A タグ付けされた野生型 (K 1 2 W T - H A) 発現構築物及び突然変異 (K 1 2 L P - H A) 発現構築物 (Liao H, et al. PLoS One 2011; 6: e 28582.) を、上記 s g R N A のそれぞれと 1 : 4 の比率で H E K A D 2 9 3 細胞中に 2 連でリポフェクタミン 2 0 0 0 (Invitrogen社) を使用して、以前に記載された (Courtney DG, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: 977-985, Allen EHA, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013; 54: 494-502) のと同様の方法を使用して一過的に同時トランスフェクションさせた。トランスフェクションされた細胞を 7 2 時間にわたりインキュベートした。H A タグ付けされた K 1 2 及び - アクチンの発現を、H A に対するウサギポリクローナル抗体 (Abcam社、米国、ケンブリッジ、a b 9 1 1 0、1 : 2 0 0 0) 及びヒト - アクチンに対するマウスモノクローナル抗体 (Sigma社、1 : 1 5 0 0 0) を使用して標準的方法 (Courtney DG, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: 977-985, Allen EHA, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013; 54: 494-502) を用いて分析した。膜を、それぞれセイヨウワサビペルオキシダーゼがコンジュゲートされたポリクローナルブタ抗ウサギニ次抗体 (DakoCytomation社、英国、イーリー) 又はセイヨウワサビペルオキシダーゼがコンジュゲートされたヤギ抗マウス抗体 (DakoCytomation社) と一緒にインキュベートした。タンパク質結合は、標準的な化学発光 (Life Technologies社) により検出した。デンシトメトリーを I m a g e J (Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. Nat Methods 2012; 9: 671-675) を使用して行うことで、H A タグ付けされた K 1 2 のバンド強度を定量した (n = 4)。これを、 - アクチンのバンド強度に正規化した。
10 20

【0082】

定量的リアルタイム P C R : トランスフェクションを、ウェスタンブロッティングについて記載したのと同様にして実施したが、K 1 2 W T - H A 及び K 1 2 L P - H A の両方を、細胞中に同時にトランスフェクションさせた。全てのトランスフェクションは、3 連で実施した。トランスフェクション後に、細胞を 4 8 時間にわたりインキュベートし、R N A を R N A e a s y P l u s キット (Qiagen社、オランダ、ヴェンロー) を使用して抽出した。5 0 0 n g の R N A (Life Technologies社) の c D N A 変換後に、定量的リアルタイム P C R を実施して、K R T 1 2 の m R N A のレベルを定量した。K R T 1 2 アッセイ (アッセイ I d 1 4 0 6 7 9, Roche社、英国、ウェスト・サセックス) を、H P R T アッセイ (アッセイ I D 1 0 2 0 7 9, Roche社) 及び G A P D H アッセイ (アッセイ I D 1 4 1 1 3 9, Roche社) と並行して使用した。各試料を各アッセイについて 3 連で試験し、相対遺伝子発現を、 C T 法 (Livak KJ, Schmittgen TD. Methods 2 001; 25: 402-408) を使用して計算した。K R T 1 2 発現レベルを、H P R T 及び G A P D H (両方の参照遺伝子の発現は、処置群の間で「安定」であると考えられる) に対して、B e s t K e e p e r ソフトウェアツール (Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Biotechnol Lett 2004; 26: 509-515) を使用して正規化した。
30

【0083】

パイロシークンシング：定量的逆転写酵素 P C R により評価された同じ c D N A 試料を使用して、パイロシークンシングを実施することで、正確に以前に記載された (Courtney DG, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: 3352-3360) 通りに、残りの K 1 2 - L 1 3 2 P の m R N A 対 K 1 2 - W T の m R N A の比率を測定した。
40

【0084】

K R T 1 2 遺伝子導入マウス：C 5 7 マウスモデルを取得し、内因性のマウス K r t 1 2 コーディング配列を置き換えるためにヒト K 1 2 - L 1 3 2 P アレルでノックインした。これにより、アレル特異的な s g R N A 及び C a s 9 による K R T 1 2 - L 1 3 2 P の i n v i v o 標的化が可能となった。1 コピーのヒト K 1 2 - L 1 3 2 P アレル及び 1 コピーのマウス K r t 1 2 が存在する 2 4 週齢の雌のヘテロ接合マウスを使用した。標準的な P C R 及びサンガー式のジデオキシヌクレオチドシーケンシングを使用して、該マウスをジェノタイピングし、K 1 2 - L 1 3 2 P アレルのヘテロ接合性を確認した。この研
50

究は1つの角膜における治療効果を調査するので、動物の無作為化は必要ないが、同じ動物のもう一方の角膜をネガティブコントロールとして使用した。研究者は、この研究において盲目化されなかった。全ての実験は、倫理規制を遵守し、地元の倫理委員会によって承認された。

【0085】

in vivoでの実質内の眼内注射：アレル特異的sgRNA及びCas9の一過性発現を達成するために、上記sgK12LPプラスミドを、以前に記載された(Moore JE, McMullen CBT, Mahon G, Adamis AP. DNA Cell Biol 21: 443-451)プロトコルに従つて、ヘテロ接合ノックインマウスの角膜実質中に実質内眼内注射により導入した。この送達法を評価するために、野生型マウスに、最初に4μgのCas9-GFPプラスミド(pCas9D10A_GFP)(Addgeneプラスミド44720)を注射した。マウスを24時間、48時間、及び72時間の時点で淘汰し、角膜を4%のパラホルムアルデヒド中で固定し、標準的な組織学的手法を使用して処理した。5マイクロメートル厚の切片を切り出し、再水和し、蛍光顕微鏡法によりイメージングした。マウスに全身麻酔薬を投与し、角膜に局所麻酔薬を投与した。資格のある眼科医が、全体で3μlのリン酸緩衝生理食塩水中に希釈された4μgのsgK12LPプラスミド又はsgNSCプラスミドを4匹のマウスの右眼と左眼のそれぞれの角膜中に注射した。マウスを、処置48時間後に淘汰した。

10

【0086】

NHEJのシーケンシング及び測定：マウスを淘汰したら、眼を摘出し、角膜を解剖した。gDNAを、DNA抽出キット(Qiagen社)を使用して抽出し、試料を2つの処置群：sgK12LP及びsgNSCへとプールした。この試料に、以下の2種のプライマー：5'-ACACCCATCTTGCAGCCTAT-3'及び5'-AAAATTCCCAAAGCGCCTC-3'を使用してPCR増幅を行うことで、K12-L132P突然変異の周辺の領域を増幅した。PCR産物をゲル精製し、CloneJetクローニングベクター(Life Technologies社)中にライゲーションし、それらを使用することで、DH5αコンピテント細胞(Life Technologies社)を形質転換した。全体で13個のクローナンを選択し、プラスミドDNAを、miniprepキット(Qiagen社)を使用して製造業者の手順に従って調製した。13個のクローナンからのDNAを、次いでCloneJetベクターと一緒に提供されるシーケンシングプライマーを使用してシーケンシングした(オックスフォード大学動物学科)。Zhang研究室のオンラインツール(crispr.mit.edu)により予測されたマウスゲノム中のsgK12LPについての2つの最も可能性の高いエキソン内オフターゲット部位を、同様に評価した。ここで、10個のコロニーを、それぞれの予測されたオフターゲットの分析のために選択した。予測されたオフターゲット部位は、5'-TAAGTAGCTGATCTATCAGTGGG-3'(Gon41)及び5'-TGGGAAGCATACTGTCATTGG-3'(Asphd1)であった。これらの2つの部位だけが選択されたのは、計算されたオフターゲットスコアが0.1を超えるのがそれら2つだけであったからである。

20

30

【0087】

統計学：全てのエラーバーは、特段の記載がない限り、平均値の標準誤差を表す。有意性は、全ての試料が同じ分布を示したので、対応のないt検定を使用して計算した。統計学的有意性は、0.05%に定めた。分散を群の間で計算することで、それらは同様であるとみなされた。

40

【0088】

KRT12特異的sgRNAの構築：MECDを引き起こすKRT12ミスセンス突然変異から得られた配列変化の分析により、MECDの重症形態を引き起こすL132P突然変異が、新規PAM部位の生成(AAG>AGG)を同時に起こすことが明らかになった。KRT12のL132P突然変異により生成された新規PAM部位の5'末端に隣接する20ヌクレオチド配列に相補性のsgRNA(sgK12LP)をデザインし、Zhang研究室(MIT 2013)によりオンラインで提供される「最適化CRISPRデザ

50

インツール (Optimized CRISPR Design Tool)」を使用して潜在的なオフターゲットについて評価した (図 1、赤色)。sgRNAは、このシステムを使用して 66 %のスコアを有すると計算された。ここで、50 %を超えるスコアは、限られた数の予測される考えられるオフターゲットでは質が高いと考えられる。

【0089】

in vitroでのsgK12LPのアレル特異性及び有効性の評価：sgK12LPのアレル特異性及び有効性を、in vitroでHEK AD293細胞において、野生型及び突然変異のK12のための外因性発現構築物を使用して評価した。アレル特異性は、最初にデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを使用して測定した (図 2 A)。ホタルルシフェラーゼ活性は、K12WT-Luc 又はK12LP-Luc のいずれかを発現する、sgK12で処理された細胞中で大幅に減少することが判明した。ホタルルシフェラーゼ活性の有効なアレル特異的な減少は、sgK12LPで処理された細胞において観察された。K12LP-Luc を発現する細胞において、73.4 ± 2.7 %の減少 ($P < 0.001$) が観察された (図 2 A)。このアレル特異的な有効なノックダウンはまた、ウェスタンプロッティングにより、K12WT-HA 又はK12LP-HA のいずれかを発現する細胞においても観察され (図 2 B、4つのプロットを表すイメージ)、デンシトメトリーによる定量により、K12LP-HAタンパク質においてsgK12LPによりK12WT-HAタンパク質と比較して 32 %の有意な減少が明らかとなった ($P < 0.05$)。sgK12で処理された細胞において、野生型及び突然変異K12タンパク質の両方が減少したことが分かり、その一方で、sgK12LPで処理された細胞において、野生型タンパク質の発現に効果は見られないが、突然変異K12タンパク質の大幅なノックアウトが見られた (図 2 B)。

【0090】

タンパク質レベルで観察されたこのデータを裏付けるために、定量的逆転写酵素PCR及びパイロシーケンシングを実施して、アレル特異性及び有効性をmRNAレベルで測定した。野生型及び突然変異K12の両方を同時に (1:1の発現比率で) 発現する、3種の試験Cas9 / sgRNA発現構築物 (NSC、K12、及びK12LP) のそれぞれで処理された細胞において、定量的逆転写酵素PCRを使用して、K12の全mRNAのノックダウンを測定した (図 2 C)。K12の全mRNAの73.1 ± 4.2 % ($P < 0.001$) の有効な減少がsgK12処理された細胞において観察され、sgK12LP処理された細胞においては52.6 ± 7.0 % ($P < 0.01$) のより少ない減少が測定された (図 2 C)。パイロシーケンシングを使用して、これらのsgRNAでの処理後の残存している成熟mRNA種の細胞内割合を測定した (図 2 D)。mRNAの割合は「K12-L132P'のパーセント / K12-WTのパーセント」として計算された。突然変異及び野生型のK12のmRNAの間の比率が1:1であると想定して、sgNSCで処理された細胞を1に正規化した。sgK12で試験された細胞において、0.89 ± 0.03のK12の突然変異mRNAの割合が観察されたが、NSCコントロールとの差は有意ではなかった ($P < 0.14$)。sgK12LPで処理されたこれらの細胞において、0.28 ± 0.02のK12の突然変異mRNAの割合が検出され、sgNSC処理された細胞と比較して有意に変化した ($P < 0.001$) (図 2 D)。

【0091】

in vivoでのsgRNA-K12LPの効力の測定：Cas9-GFP構築物の実質内注射は、注射 24 時間後に角膜上皮中に緑色蛍光タンパク質 (GFP) のタンパク質の存在をもたらした (図 3 A)。GFPの一過性発現は、注射後 48 時間まで見られた。sgK12LP発現構築物又はsgNSC発現構築物のいずれかを、K12-L132Pヒト化ヘテロ接合マウス中に実質内注射し、48 時間の期間インキュベートした後に、マウスを安樂死させ、ゲノムDNA (gDNA) を角膜から調製した。4匹のsgK12LP処理された動物又はsgNSC処理された動物の角膜からのgDNAをプールし、ヒト化されたK12-L132P遺伝子のエキソン1のPCR增幅、クローニング、及びシーケンシングを実施した。sgNSCで処理された眼のgDNAから確立された 10 個の

クローンのうち、K 1 2 - L 1 3 2 P 配列は全てにおいてインタクトなままであった。sg K 1 2 L P 处理された眼からの 1 3 個の個々のクローンをシーケンシングした。8 個は、変化されていない K R T 1 2 の L 1 3 2 P ヒト配列を含むことが判明し、一方で 5 個のクローンは、Cas 9 / sg K 1 2 L P 複合体の予測された開裂部位の周辺での N H E J を裏付けた（図 3 B）。1 個のクローン（1）において、1 個のヌクレオチドの挿入と共に、3 2 個のヌクレオチドの欠失が見出された。5 3 個までのヌクレオチドの大きな欠失が in vivo で観察された（クローン 5）。これらの 5 個のクローンのうち、4 個は、早発の終止コドンの発生をもたらすこととなるフレームシフトを起こすと予測される欠失（クローン 1 及びクローン 3 ~ クローン 5）を含んでいた。マウスにおける sg K 1 2 L P の上位 2 つの予測されたエキソン内オフターゲット部位も、この方法を使用して評価した。1 0 個のクローンを、それぞれの標的についてシーケンシングしても、非特異的開裂を経たものは見られなかった。

10

【0092】

R 5 1 4 P、L 5 1 8 R、L 5 0 9 R、及び L 5 2 7 R における突然変異により作製された P A M 部位と関連する T G F B I 突然変異：一本鎖ガイド R N A を、これらの突然変異のそれを標的とするようにデザインし、sg R N A / Cas 9 発現プラスミド中にクローニングした。さらに、天然に存在する近接 P A M を利用するポジティブコントロールのガイド R N A を、それぞれの突然変異のためにデザインした。野生型及び突然変異の標的配列を、ルシフェラーゼレポータープラスミド中にクローニングすることで、野生型の発現及び突然変異発現に対する遺伝子編集の効果を確認することが可能となった。両方のプラスミドを使用して A D 2 9 3 細胞をトランスフェクションさせ、ルシフェラーゼ発現を C R I S P R Cas 9 处理の 7 2 時間後に本発明者らの高スループットレポーター遺伝子アッセイを使用して測定することで、細胞中に存在する突然変異及び野生型の D N A の量を測定した。

20

【0093】

以下の図 4 は、S N P 誘導型 P A M アプローチを使用して評価されたこれらの 2 個の T G F B I 突然変異のそれぞれ（R 5 1 4 P、L 5 1 8 R、L 5 0 9 R、及び L 5 2 7 R）について、かなりのアレル特異性が達成され、その際、突然変異アレルは、C R I S P R Cas 9 システムにより切断され、野生型の D N A は、上記ガイドの幾つかについて或る程度まで切断されたことを示している。

30

【0094】

P A M 部位に隣接する標的領域内にある S N P 突然変異と関連する T G F B I 突然変異：一本鎖ガイド R N A を、これらの突然変異を標的とするようにデザインし、sg R N A / Cas 9 発現プラスミド中にクローニングした。野生型及び突然変異の標的配列を、ルシフェラーゼレポータープラスミド中にクローニングし、本発明者らの高スループットレポーター遺伝子アッセイにおいて評価した。両方のプラスミドを使用して、A D 2 9 3 細胞をトランスフェクションさせ、ルシフェラーゼ発現を 3 日後に測定した。

【0095】

1 6 マーから 2 2 マーまでの長さの範囲のガイドを評価することで、どの長さが、特異性の改善のために最大アレル特異性を達成するかを決定した。ガイドの長さに加えて、ガイドの 5' 末端への二重のグアニンの付加が特異性の改善を補助するか否かも評価した。上記ガイド配列は、ガイド長さに応じて異なる切断効率を示し、二重のグアニンの付加は、一般的に切断効率を改善しなかった（図 5、項目 A ~ 項目 E）。

40

【0096】

アレル特異性を改善するために、R 1 2 4 H を標的とする 2 0 マーのガイドを、強化型 Cas 9 プラスミド中にクローニングした。強化型 Cas 9 は、非標的切断を抑えるように適切に操作されている。野生型配列の開裂における注目すべき減少、及びアレル特異性における増加（例えば、野生型配列についての切断効率と突然変異配列についての切断効率との間の差）が、デュアルルシフェラーゼアッセイを介して観察された（図 5、項目 F）。

50

【0097】

DNA開裂を確認するために、野生型TGFBI配列又は突然変異TGFBI配列のいずれかを含む二本鎖DNAテンプレートを調製した。テンプレートは、合成ガイド及びCas9タンパク質と一緒にin vitroで37において1時間にわたりインキュベートした。断片分析をアガロースゲル上で行うことで、切断能力を測定した(図5、項目G)。

【0098】

追加のin vivo研究

ライブ動物イメージング：ライブイメージングのために使用される全てのマウスは、12週齢から25週齢の間であった。イメージングのために、マウスを、約1.5ml/分の酸素流中の1.5%~2%のイソフルラン(Abbott Laboratories Ltd.社、英国、バークシャー)を使用して麻酔した。ルシフェリン基質(30mg/mlのD-ルシフェリンカリウム塩、Gold Biotechnology社、米国、セントルイス)とViscotearsゲル(Novartis社、英国、キャンバリー)とを1:1で混合した混合物を、イメージングの直前にヘテロ接合Krt12+/luc2トランスジェニックマウスの眼に滴下した。Xenogen IVIS Lumina(Perkin Elmer社、英国、ケンブリッジ)を使用して、発光を定量した。マウスの眼を取り囲む対象領域を選択して、以前に記載されたプロトコルを使用して定量し、そのサイズ及び形状は全体を通じて一定に保たれた。蛍光をまた、Cy3標識されたsiRNAが注射されたマウスにおいてXenogen IVIS Luminaを使用して可視化した。

10

20

【0099】

実質内注射：Cas9/sgRNA構築物を、実質内注射によりマウス角膜に送達した。これは、訓練を積んだ眼科医(J.E.M.)により上記のように行われた。角膜内の核酸の分布を評価するために、2μlの150pmol/μlのCy3標識されたAccel1修飾siRNAを、WTのC57BL/6Jマウスの右眼中に実質内注射した。Cy3標識されたsiRNAの残存を評価するために、動物に、注射後の0時間、6時間、24時間、48時間、及び72時間の時点でXenogen IVIS Luminaシステムにおいてライブイメージングを行った(n=3)。さらに、マウスを注射後の0時間、6時間、及び12時間の時点で屠殺し(n=3)、眼組織を取り出し、-80で凍結させた。組織をOCT中で固定化し、蛍光顕微鏡法のために凍結切開した。

30

【0100】

Cas9/sgRNA発現構築物の作製：Cas9及びsgRNAの両方を発現するプラスミドpSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)は、Feng Zhang教授からの寄贈として得られた(ブロード研究所、MIT、Addgeneプラスミド番号48139)。luc2を標的とするsgRNAを、Zhang研究室のCRISPRデザインツール(www.crispr.mit.edu)を用いて開始コドンの61塩基対以内でデザインした。luc2特異的なsgRNAを、最初にオリゴヌクレオチド5' CAC CGT TTG TGC AGC TGC TCG CCG G 3'及び5' AAA CCC GGC GAG CAG CTG CAC AAA C 3'をアニーリングし、それに続いてBbsIで消化されたpSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)中にライゲーションすることにより構築した。このプラスミドをsgLuc2と呼ぶ。元のpSpCas9(BB)-2A-Puroプラスミドを、非標的化ネガティブコントロールとして使用した。これをsgNSCと呼ぶ。sgLuc2プラスミドの活性を、上記の方法と同様のデュアルルシフェラーゼ法を使用して評価することで、Cas9/sgRNA効力を調べた。簡潔には、luc2構築物(PGL4.17、Promega社)を、sgLuc2又はsgNSC(两者ともCas9/sgRNA発現構築物)のいずれかと共に1:4のモル比でウミシイタケルシフェラーゼ発現構築物と一緒に同時トランスフェクションさせた。細胞を、トランスフェクション後48時間にわたりインキュベートしてから、上記のようにルシフェラーゼ定量を行った。

40

【0101】

50

C R I S P R / C a s 9 の i n v i v o 評価 : C a s 9 / s g L u c 2 プラスミドの有効性を、 i n v i v o で K 1 2 - l u c 2 遺伝子導入マウスにおいて、 s i R N A 遺伝子サイレンシングの評価のために使用される改良されたプロトコルを使用して評価した。 s g L u c 2 (右眼) 及び s g N S C (左眼) の両方に、 4 μ l の P B S の全容量で 5 0 0 n g / μ l の濃度で実質内注射した。マウス (n = 4) のライブイメージを、 2 4 時間毎に 7 日間にわたり、次いでその後は週 1 回、全体で 6 週間 (4 2 日間) にわたり撮影した。ルシフェラーゼ阻害の定量は、右 / 左比を計算することにより測定し、値を 0 日目の値 (1 0 0 %) に正規化した。

【 0 1 0 2 】

角膜上皮細胞中でのみ L u c 2 を発現するこの実験の遺伝子導入マウスモデルにおいて、 C R I S P R C a s 9 ガイドは、 L u c 2 遺伝子を以下に示されるように (s g R N A) l u c 2 発現を観察することにより角膜上皮中での遺伝子編集の成功を視覚的に示すことができる方法で標的化するようにできていた。こうして本質的にこれは、 K r t 1 2 発現によく似ている。それというのも、それは角膜上皮においてのみ発現されるからである。この i n v i t r o でのデュアルルシフェラーゼアッセイにより、未処理の細胞に正規化した場合 (未処理のコントロール = 1 0 0 % に対して正規化されたデータ) にルシフェラーゼ活性における有意な減少 (示される * は p < 0 . 0 5 を表す) により示されるように (図 6) 、 s g L u c 2 P 構築物による L u c 2 の標的化の成功が裏付けられた。 C R I S P R C a s 9 の s g L u c 2 ガイドを、角膜中で L u c 2 を発現する本発明者らの遺伝子導入マウス中で試験した。遺伝子導入マウスは K 1 2 発現に似るようにできており、そのため明るい緑色がある場合には多くの K r t 1 2 発現があり、図 7 において、青色はより少ない K r t 1 2 発現を示し、黒色は K r t 1 2 発現が全くないことを意味する。右側の眼に、試験用 s g L u c 2 を注射し、左側の眼に、非標的化非特異的なコントロールガイド及び C R I S P R を注射した。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 3 】

図 7 のグラフに示されるように、 L u c 2 発現の量が測定された。処置後に、それぞれのマウスの角膜ルシフェラーゼ活性を、 X e n o g e n I V I S ライブ動物イメージヤーを使用して毎日 7 日間にわたり、その後に 7 日毎に全部で 6 週間にわたり定量した。それぞれの処置群についてのルシフェラーゼ活性は、コントロールのパーセンテージとして表現した (R / L 比の %) 。

【 0 1 0 4 】

アレル特異的インデルの確認

リンパ球の E B V 形質転換 : 5 m l の全血の試料を採取し、滅菌 5 0 m l 容ファルコンチューブ中に入れた。 2 0 % のウシ胎児血清を含む等容量の R P M I 培地をその全血に添加し、そのチューブを優しく転倒混和させた。 6 . 2 5 m l の F i c o l l - P a que P L U S (GE Healthcare 社のカタログ番号 1 7 - 1 4 4 0 - 0 2) を、別個の滅菌 5 0 m l 容ファルコンチューブ中に入れた。その F i c o l l - P a que へと 1 0 m l の血液 / 培地混合物を添加した。そのチューブを、室温で 2 0 0 0 r p m にて 2 0 分間にわたり遠心させた。赤血球が該チューブの底部に形成され、その上に F i c o l l 層があつた。リンパ球は、 F i c o l l 層上の層を形成し、一方で最上層は培地であった。清浄な滅菌パステットを挿入してリンパ球を抜き出し、それを滅菌 1 5 m l 容ファルコンチューブ中に入れた。該リンパ球を遠心分離し、洗浄した。 E B V のアリコートを融解させ、再懸濁されたリンパ球に添加し、その混合物を 3 7 ° で 1 時間にわたりインキュベートした (感染期間) 。 R P M I の 2 0 % F C S 培地及び 1 m g / m l のフィトヘマグルチニンを、 E B V で処理されたリンパ球に添加し、そのリンパ球を 2 4 ウエルプレートに入れた。

【 0 1 0 5 】

E B V 形質転換されたリンパ球 (L C L) のエレクトロポレーション : C R I S P R 構築物 (G F P 又は m C h e r r y のいずれかと同時発現される) を、懸濁された E B V 形質転換されたリンパ球細胞に添加し、その混合物をエレクトロポレーションキュベットに移した。エレクトロポレーションを実施し、 1 0 % の F B S を含有する 5 0 0 μ l の事前

に温めたRPMI 1640培地をそのキュベットに添加した。キュベットの内容物を、事前に温めた培地の残りを含む12ウェルプレートへと移し、ヌクレオフェクションの6時間後に1mlの培地を除去し、新たな培地と交換した。

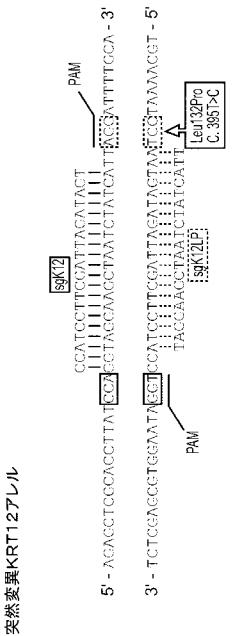
【0106】

GFP陽性生細胞及び/又はmCherry陽性生細胞のセルソーティング：ヌクレオフェクションの24時間後に、1mlの培地を除去し、細胞を含む残りの培地を、1.5ml容のエッペンドルフ中に回収した。該細胞を遠心分離し、200μlのPBS中に再懸濁し、50μlのeFluor 780生死判別色素を1:1000希釈で添加した。もう1回遠心分離した後に、その細胞を1×HBSS (Ca/Mg⁺⁺不含)、5mMのEDTA、25mMのHEPES (pH 7.0)、5%のFCS/FBS (熱失活されている)、及び10単位/mlのDNase IIを含有する濾過滅菌FACSバッファー中に再懸濁させた。細胞をソーティングして、GFP陽性生細胞及び/又はmCherry陽性生細胞を単離し、RPMI + 20%のFBS中に回収した。細胞を増殖させ、DNAを該細胞から抽出した。

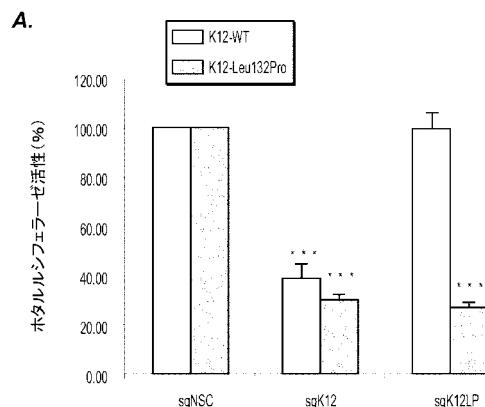
【0107】

シーケンシングのための单一アレルの单離：QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen社)を使用してDNAを单離し、PCRをCRISSPR/Cas9により標的化される領域にわたり使用した。特異的増幅をゲル電気泳動により確認し、PCR産物を精製した。該PCR産物を平滑末端化し、Clonejet Kit (Thermo Scientific社)からのpJET1.2/bluntプラスミド中にライゲーションした。そのライゲーション混合物を、コンピテントなDH5⁺細胞中に形質転換させた。单コロニーをピックし、サンガード式シーケンシングを実施して、編集を確認した。得られたデータは、図17に示されている。

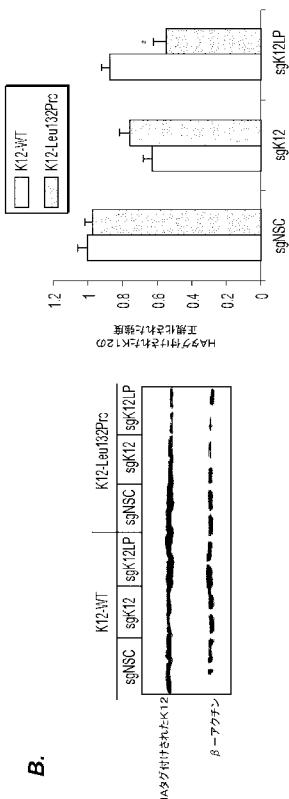
【図1】



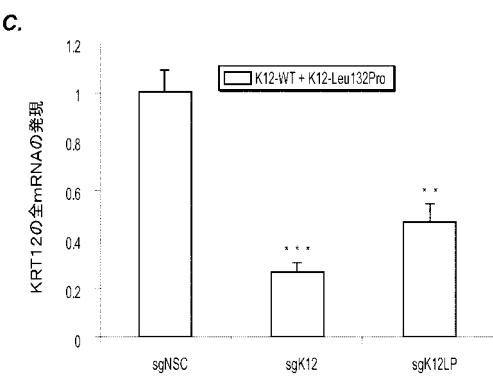
【図2A】



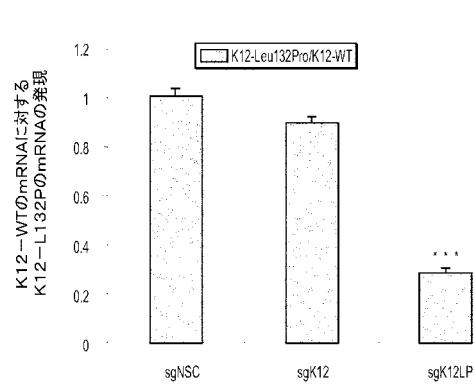
【図 2 B】



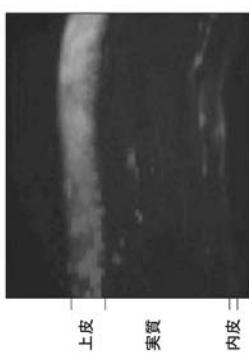
【図 2 C】



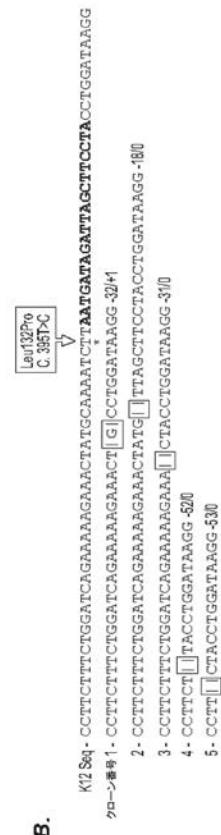
【図 2 D】



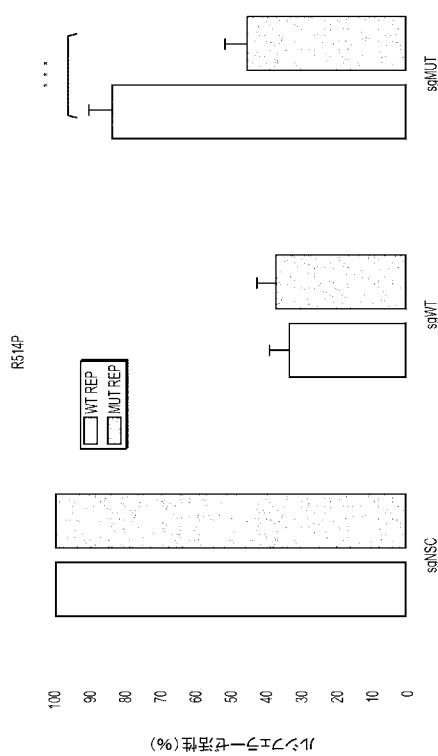
【図 3 A】



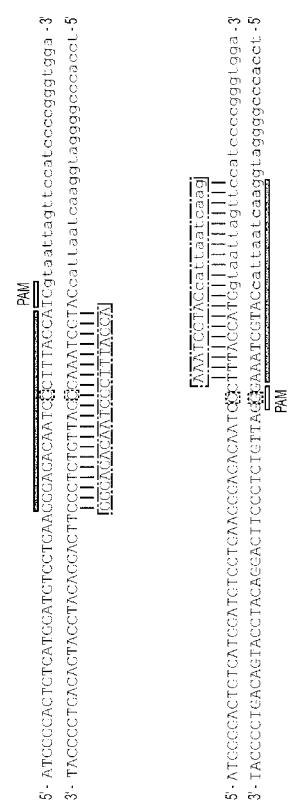
【図 3 B】



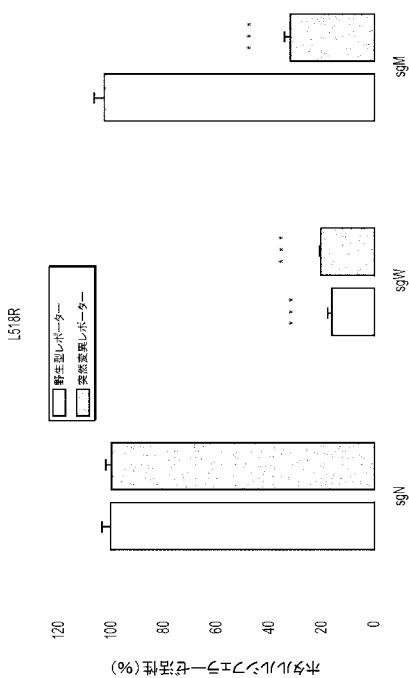
【 図 4 A - 1 】



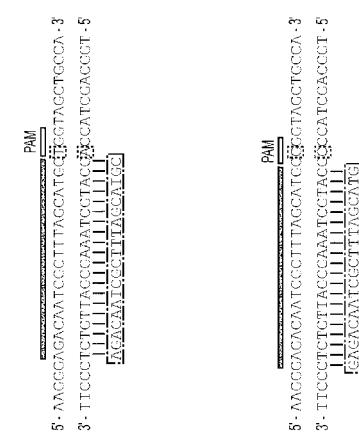
【図4A-2】



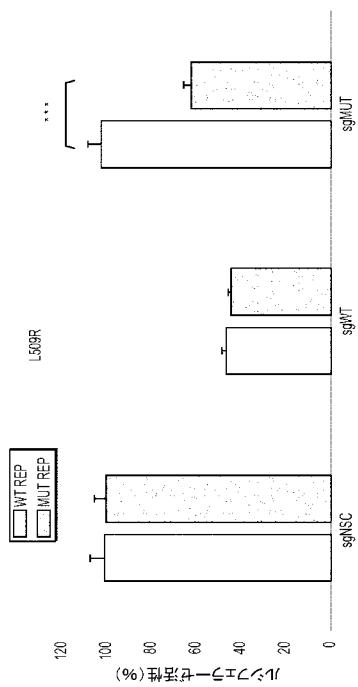
【図4B-1】



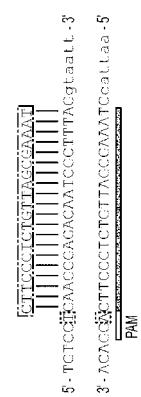
【図4B-2】



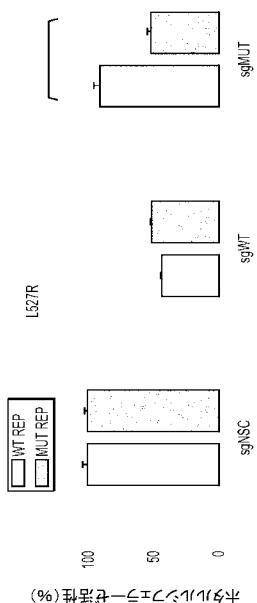
【図4C-1】



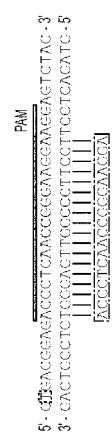
【図4C-2】



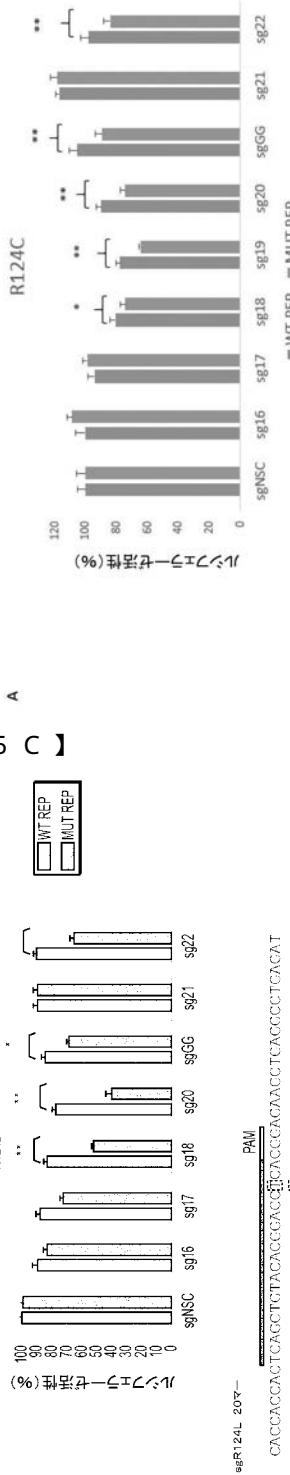
【図4D-1】



【図4D-2】



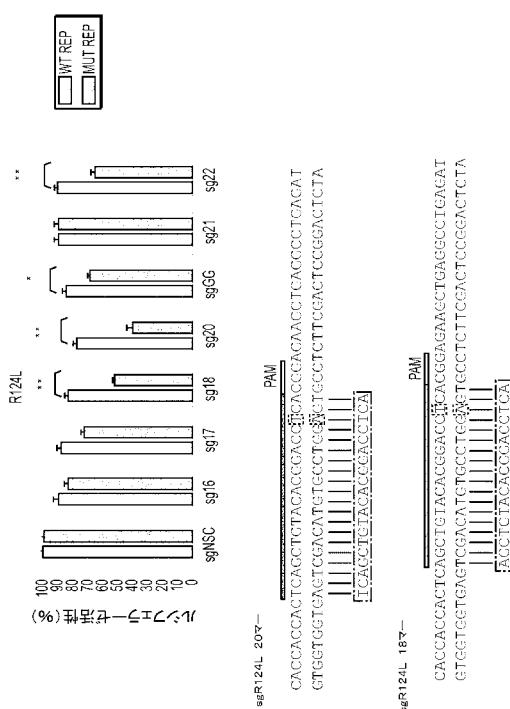
【 図 5 A 】



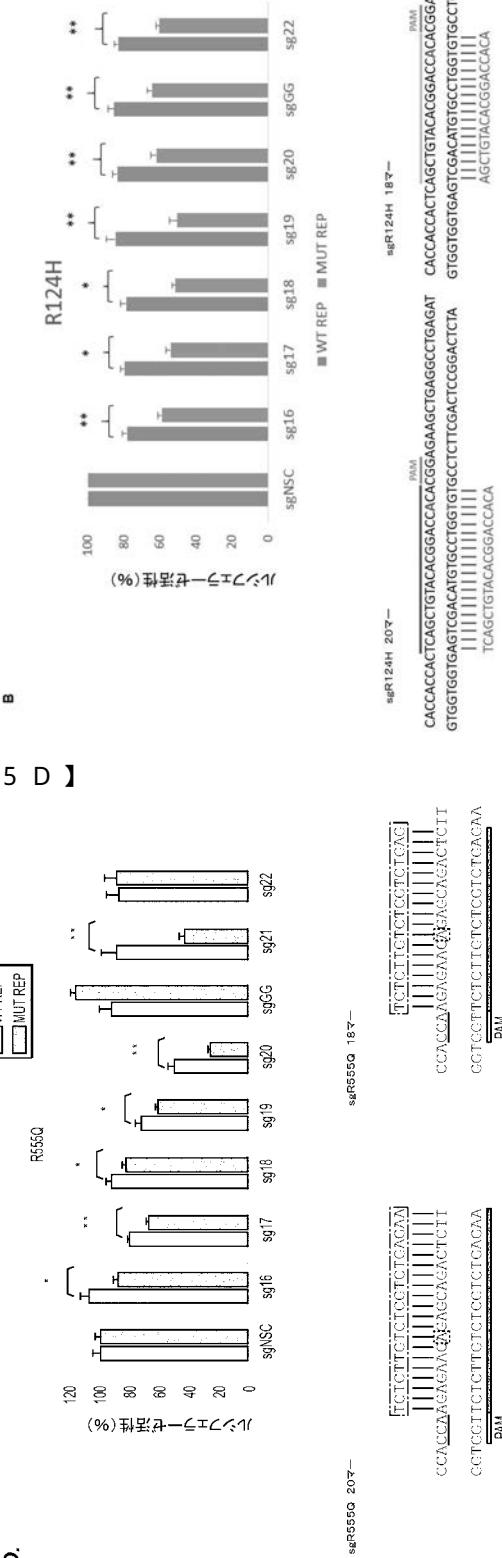
【図5B】



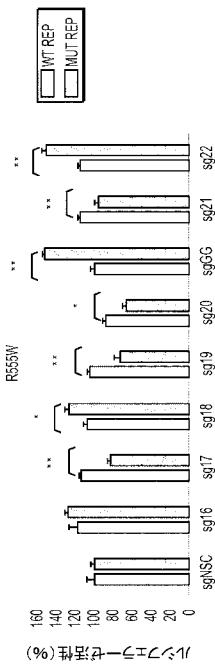
【 図 5 C 】



【 図 5 D 】

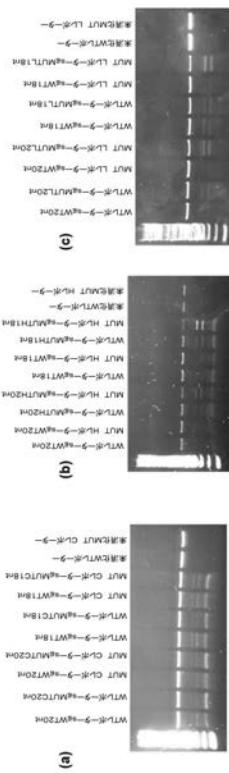


【図5E】



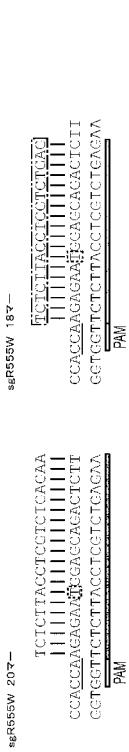
4

【図5G】



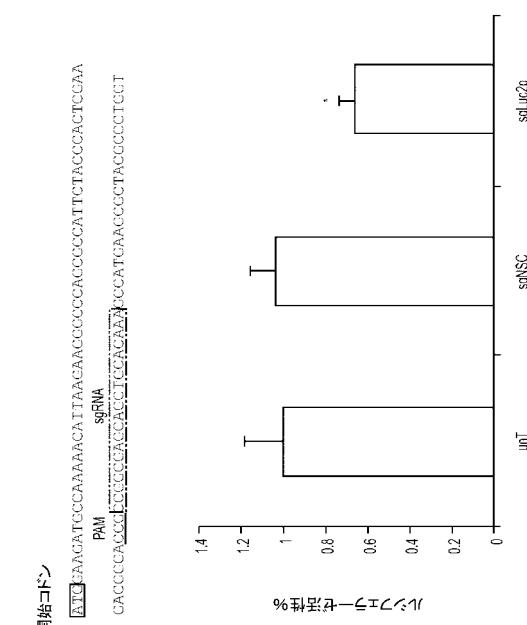
5

【 図 5 F 】



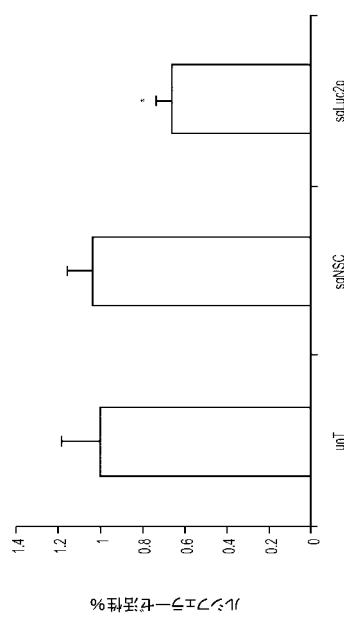
4

【 义 6 】

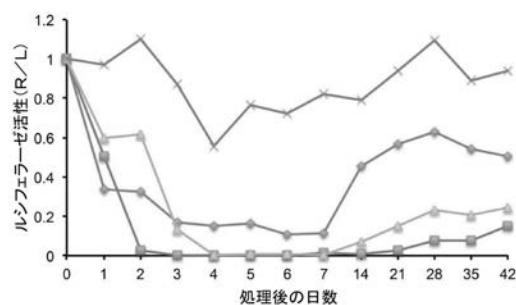
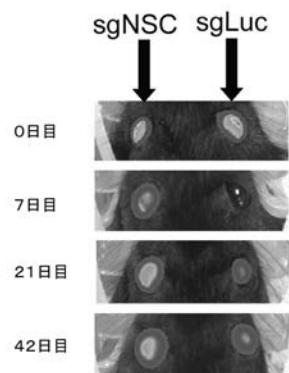


開始了

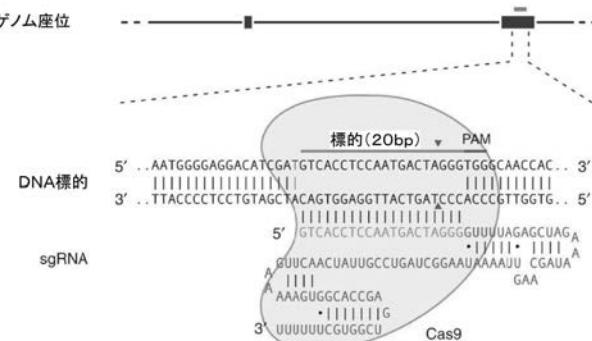
A. B.



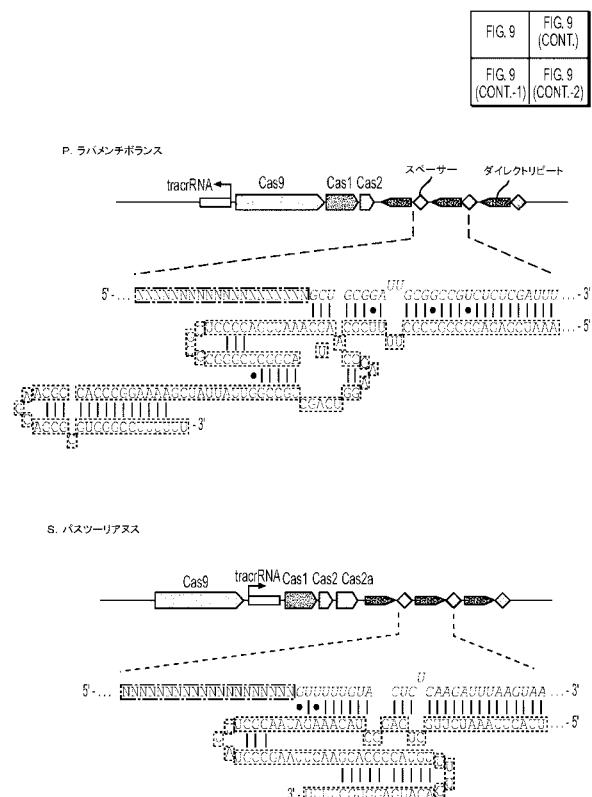
【図7】



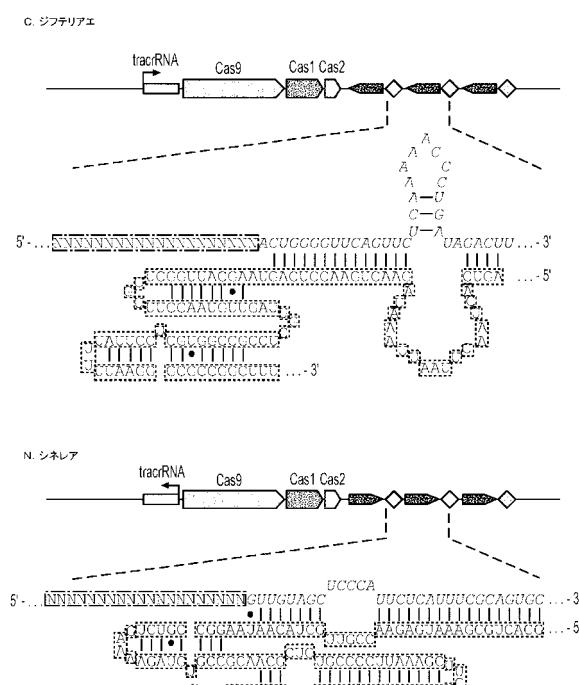
【図8】



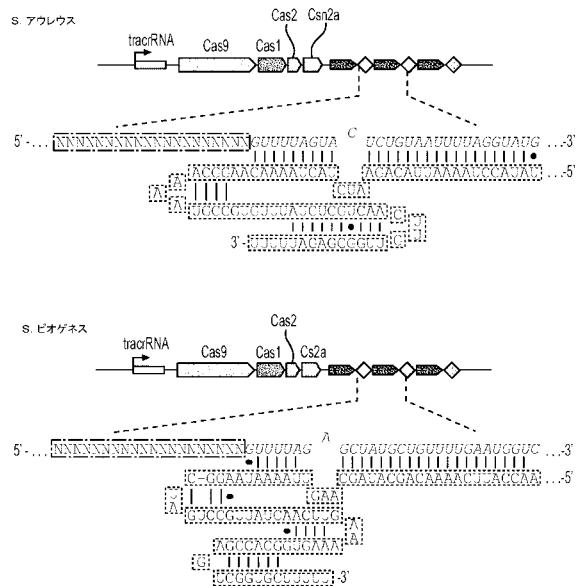
【図9-1】



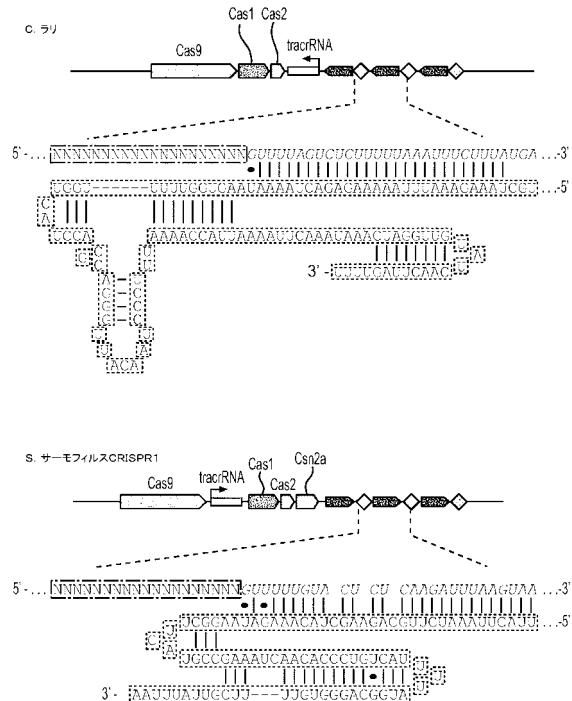
【図9-2】



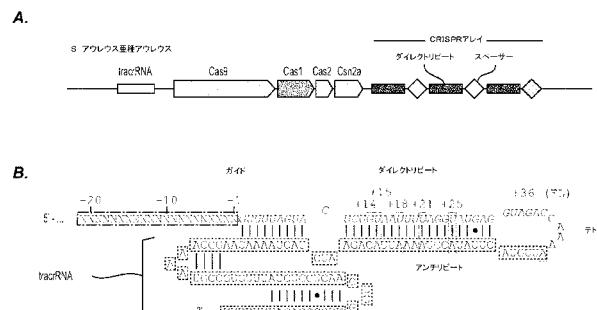
【図9-3】



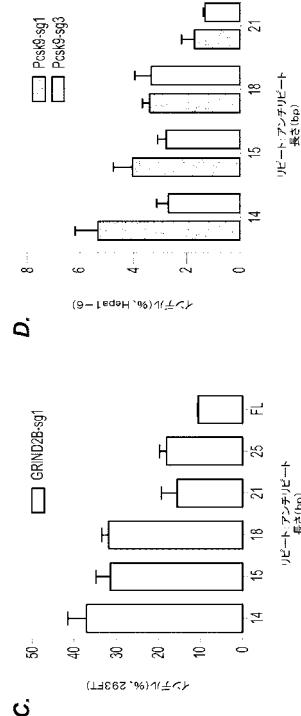
【図9-4】



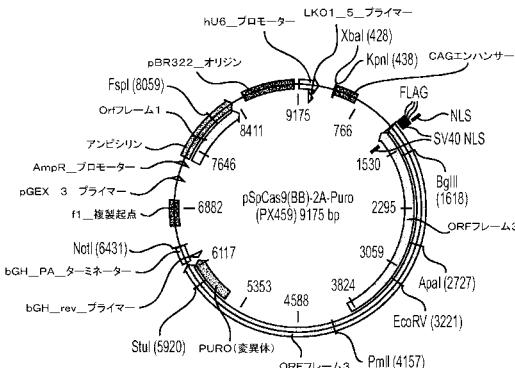
【図10-1】



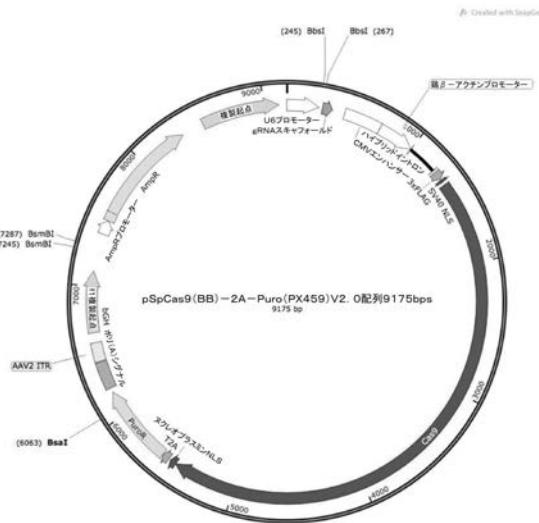
【図10-2】



【 図 1 1 - 1 】



【 図 1 1 - 2 】



【 义 1 2 】



【図 1.3 - 1】

spv Cas9 sgRNA配列
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAAGCUAGGUAAAUAAGCUAGU
 CCGUUUAUCACAUUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGGUUCUUU (配列番号1) ここで、
 “NNNNNNNNNNNNNNNNNN”は、sgRNAにおけるガイド配列(cRNA)を表し、かつ
 “GUUUAGAGCUAGAAAUAAGCUAGGUAAAUAAGCUAGU
 GUGGCACCGAGUCGGGUUCUUU”は、示例的示すtRNA RNA又はsgRNAスキャ
 パー配列である。他の部位は、配列番号1の通りアランギン酸の代り、アラバ
 ナの代りである。

2-2-23包 未匹配

【 図 1 3 - 2 】

Spy Cas9アミノ酸配列

Sau Cas9 sgRNA

GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGUACUGGAAACAGAAUCUAACUAAAACAAG
GCAA.AUGCCGUGUUAUCUGGUACAUUGUUGGCGAAGAUUUUUU (配列番号5)
ここで、「NNNNNNNNNNNNNNNNNN」は、sgRNAにおけるガイド配列 (crRNA) を表し、かつ

【 図 1 3 - 3 】

CAACUUGUUGGCGAAGAUUUUUU”(配列番号6)は、例示的なtracrRNA又はsgRNAスキャフォールド配列である。

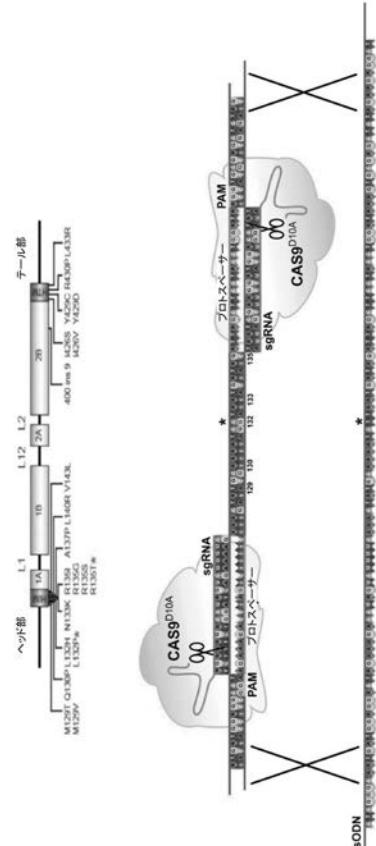
Sau Cas9ヌクレオチド配列

【 図 1 3 - 4 】

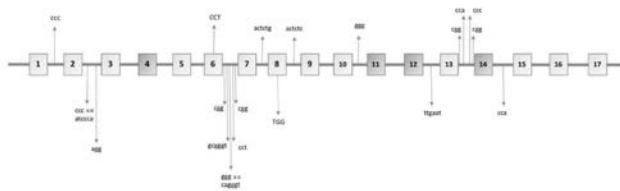
Sau Cas9アミノ酸配列

MAPKKKRKVHGIVGPAKRNVILGLDIIISVGYGHIDYETRDVDAVRIFFKIANVNNEGRRS
KRGARRLKRRIIRRIORVKKLFDYNTLTDIISSELSPNYPEARVKGOKLSEEEPSAALLILK
RRGVINVNVEEVDITGNESTKOEIRNSKRALKEEYV.AEELQLERLKKIDGEVRGSNRIKFTSDYV
EAKQLIIVKVKAYHQHLDQSFIDFTYDILITRTRRYVECPGEGSIPGWKDJKEWYEMIIMHGCIYUPE
EJRSVSKYAYNAIDLNYALNDI.NNI.VTIRDE.NEKLYYEKKFHQVHENVKQKKPFTKQJAKHVN
EDIGKRYTRGSTGPEFTNLVYKJIDKIDTARKEHBN.EAELDQIAKILITQYQSSEDIQEETNLNSEL
TQEJEEQJSNLSKGYTGHTHNLSLKAALNLI.DEL.WHTNDNQIAHFNRLKLVPKKVDSLSSQKEPTILVD
HDL.SPVVKRSRHSQISVKVNAIIHKKYPNJDHIELAREKNSKDAQKMINMENQKRNRQJNTERHEIHT
TGEKANAYKLEIJKIJDQFGCKTYSJEAIPFEDJLNUHNPEYEDHTDHPRSVSFDFNSPNKKV1.VKQ
EENSKKGNRIPPEQVLTSSSDISKISYETFKHHHNI.AKGGKRISKUTKKEYIIEFRDINRFSVQKQDHN
RTRYATRGLMLNRRSRYFVNVLVDVKVSINGFTSLRRWKVKKERNKGYKUHNL.AEAL.IA
IA.NADPFFEWKLLDAAKVKMENQMEPEKAQAESEMPTE.TQ.EQEYKEIFTPPIQKJNPKDQKDYKXS
HRVDKCPNRELIJL.YSTRKDQDGNTI.VLNNLNQYDPKDNDKJLKKI.LNKSPEKLJ.MYHEHDHQ
TYQKIKLMEQYQGDEKPNLYKYYEETGNYJ.TKYSKKDNGPVYKIKKYYGKLN.I.NMJDITDQY
NSRSVKV1.SLKPDRFTDYLDDNGVYKPVFTVKN1.DVVKENYENVEVNSKYCEAKLKKNSQAE
HASYFVNNDLILRHYLVRIGVYVNNLDLNRIEVNMIDITYREYELNEMNJDKRPRIKTIASKTOSIKK
YSTDILGNYEKSKHHPKQHKGKRPAAIKKA.GAQAKKKKGSPYDVPDY.AYPPYDVPDY.AYPP
DVPDYA (配列番号 8)

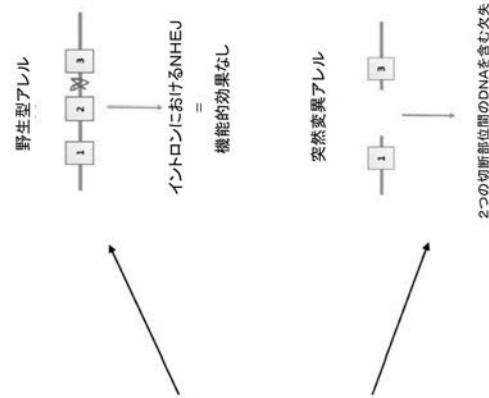
〔 図 1 4 〕



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 17 】

【 図 1 8 - 1 】

【 図 1 8 - 2 】

Figure 18 (continued)

【図18-4】

Figure 18 (continued)

【 図 1 8 - 3 】

Figure 18 (continued)

【図19-1】

Figure 19. 例示的存储的配列

【 図 1 9 - 2 】

Figure 19 (continued)

(図 20-1)

Figure 20. TGFB1領域におけるイントロン1～2のための例示的カイド配列 位置 領 配列 TAV 特異性スコア 効率スコア 位置 領

【 図 1 9 - 3 】

Figure 19 (continued)

【図20-2】

Figure 20 (continued)

【図 2 1 - 6】

Figure 21 (continued)

136036172	1 CCCCCTGTCCTCAC1GGG	67.6440363	48.92537206	136040913	-1 TGCCTCCCTGGCAGG	26.41811813	28.39898164	136036566	1 GGCCTGTCCTCAC1GGG	74.8342745	61.54385891	136041355	-1 ACTCTACTCTAC1TGG	72.3417174	57.5909826
136036178	-1 GAGCTCTCTGGTGG1GGG	52.171/216	136040919	1.111GTCGGGGAGG	38.72/7868	29.2189609	136036574	-1 TCTCTGTCCTGCT1AGG	65.7150852	45.79320346	136041359	-1 CTACACTCTAC1TGG	68.3082015	61.01564482	
136036179	-1 AGAGCTCCCTCC1TGG	71.508818	36.9798217	136040920	1 TCTCTGTCCTGGA1GGG	39.488515	50.7057885	136036584	-1 ACTCTGAGCCAGGAGG	65.3209096	74.7778784	136041384	-1 AGCTGTCAGTCTG1GG	63.40837	65.60154493
136036182	1 CCCCTTACCACTGG1GGG	58.1161546	53.74052639	136040920	-1 TGTCTGTCCTGCT1GG	47.105636	36.7918752	136036587	1 TGCAGGACAGGAGG	50.8018158	70.84671776	136041385	-1 GAGCTGTCAGC1GGG	73.2015268	67.76441554
136036183	1 CCCCTTACCACTGG1GGG	68.870805	74.05246738	136040926	-1 GCTCTGTCCTGCT1GG	60.119059	40.72196383	136036587	-1 TGCAGGACAGTAC1C	58.9100372	61.02014746	136041387	-1 TCACTACCCATC1TGG	73.4494513	79.2608765
136036184	1 CTCTTACCACTGG1GGG	66.512049	56.7188276	136040927	1 GGGACAGGAGG1GG	27.710849	37.9242123	136036589	1 ECTCTCTGTCAG1GGG	78.1759369	56.09290049	136041391	-1 ACTCTACCCATC1TGG	53.2355154	51.26181003
136036195	1 GAGCTAACAGGGAGG1GGG	58.1997137	53.09972614	136040928	1 GGCACACTGGAG1GGG	77.3255594	39.6918558	136036586	-1 TGCAGGACAGTAC1TGG	68.66682168	136041392	1 GYCCACACTC1GGG	58.7537455	60.66433307	
136036199	-1 ATCTCTTCTCT1TGG	41.740656	52.5730783	136040935	1 TGCCTGTCAG1TGG	49.2155192	47.8387208	136036586	-1 TGCAGGACAGTAC1TGG	60.1644123	54.749858184	136041401	-1 ATGGCTGTCAG1TGG	56.710354	63.0026319
136036201	1 AAGGGAGGAGCTC1GGG	59.2055802	53.63365351	136040961	1 GAGTATAAGGAG1GGG	55.6739379	45.47169673	136036586	1 ACGAGCTGAACT1GGG	57.5362178	136041414	-1 ACTCTGTCCTC1GGG	52.5596003	65.61446294	
136036214	1 LAGAGAAAGGAG1TGG	34.087222	51.21606041	136040973	-1 AAAATTTCTCTG1GG	59.1899113	52.16600423	136036586	1 ECTCTGTCAGTAC1GGG	50.8861867	58.29974573	136041415	-1 TCTCTGAGAAC1GGG	57.1562639	59.4623744
136036219	1 GAGAAATGAGTCTG1GG	45.912222	44.17156435	136040981	1 AACCTTGACCA1GGG	41.395350	27.25280598	136036584	-1 CTCTCTGTCAGTAC1GGG	63.657589	68.0897984	136041419	-1 AGGAACAGTGG1GGG	58.1398241	55.7678527
136036224	1 AAGAAATGCTGG1GGG	50.0837359	32.93558855	136040984	1 CAACCTTGACCA1GGG	46.52057	12.124536	136036586	-1 ATCTCTGTCAGTAC1GGG	40.7853048	43.14254045	136041422	-1 GGGCTGTCCTC1GGG	61.9017837	56.07626762
136036225	1 AAGAAATGCTGG1GGG	55.623282	52.2101938	136040985	1 GGGCTGACCC1GGG	50.318/15	41.9655028	136036586	1 ECTCTCTGTCAG1GGG	78.1759369	56.09290049	136041391	-1 ACTCTACCCATC1TGG	53.2355154	51.26181003
136036232	1 IC1C1GAG1GAGG1GGG	17.8516962	46.55977708	136041000	1 TGGAGGCTGAG1GGG	38.3765931	31.39855028	136036586	-1 TGCAGGACAGTAC1TGG	68.66682168	136041392	1 GYCCACACTC1GGG	58.7537455	60.66433307	
136036233	1 TCTCTGTCAGC1GGG	43.3170179	51.36265033	136041118	-1 GCGCTGGAAGG1GGG	61.3218857	51.73440029	136036586	1 ACGAGCTGTCAG1GGG	64.4541389	57.5362178	136041414	-1 ACTCTGTCCTC1GGG	52.5596003	65.61446294
136036234	1 TGGGGAGGAGTGG1GG	51.5619443	63.73935048	136041130	-1 CAGCAGGACAG1GGG	64.3741959	50.31036267	136036587	1 ECTCTGTCAGTAC1GGG	50.8861867	58.29974573	136041415	-1 TCTCTGAGAAC1GGG	57.1562639	59.4623744
136036250	1 ATGGGGTCTGAGC1GGG	61.605816	61.05522635	136041131	-1 AGCTGGACAG1GGG	64.305935	57.3762682	136036587	1 ECTCTGTCAGGAG1GGG	59.2532019	59.3038347	136041401	-1 TGGAGGATAG1GGG	58.5586786	42.05223864
136036261	-1 AAGCAGCTGG1GGG1GGG	56.4040939	45.04568349	136041135	1 TGGAGCCTGG1GGG	48.586566	55.69481811	136036587	-1 ATCTCTGTCAGTAC1GGG	47.8494681	10.1940145	136041422	-1 TCTCTGAAATG1GGG	69.4095309	51.21895568
136036268	-1 CTACAGCTGG1GGG1GGG	53.5678626	52.9910746	136041137	1 TGCAGGACAG1GGG	48.4473945	37.72965447	136036587	1 ECTCTCTGTCAG1GGG	49.3519514	61.02059977	136041422	-1 TGCAGCTGAG1GGG	61.2031925	52.4805723
136036275	1 ATCTGGGACAC1GGG	59.328/04	49.2078867	136041138	1 AGGCCAGCAAC1GGG	27.911540	51.39840988	136036586	1 ECTCTGTCAGTAC1GGG	64.813737	61.02059977	136041422	-1 TGCAGCTGAG1GGG	46.7635868	37.7765038
136036283	1 TCTCTGTCAGC1GGG	52.1416156	53.63365351	136041147	1 GAGCTGAGC1GGG	55.6739379	25.11606349	136036586	1 ECTCTGTCAGTAC1GGG	65.2062114	50.03399538	136041423	-1 TCTCTGAGAAC1GGG	59.1407989	44.28771730
136036289	1 CTGAGAGCTGGGG1GGG	71.369886	67.58318189	136041148	1 AGGCCAGAC1GGG	53.05404914	32.0399956	136036586	1 ECTCTGTCAGTAC1GGG	57.1198803	45.52568225	136041424	-1 TCTCTGAGAAC1GGG	52.8288057	67.38589022
136036293	1 TGGGGAGGAGTGG1GG	68.175531	55.69319155	136041149	1 GGGCAAGGG1GGG	53.0297559	49.50051172	136036587	1 ECTCTGTCAGTAC1GGG	53.439861	41.29974453	136041425	-1 GCTCTGACCTA1GGG	63.0701548	55.7678527
136036292	1 TCTCTGTCAGTGG1GGG	61.7740446	45.91550456	136041156	1 ECTCTGTCAGTAC1GGG	53.644933	47.8780791	136036586	-1 CTCTCTGTCAGTAC1GGG	60.3510189	57.3038347	136041401	-1 TGGAGGATAG1GGG	58.5586786	42.05223864
136036303	1 TCTCTGTCAGTGG1GGG	57.3153887	61.15065031	136041156	1 TGCAGGACAG1GGG	60.493773	47.7211153	136036587	-1 ATCTCTGTCAGTAC1GGG	67.0352019	10.1588919	136041422	-1 TCTCTGAAATG1GGG	69.4095309	51.21895568
136036307	1 ATGAGCTGTCATG1TGG	52.9184074	38.05650023	136041157	1 TGCAGGACAG1GGG	67.0317736	41.1774717	136036587	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.0315213	10.1588919	136041422	-1 TGCAGCTGAG1GGG	61.2031925	52.4805723
136036319	1 ATCTCTGTCAGTGG1GGG	56.0309368	44.96278988	136041158	-1 TCTCTGTCAGTGG1GGG	67.0317736	41.1774717	136036587	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.0315213	10.1588919	136041422	-1 TGCAGCTGAG1GGG	61.2031925	52.4805723
136036319	1 TGAATGTTGGC1GGG	77.7413923	24.1999563	136041159	-1 TGCAGGACAG1GGG	77.7413923	51.45251714	136036587	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.0315213	10.1588919	136041422	-1 TGCAGCTGAG1GGG	61.2031925	52.4805723
136036323	1 TGAATGTTGGC1GGG	51.7077079	24.1999563	136041161	-1 TGCAGGACAG1GGG	51.7077079	41.17746243	136036587	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	51.7077079	10.1588919	136041422	-1 TGCAGCTGAG1GGG	61.2031925	52.4805723
136036324	1 TGAATGTTGGC1GGG	51.7077079	24.1999563	136041162	-1 TGCAGGACAG1GGG	51.7077079	41.17746243	136036587	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	51.7077079	10.1588919	136041422	-1 TGCAGCTGAG1GGG	61.2031925	52.4805723
136036344	1 GGCACATCACTGAG1GGG	59.5281929	38.72836639	136042123	-1 ACCGGATG1GGG	73.6542584	48.46363877	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 GGGCTGGGAG1GGG	59.3103996	75.6526703
136036440	1 TACAGCTTACATGAG1GGG	42.204026	51.45215811	136042124	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	65.5380346	45.5757648	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036443	1 TTAACCTTACATGAG1GGG	67.615274	53.23520621	136042127	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	64.3263935	47.72635079	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036448	1 TTAACCTTACATGAG1GGG	55.087283	63.23250621	136042127	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	64.3263935	47.72635079	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036455	1 TACAGCTTACATGAG1GGG	54.5270279	63.3193566	136042126	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	64.3263935	47.72635079	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036456	1 TACAGCTTACATGAG1GGG	54.5270279	63.3193566	136042126	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	64.3263935	47.72635079	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036457	1 TACAGCTTACATGAG1GGG	54.5270279	63.3193566	136042126	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	64.3263935	47.72635079	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036458	1 TACAGCTTACATGAG1GGG	54.5270279	63.3193566	136042126	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	64.3263935	47.72635079	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036459	1 TACAGCTTACATGAG1GGG	54.5270279	63.3193566	136042126	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	64.3263935	47.72635079	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036460	1 TACAGCTTACATGAG1GGG	54.5270279	63.3193566	136042126	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	64.3263935	47.72635079	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036464	1 TACAGCTTACATGAG1GGG	54.5270279	63.3193566	136042126	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	64.3263935	47.72635079	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036469	1 TACAGCTTACATGAG1GGG	54.5270279	63.3193566	136042126	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	64.3263935	47.72635079	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036474	1 TACAGCTTACATGAG1GGG	54.5270279	63.3193566	136042126	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	64.3263935	47.72635079	136036586	-1 TCTCTGTCAGTAC1GGG	67.034152	37.05460273	136041218	-1 AAGAGCTGAG1GGG	56.0523045	65.62564546
136036479	1 TACAGCTTACATGAG1GGG	54.5270													

【図 2 1 - 1 0】

Figure 21 (continued)

13603739	1	ACCAAGTGTGCGGATGG	59.6418932	56.0570497	136042732	-1	AGCTTACATCTT TGG	53.9316199	24.297769	136038203	1	ACAAAGGAAATTAA TGG	48.050953	40.0202886	136043620	-1	TGAGGGCTTACCG CGG	77.8395524	51.9337783
13603740	1	GGACAGGACCTGGATGG	62.3186359	69.4808069	136042753	-1	AGCTTACATCTT TGG	53.7702434	49.77921054	136038227	-1	TCTTACCCAGGTAGGG	41.2211601	58.36326605	136043616	1	GCACACCCACCG AGG	91.6096269	52.66.0495
13603744	-1	GTATTAATATTTT TGG	55.1503282	54.1084032	136042761	-1	CTAACTGTCG CGG	54.8274962	53.847267387	136038231	1	ACATGACCATCTG TGG	73.6487033	49.9654874	13604362	1	CTCATCTACCG CGG	84.2277401	61.29883267
13603745	-1	AGTATTAATATTT TGG	53.6296438	36.6295043	136042762	-1	GTCAAGATGCG CGG	59.3259576	44.03020845	136038232	1	CATAGACCATCTG TGG	73.087197	61.78139676	136043627	-1	AAATCCCAAGGAGG	55.463854	55.85233856
13603748	1	AGGATTAATAGCA AGG	57.5020381	55.7188572	136042767	-1	GTACGACATGG TGG	67.5415364	67.97338024	136038233	1	AGTACGACATGTG TGG	70.184414	72.15084326	136043628	1	GGGAGACCTCTG TGG	61.445972	49.93344853
13603749	-1	TTCCCGATGCGCTT AGG	49.0821641	49.3084316	136042768	-1	ACAGAACTGCG CGG	72.9138393	42.249.7678	136038235	1	LeucagatGCTTAC TGG	87.7155623	70.5737625	136043629	1	GGTACGCTTAC CGG	59.013728	63.26678152
13603750	1	TGCTTACGGGGATGG	47.61243876	15.3477693	136042801	-1	GTGTTACATCTG TGG	67.5698557	136042804	136038246	1	ACAGGAGGGAAAGG	83.495305	66.2296975	136043629	-1	TGCTTAAACCC AGG	81.1851189	49.6672248
13603750	1	GGCTTCTGGCGAAGG	57.1332096	27.9483896	136042804	-1	CTGATGATTCG CGG	53.6303303	61.24481748	136038249	1	CTGCGGATGAGCT CGG	60.1666076	61.74674797	136043630	1	TTCAGCAACGCT TGG	56.1772724	38.4973301
13603751	1	CTGATGATTCG CGG	45.9352349	52.71613197	136042805	-1	CTGATGATCTG CGG	52.6622776	55.7190956	136038250	1	CTGATGATCTG CGG	50.771219	71.8520716	136043632	1	GTTCATGACAC AGG	50.4708546	35.38137201
13603750	1	ACTGCGGAGCAGT CGG	70.3371908	61.8323029	136042806	-1	CTGCTGATTCY CGG	61.5970228	41.8549535	136038251	1	CTGCTGATTCY CGG	63.3029151	59.4527073	136043632	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603751	1	AGGAGATCTTCTG CGG	67.7808569	69.1345031	136042816	-1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.4474573	48.7669289	136038252	1	AGGAGATCTTCTG CGG	47.0064435	24.70505126	136043632	1	AGGAGATCTTCTG CGG	56.0004463	47.1865581
13603751	-1	ACCAAGGATGCG CGG	71.4931143	38.5070889	136042852	-1	ATTAATTCAGG CGG	81.620274	60.4957518	136038257	1	ATTAATTCAGG CGG	63.7802666	33.95872747	136043644	42.10578011	3.1TTTAAATATAT TGG	49.1959546	42.50780811
13603752	1	GACCAAGGATGCG CGG	73.803755	27.34955668	136042854	-1	CTTAACTATGG CGG	82.2018428	33.4807197	136038257	1	CTTAACTATGG CGG	63.7802666	33.95872747	136043644	3.1TTTAAATATAT TGG	49.1959546	42.50780811	
13603753	1	CTTCCCTGGACCA CGG	74.1649555	39.94546634	136042866	-1	CTTCCCTGGACCA CGG	82.1020896	6.8983008	136038259	1	CTTCCCTGGACCA CGG	62.7802666	33.95872747	136043644	3.1TTTAAATATAT TGG	49.1959546	42.50780811	
13603754	1	TCTCTTATACCTG CGG	69.2087579	15.0028877	136042877	-1	CTTAACTATGG CGG	56.9329325	47.7127238	136038259	1	CTTAACTATGG CGG	60.1666076	23.5103232	136043644	3.1TTTAAATATAT TGG	49.1959546	42.50780811	
13603755	1	CTCTCTGGACCA CGG	68.2729662	33.5017546	136042886	-1	CTTAACTATGG CGG	53.592473	51.71908585	136038260	1	CTTAACTATGG CGG	50.1666076	1.1CTTAACTATGG CGG	136043644	3.1TTTAAATATAT TGG	56.8077949	39.36.047347	
13603756	-1	TCCTCTGGACCA CGG	50.36385	43.49661501	136042887	-1	CTAACTAGGCG CGG	54.942241	37.51348274	136038271	-1	CTTAACTATGG CGG	56.131675	36.6877102	136043648	1	TTTACGCTTCTG CGG	80.41648179	47.4044346
13603757	1	CCAGGACACTGG CGG	67.7808569	69.1345031	136042891	-1	AGGGAGCTTCTG CGG	81.813162	55.5226946	136038286	1	AGGGAGCTTCTG CGG	59.01311492	136043649	1	CTTAACTATGG CGG	51.3013229	47.3013229	
13603758	1	ATCTCTTCTGCTG CGG	71.7193709	22.45159184	136042911	-1	ACAGGAGGGCG CGG	81.5204705	47.1726705	136038287	1	ATTAATTCAGG CGG	60.1666076	13.1603247	136043652	1	ATTAATTCAGG CGG	50.1666076	13.1603247
13603759	1	CATCTCTGCTG CGG	73.4811515	23.52093425	136042912	-1	CTCTCTGGAGG CGG	81.7981423	40.6322075	136038287	1	CTTAACTATGG CGG	55.223969	42.6071872	136043652	1	TACAAACAGCTG CGG	69.6535529	47.07670818
13603760	1	CAAGAGGAAACGG CGG	72.2873723	52.6568809	136042916	-1	AGGAGGAAACGG CGG	80.0942916	1.1AGGAGGAAACGG CGG	136038288	1	AGGAGGAAACGG CGG	53.3045444	13.1603246	136043652	1	AGGAGGAAACGG CGG	70.6052039	55.42465073
13603761	1	CTTCTCTGCTG CGG	73.0071577	15.0028877	136042917	-1	CTTAACTATGG CGG	56.9329325	47.7127238	136038289	1	CTTAACTATGG CGG	60.1666076	23.5103232	136043652	3.1TTTAAATATAT TGG	56.8077949	39.36.047347	
13603762	1	CTCTCTGGACCA CGG	73.71613197	13.1602805	136042920	-1	CTTAACTATGG CGG	56.9329325	47.7127238	136038290	1	CTTAACTATGG CGG	60.1666076	1.1CTTAACTATGG CGG	136043652	3.1TTTAAATATAT TGG	56.8077949	39.36.047347	
13603763	1	ACTGCGGAGCAGT CGG	70.3371908	61.8323029	136042921	-1	CTGCTGATTCY CGG	61.5970228	41.8549535	136038291	1	CTGCTGATTCY CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603764	1	CCAGGACACTGG CGG	70.3371908	61.8323029	136042929	-1	CTGCTGATTCY CGG	61.5970228	41.8549535	136038292	1	CTGCTGATTCY CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603765	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603766	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603767	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603768	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603769	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603770	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603771	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603772	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603773	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603774	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603775	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603776	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603777	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603778	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603779	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG CGG	63.3029151	59.4527073	136043652	1	AGGAGATCTTCTG CGG	50.1353537	45.25105156
13603780	1	AGGAGATCTTCTG CGG	68.991392	45.9310625	136042931	-1	CTGGAGGAACTGG CGG	56.9329325	32.5559582	136038293	1	AGGAGATCTTCTG							

【 図 2-2 - 2 】

Figure 22 (continued)

【図24】

Figure 24. TGF β 1領域におけるインtron5～6のための例示的ガイド配列

【 図 2-2 - 3 】

Figure 22 (continued)

卷二

【圖 2

【図25-1】

【図 2-5-2】

Figure 25 (continued)

【図25-3】

Figure 2.5 (continued)

【図29】

Figure 29. TGF β 1領域におけるインtron 10~11のための例示的ガイド配列

Figure 31. TGF β 1領域におけるインターフィン

【 図 3 0 】

Figure 30. TGFBI領域におけるインtron 11~12のための例示的ガイド配列

Figure 3 (continued)		
136057/32	1 taggart/ridge/088	483
136057/33	1 taggart/ridge/0881	483
136057/34	1 taggart/ridge/089	483

15669/151	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	78.171171	81.969178 1.969180 9.7	1. <i>Geogaea</i>
15669/152	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	78.267803	79.221108 1.969181	1. <i>Geogaea</i>
15669/153	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	78.364435	79.328118 1.969182	1. <i>Geogaea</i>
15669/154	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	78.461067	79.434828 1.969183	1. <i>Geogaea</i>
15669/155	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	78.557700	79.541538 1.969184	1. <i>Geogaea</i>
15669/156	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	78.654332	79.648248 1.969185	1. <i>Geogaea</i>
15669/157	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	78.750964	79.754958 1.969186	1. <i>Geogaea</i>
15669/158	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	78.847600	79.861668 1.969187	1. <i>Geogaea</i>
15669/159	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	78.944232	79.968378 1.969188	1. <i>Geogaea</i>
15669/160	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	79.040864	80.075088 1.969189	1. <i>Geogaea</i>
15669/161	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	79.137500	81.181798 1.969190	1. <i>Geogaea</i>
15669/162	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	79.234132	81.288508 1.969191	1. <i>Geogaea</i>
15669/163	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	79.330764	81.395218 1.969192	1. <i>Geogaea</i>
15669/164	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	79.427400	81.499928 1.969193	1. <i>Geogaea</i>
15669/165	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	79.524032	81.606638 1.969194	1. <i>Geogaea</i>
15669/166	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	79.620664	81.713348 1.969195	1. <i>Geogaea</i>
15669/167	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	79.717300	81.810058 1.969196	1. <i>Geogaea</i>
15669/168	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	79.813932	81.916768 1.969197	1. <i>Geogaea</i>
15669/169	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	79.910564	82.013478 1.969198	1. <i>Geogaea</i>
15669/170	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	80.007200	82.110188 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/171	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	80.103832	82.216898 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/172	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	80.197464	82.313608 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/173	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	80.294100	82.410318 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/174	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	80.387732	82.507028 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/175	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	80.484364	82.603738 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/176	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	80.581000	82.700448 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/177	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	80.677632	82.797158 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/178	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	80.774264	82.893868 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/179	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	80.870900	82.990578 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/180	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	80.967532	83.087288 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/181	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	81.064164	83.183998 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/182	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	81.160800	83.280708 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/183	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	81.257432	83.377418 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/184	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	81.354064	83.474128 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/185	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	81.450700	83.570838 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/186	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	81.547332	83.667548 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/187	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	81.643964	83.764258 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/188	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	81.740600	83.860968 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/189	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	81.837232	83.957678 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/190	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	81.933864	84.054388 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/191	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	82.030500	84.151098 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/192	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	82.127132	84.247808 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/193	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	82.223764	84.344518 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/194	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	82.320400	84.441228 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/195	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	82.417032	84.537938 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/196	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	82.513664	84.634648 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/197	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	82.610300	84.731358 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/198	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	82.706932	84.828068 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/199	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	82.803564	84.924778 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/200	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	82.899996	85.021488 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/201	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	83.096628	85.118198 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/202	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	83.193260	85.214908 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/203	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	83.289892	85.311618 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/204	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	83.386524	85.408328 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/205	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	83.483156	85.505038 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/206	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	83.579788	85.597748 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/207	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	83.676420	85.694458 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/208	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	83.773052	85.791168 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/209	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	83.869684	85.887878 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/210	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	83.966316	85.984588 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/211	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	84.062948	86.081298 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/212	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	84.159580	86.177908 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/213	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	84.256212	86.274618 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/214	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	84.352844	86.371328 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/215	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	84.449476	86.468038 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/216	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	84.546108	86.564748 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/217	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	84.642740	86.661458 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/218	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	84.739372	86.758168 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/219	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	84.836004	86.854878 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/220	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	84.932636	86.951588 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/221	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	85.029268	87.048298 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/222	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	85.125900	87.144908 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/223	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	85.222532	87.241618 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/224	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	85.319164	87.338328 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/225	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	85.415796	87.435038 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/226	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	85.512428	87.531748 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/227	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	85.609060	87.628458 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/228	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	85.705692	87.725168 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/229	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	85.792324	87.821878 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/230	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	85.888956	87.918588 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/231	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	85.985588	88.015298 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/232	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	86.082220	88.111908 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/233	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	86.178852	88.208618 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/234	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	86.275484	88.305328 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/235	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	86.372116	88.392038 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/236	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	86.468748	88.488748 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/237	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	86.565380	88.585458 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/238	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	86.662012	88.682168 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/239	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	86.758644	88.778878 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/240	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	86.855276	88.875588 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/241	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	86.951908	88.972298 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/242	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	87.048540	89.068908 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/243	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	87.145172	89.165618 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/244	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	87.241804	89.262328 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/245	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	87.338436	89.359038 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/246	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	87.435068	89.455748 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/247	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	87.531700	89.552458 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/248	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	87.628332	89.649168 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/249	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	87.724964	89.745878 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/250	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	87.821596	89.842588 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/251	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	87.918228	89.939298 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/252	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	88.014860	90.035908 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/253	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	88.111492	90.132618 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/254	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	88.208124	90.229328 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/255	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	88.294756	90.326038 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/256	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	88.391388	90.422748 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/257	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	88.487920	90.519458 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/258	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	88.584552	90.616168 1.969199	1. <i>Geogaea</i>
15669/259	1. <i>Geogaea</i> (<i>Geogaea</i>) <i>Geogaea</i>	166	88.6		

【 図 3-1-3 】

【図3-2-1】

Figure 31 (continued)

【図 3-2-2】

図 3-4-1

Figure 12 (continued)

Figure 33. TGFBI領域に

136060956 -1 0011000100
136060957 -1 0011000101

136061160 136061161 136061162

【図3-4】

Figure 34 (continued)

【図35】

Figure 35. TGFBI領域におけるインtron16~17のための例示的ガイド配列

【配列表】

201952414900001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/47861
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/63, 15/85, 9/22; C12Q 1/68 (2017.01) CPC - C12Q 2600/156, 1/6883; C12N 15/85, 9/22, 2310/20		
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) See Search History Document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	Courtney et al. CRISPR/Cas9 DNA cleavage at SNP-derived PAM enables both in vitro and in vivo KRT12 mutation-specific targeting. Gene Ther Vol 23 No 1 Pages 108-112. Especially abstract, pg 108 col 1 para 1, pg 109 col 1 para 2, pg 109 fig 1, pg 110 col 2 para 2, Supplemental table 1 [online]	1, 2, 4-6 ----- 3
Y	US 2015/0044772 A1 (Sage Labs, Inc.) 12 February 2015 (12.02.2015). Especially para [0106]. SEQ ID NO: 3	3
A	US 2016/0168592 A1 (President and Fellows of Harvard College) 16 June 2016 (16.06.2016). Especially claim 1	4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 October 2016	Date of mailing of the international search report 29 DEC 2017	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/47861
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13<i>ter.</i> 1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13<i>ter.</i> 1(a)). <input checked="" type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13<i>ter.</i> 1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments: GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOS: 10, 11</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/47861
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 7-20, 24-37, 41-56 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: ---Go to Extra Sheet for continuation-----		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Claims 1-6
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 17/47861

Continuation of Box III: Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-6, drawn to a sgRNA composition designed for CRISPR/Cas9 system genome editing for preventing, ameliorating or treating corneal dystrophies.

Group II: Claims 21-23, 38-40, drawn to administrating an engineered CRISPR/Cas9 system for treating corneal dystrophies.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I has the special technical feature of a composition of a sgRNA or a pair of sgRNAs, not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a method of administrating an engineered CRISPR/Cas9 system, not required by Group I.

Common Technical Features:

Groups I and II share the common technical features of:

1. One or more sgRNAs designed for CRISPR/Cas9 system for preventing or treating corneal dystrophies.

2. (i) a first CRISPR targeting RNA (crRNA) sequence that hybridizes to a nucleotide sequence complementary to a first target sequence, the first target sequence being adjacent to the 5'-end of a first protospacer adjacent motif (PAM) at 3'-end side of a disease-causing mutation or SNP in *cis*, wherein the first target sequence or the first PAM comprises a first ancestral mutation or SNP site.

(ii) a second crRNA sequence that hybridizes to a nucleotide sequence complementary to a second target sequence, the second target sequence being adjacent to the 5'-end of a second PAM at 5'-end side of a disease-causing mutation or SNP in *cis*, wherein the second target sequence or the second PAM comprises a second ancestral mutation or SNP site,

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is obvious over the publication titled "CRISPR/Cas9 DNA cleavage at SNP-derived PAM enables both *in vitro* and *in vivo* KRT12 mutation-specific targeting" by Courtney et al. (hereinafter "Courtney") [ePub 20 August 2015 in Gene Ther Vol 23 No 1 Pages 108-112].

As to common technical feature #1, Courtney teaches a sgRNA designed for CRISPR/Cas9 system for preventing or treating corneal dystrophies (abstract; "We determined that a mutation within KRT12, which causes Meesmann's epithelial corneal dystrophy (MECD), leads to the occurrence of a novel protospacer adjacent motif (PAM). We designed an sgRNA complementary to the sequence adjacent to this SNP-derived PAM and evaluated its potency and allele specificity both *in vitro* and *in vivo*. This sgRNA was found to be highly effective at reducing the expression of mutant KRT12 mRNA and protein *in vitro*. To assess its activity *in vivo* we injected a combined Cas9/sgRNA expression construct into the corneal stroma of a humanized MECD mouse model. Sequence analysis of corneal genomic DNA revealed non-homologous end-joining repair resulting in frame-shifting deletions within the mutant KRT12 allele. This study is the first to demonstrate *in vivo* gene editing of a heterozygous disease-causing SNP that results in a novel PAM, further highlighting the potential for CRISPR/Cas9-based therapeutics").

As to common technical feature #2(i), Courtney teaches a first CRISPR targeting RNA (crRNA) sequence that hybridizes to a nucleotide sequence complementary to a first target sequence, the first target sequence being adjacent to the 5'-end of a first protospacer adjacent motif (PAM) at 3'-end side of a disease-causing mutation or SNP in *cis*, wherein the first target sequence or the first PAM comprises a first ancestral mutation or SNP site (pg 109 col 1 para 2; An analysis of the sequence changes that result from MECD causing KRT12 missense mutations revealed that the L132P mutation that causes the severe form of MECD coincidentally results in the generation of a novel PAM site (AAG4AGG). An sgRNA (sgK12LP) complementary to the sequence 20 nucleotides adjacent to the 5'-end of the novel PAM site generated by the KRT12 L132P mutation was designed"; pg 109 fig 1; Design of sgRNAs for targeting wild-type and mutant K12 alleles. An sgRNA to use the SNP-derived PAM found on the K12- L132P allele was designed (red). This PAM is absent from the wildtype allele").

-----continued on next sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/47861

-----continued from previous sheet-----

Courtney does not teach common technical feature #2(ii). However, Courtney does teach multiple cornea dystrophy related mutations resulting in novel PAM mutations (pg 110 col 2 para 2; This research demonstrates the potential for exploitation of these SNP-derived PAMs in the development of personalized therapeutics for dominantly inherited conditions. A review of dystrophic mutations in KRT3, KRT12, TGFBI and COL8A2 showed that of the 76 known missense mutations, 27 (36%) resulted in the manifestation of a novel PAM supporting the potential to use these SNP-derived PAMs in the advancement of novel gene therapies"). Since multiplex CRISPR/Cas9 gene editing was well-known in the art, it would have been obvious that a second crRNA sequence that hybridizes to a nucleotide sequence complementary to a second target sequence, the second target sequence being adjacent to the 5'-end of a second PAM at 5'-end side of a disease-causing mutation or SNP in cis, wherein the second target sequence or the second PAM comprises a second ancestral mutation or SNP site could have been designed and utilized simultaneously with that taught by Courtney common technical feature #2(i).

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common special technical features that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note concerning item 4: Claims 7-20, 24-37, 41-56 are multiple dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/74 (2015.01)	A 6 1 K 35/74	D
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	

(31) 優先権主張番号 62/501,750

(32) 優先日 平成29年5月5日(2017.5.5)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(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,R0,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,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

(72) 発明者 ムーア タラ

アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア メンロー パーク アダムズ ドライブ 1 5 0
5 シー / オー アベリノ ラボ ユーエスエー インコーポレイテッド

(72) 発明者 ネスピット アンドリュー

アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア メンロー パーク アダムズ ドライブ 1 5 0
5 シー / オー アベリノ ラボ ユーエスエー インコーポレイテッド

(72) 発明者 コートニー デイビッド

アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア メンロー パーク アダムズ ドライブ 1 5 0
5 シー / オー アベリノ ラボ ユーエスエー インコーポレイテッド

(72) 発明者 クリストファー ケイティー

アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア メンロー パーク アダムズ ドライブ 1 5 0
5 シー / オー アベリノ ラボ ユーエスエー インコーポレイテッド

(72) 発明者 リー ジーン

アメリカ合衆国 9 4 0 2 5 カリフォルニア メンロー パーク アダムズ ドライブ 1 5 0
5 シー / オー アベリノ ラボ ユーエスエー インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4C084 AA13 MA58 MA67 NA14 ZA331 ZA332 ZC411 ZC412

4C087 AA01 AA02 BB65 BC61 BC70 BC83 CA08 CA12 MA58 MA67
NA14 ZA33 ZC41
4H045 AA10 BA10 CA40