

(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 I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z N A Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 H 0 4 5
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 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)
 (86) (22) 出願日 平成29年8月21日 (2017.8.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年4月19日 (2019.4.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/047861
 (87) 国際公開番号 W02018/039145
 (87) 国際公開日 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)

(71) 出願人 515179406
 アベリノ ラボ ユーエスエー インコー
 ポレイテッド
 Avellino Lab USA, Inc.
 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
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所

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ンドロームリピート (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

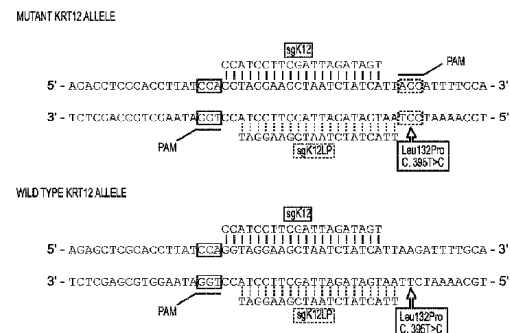


Figure 1

【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 RNA (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 RNA (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Spacer-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 遺伝子のイントロン中に存在する、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 lind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 8 5 % 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 1 0 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 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 9 ~ 1 1 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 ~ 1 2 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 ~ 1 3 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 ~ 1 4 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 ~ 1 5 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 1 6 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 1 6 又は 1 7 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 1 6 又は 1 7 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 1 6 ~ 1 9 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、
(i i) 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 2 2】

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 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

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 2 1 又は 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 c r R N A 配列は、配列番号 (1 0 + 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からなる、請求項 2 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 5】

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 2 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

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 2 1 ～ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

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 2 1 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 2 8】

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 2 1 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

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 2 1 ～ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

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 2 1 ～ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 3 1】

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 2 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

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、

(i) 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 P r o、P h e 5 1 5 L e u、L e u 5 1 8 P r o、L e u 5 1 8 A r g、L e u 5 2 7 A r g、T h r 5 3 8 P r o、T h r 5 3 8 A r g、V a l 5 3 9 A s p、P h e 5 4 0 d e l、P h e 5 4 0 S e r、A s n 5 4 4 S e r、A l a 5 4 6 T h r、A l a 5 4 6 A s p、P h e 5 4 7 S e r、P r o 5 5 1 G l n、L e u 5 5 8 P r o、H i s 5 7 2 d e l、G l y 5 9 4 V a l、V a l 6 1 3 d e l、V a l 6 1 3 G l y、M e t 6 1 9 L y s、A l a 6 2 0 A s p、A s n 6 2 2 H i s、A s n 6 2 2 L y s、A s n 6 2 2 L

40

50

ys、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を含む突然変異TGFBITANPAK質、

(ii)Glu498Val、Arg503Pro、及び/又はGlu509Lysを有する突然変異KRT3タンパク質、

(iii)Met129Thr、Met129Val、Gln130Pro、Leu132Pro、Leu132Val、Leu132His、Asn133Lys、Arg135Gly、Arg135Ile、Arg135Thr、Arg135Ser、Ala137Pro、Leu140Arg、Val143Leu、Val143Leu、Lle391__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)Asp214Tyrを有する突然変異GSNTANPAK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、請求項21～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

(i)前記遺伝子突然変異若しくは前記SNPを含む突然変異配列は、Arg124Cysを含む突然変異TGFBITANPAK質をコードし、かつ前記crRNA配列は、配列番号58、配列番号54、配列番号50、若しくは配列番号42を含み、

(ii)前記遺伝子突然変異若しくは前記SNPを含む突然変異配列は、Arg124Hisを含む突然変異TGFBITANPAK質をコードし、かつ前記crRNA配列は、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、若しくは配列番号70を含み、

(iii)前記遺伝子突然変異若しくは前記SNPを含む突然変異配列は、Arg124Leuを含む突然変異TGFBITANPAK質をコードし、かつ前記crRNA配列は、配列番号114、配列番号110、配列番号106、若しくは配列番号98を含み、

(iv)前記遺伝子突然変異若しくは前記SNPを含む突然変異配列は、Arg555Glnを含む突然変異TGFBITANPAK質をコードし、かつ前記crRNA配列は、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、若しくは配列番号158を含み、

(v)前記遺伝子突然変異若しくは前記SNPを含む突然変異配列は、Arg555Trpを含む突然変異TGFBITANPAK質をコードし、かつ前記crRNA配列は、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、若しくは配列番号126を含み、及び/又は、

(vi)前記遺伝子突然変異若しくは前記SNPを含む突然変異配列は、Leu527Argを含む突然変異TGFBITANPAK質をコードし、かつ前記crRNA配列は、配列番号474、配列番号478、配列番号482、若しくは配列番号486を含む、

請求項21～32のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 34】

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 35】

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 36】

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。

【請求項 37】

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 38】

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、

(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、天然と一緒に存在する 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。

【請求項 39】

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 40】

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 遺伝子のイントロン中に存在する、請求項 3 8 又は 3 9 に記載の方法。

【請求項 41】

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。

【請求項 42】

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 43】

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

／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 - 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、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 P r o、P h e 5 1 5 L e u、L e u 5 1 8 P r o、L e u 5 1 8 A r g、L e u 5 2 7 A r g、T h r 5 3 8 P r o、T h r 5 3 8 A r g、V a l 5 3 9 A s p、P h e 5 4 0 d e l、P h e 5 4 0 S e r、A s n 5 4 4 S e r、A l a 5 4 6 T h r、A l a 5 4 6 A s p、P h e 5 4 7 S e r、P r o 5 5 1 G l n、L e u 5 5 8 P r o、H i s 5 7 2 d e l、G l y 5 9 4 V a l、V a l 6 1 3 d e l、V a l 6 1 3 G l y、M e t 6 1 9 L y s、A l a 6 2 0 A s p、A s n 6 2 2 H i s、A s n 6 2 2 L y s、A s n 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】

前記病変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、

(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、

20

(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】

【技術分野】

30

【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的に遺伝する。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改変する機会を与える。

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ラーゼであり、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エンドヌクラーゼは、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を組み合わせると一本鎖ガイド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、該エンドヌクラーゼが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標的の不変の部分であるが、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）。

10

20

30

【0004】

1つの態様において、本開示は、アレルト異的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ト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

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)トランス活性化型crRNA (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。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。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ヌ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)病因性突然変異又は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)病因性突然変異又は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、TGFB1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、TGFB1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、TGFB1遺伝子の隣り合ったイントロン中にあり、上記病因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ヌ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ヌクレオチド配列を含む。

20

30

【0008】

別の態様において、本開示は、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ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド分子と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。幾つかの実施の形態において、本明細書に記載されるCas9ヌクレアーゼは、Slaymaker et al., 2016 Science, 351(6268), 84-88に記載される強化型Cas9ヌクレアーゼであり得る。更なる実施の形態において、上記Cas9ヌクレアーゼは、ストレプトコッカスに由来する。なおも更なる実施の形態において、上記Cas9ヌクレアーゼは、ストレプトコッカス・ピオゲネス(Streptococcus pyogenes)(Spy)、ストレプト

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・シュードボルシヌス (*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・シュードボルシヌス (*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 gordonii*)、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 *Cas9* 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 *Cas9* 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. condimentii*)、*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* (*S. simulans*)、*S. カピティス* (*S. capitis*)、*S. カブラエ* (*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. ネバレンシス* (*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* (*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。更なる実施の形態において、上記 *Cas9* 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、*Cas9* 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 *CRISPR/Cas9* 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 (*NLS*) を除く、又は更に含む。更なる実施の形態において、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。

【0009】

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 *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。幾つかの実施の形態において、上記操作された *CRISPR*

10

20

30

40

50

/ C a s 9 システムは、(a) 上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、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 s g R N A は、上記標的配列を標的とし、かつ上記 C a s 9 ヌクレアーゼは、上記 D N A 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 (P A M) 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 s g R N A は、C a s 9 ヌクレアーゼにより認識される P A M 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 s g R N A は、1 6 ヌクレオチド配列から 2 5 ヌクレオチド配列までの長さを有し、又は 1 6 個、1 7 個、1 8 個、1 9 個、2 0 個、2 1 個、2 2 個、2 3 個、2 4 個、若しくは 2 5 個のヌクレオチドを有する。

【 0 0 1 0 】

別の態様において、本開示は、被験体における一塩基多型 (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、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 D N A 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 D N A 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 S N P 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 S N P 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。

【 0 0 1 1 】

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 P A M は、突然変異部位又は S N P 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 s g R N A は、上記標的配列と少なくとも約 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、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。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。更なる実施の形態において、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。

【 0 0 1 2 】

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 S N P を含む突然変異配列は、(i) 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 P r o、P h e 5 1 5 L e u、L e u 5 1 8 P r o、L e u 5 1 8 A r g、L e u 5 2 7 A r g、T h r 5 3 8 P r o、T h r 5 3 8 A r g、V a l 5 3 9 A s p、P h e 5 4 0 d e l、P h e 5 4 0 S e r、A s n 5 4 4 S e r、A l a 5 4 6 T h r、A l a 5 4 6 A s p、P h e 5 4 7 S e r、P r o 5 5 1 G l n、L e u 5 5 8 P r o、H i s 5 7 2 d e l、G l y 5 9 4 V a l、V a l 6 1 3 d e l、V a l 6 1 3 G l y、M e t 6 1 9 L y s、A l a 6 2 0 A s p、A s n 6 2 2 H i s、A s n 6 2 2 L y s、A s n 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

24 Ser、Asp123delins、Arg124His、Arg124Leu、Leu509Pro、Leu103_Ser104del、Val113Ile、Asp123His、Arg124Leu、及び/又はThr125_Glu126delを含む突然変異TGFB Iタンパク質、(ii)Glu498Val、Arg503Pro、及び/又はGlu509Lysを有する突然変異KRT3タンパク質、(iii)Met129Thr、Met129Val、Gln130Pro、Leu132Pro、Leu132Val、Leu132His、Asn133Lys、Arg135Gly、Arg135Ile、Arg135Thr、Arg135Ser、Ala137Pro、Leu140Arg、Val143Leu、Val143Leu、Lle391_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)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。

10

20

【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TGFB I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、GAACCTAATTACCATGCTAA A (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TGFB I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、GAGACAATCGCTTTTAGCATG (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TGFB I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TGFB I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TGFB I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TGFB I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TGFB I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TGFB I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TGFB Iタンパク質をコードし、

30

40

50

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178、配列番号174、配列番号170、配列番号166、配列番号162、及び配列番号158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。

10

【0014】

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)病理性突然変異又は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)病理性突然変異又は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、天然と一緒に存在する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。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、17ヌクレオチド長~24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、上記病理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

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、Val113Ile、Asp123His、Arg124Leu、及び/又はThr125__Glu126delを含む突然変異TGFBITAN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

20

30

40

50

【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CRISPR/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。

【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（TBKD）、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、TGFB1、KRT3、KRT12、GSN、及びUbiA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（UBIAD1）からなる群から選択される遺伝子中に位置している。

【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。

【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

レルには存在しない。野生型及び突然変異の K 1 2 アレルの両方を標的とする第 2 の s g R N A (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 s g K 1 2 L P 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 K 1 2 のための外因性発現構築物を使用して、s g K 1 2 L P 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、s g K 1 2 L P 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 s g K 1 2 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 s g K 1 2 L P で処理された細胞中の K 1 2 - L 1 3 2 P タンパク質が、処理されたが K 1 2 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 K 1 2 に関する定量的逆転写酵素 P C R により、m R N A 発現のノックダウンが裏付けられた (N = 4)。(D) この m R N A 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 K R T 1 2 アレルを同時発現するとともに、s g K 1 2 L P 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 . 0 5、* * P < 0 . 0 1、* * * P < 0 . 0 0 1)。

【図 3】i n v i v o での s g K 1 2 L P に誘導される N H E J を示す図である。G F P 発現が、実質内注射後 2 4 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)。G F P 発現は、注射後 4 8 時間の時点では観察されなかった。s g K 1 2 L P 構築物が注射されたヒト K 1 2 - L 1 3 2 P ヘテロ接合マウス由来の g D N A のシーケンシングにより、大きな欠失と、K R T 1 2 - L 1 3 2 P アレルの開裂による N H E J の誘導とが裏付けられた。シーケンシングされた 1 3 個のクローンのうち、5 個が N H E J を経たことが判明した (B)。

【図 4】T G F B I 突然変異 R 5 1 4 P (A)、L 5 1 8 R (B)、L 5 0 9 R (C)、L 5 2 7 R (D) のためにデザインされた S N P に誘導される P A M のガイド R N A 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 (s g W T) のガイドは、野生型 (W T、青色の棒) アレル及び突然変異型 (M U T、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。L 5 1 8 R のために使用されるガイド (s g M u t) は、最大のアレル特異性と共に W T 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 (s g N S C) は、予想通りに W T の D N A も M U T の D N A もどちらも切断しなかった。

【図 5】項目 A ~ 項目 E は、R 1 2 4 及び R 5 5 5 の T G F B I 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 R N A 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、1 6 マーから 2 2 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 ' 末端への二重のグアニンの付加も評価した。青色の棒は、W T の T G F B I 配列を表し、橙色の棒は、突然変異の T G F B I 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)。R 1 2 4 (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、R 1 2 4 H 突然変異の 2 0 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 C a s 9 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、D N A が開裂されたことを確認するための C a s 9 による i n v i t r o 開裂からの断片分析を示す。6 種の共通の T G F B I 突然変異 (例えば、R 1 2 4 C、R 1 2 4 H、R 1 2 4 L、R 5 5 5 Q、R 5 5 5 W、及び L 5 2 7 R) 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 R N A 分子 (2 0 ヌクレオチド及び 1 8 ヌクレオチド) をデザ

10

20

30

40

50

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、それらの結果は、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じ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)、その他の細胞は、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、ここでは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DSB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。スパーサー又は「ガイド」配列は青色で示され、その後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・アウレウス垂種アウレウスの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細胞系統及び(D)Hepa1-6細胞系統において、様々なりピート：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

a s 9 (B B) - 2 A - P u r o (P X 4 5 9) を含む C R I S P R / C a s 9 システムのための例示的なベクターを示す図である。

【図 1 2】スタフィロコッカス・アウレウスを使用する C R I S P R / C a s 9 システムのための例示的なベクター 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 を示す図である。

【図 1 3】ストレプトコッカス・ピオゲネス (S p y) 及びスタフィロコッカス・アウレウス (S a u) からの C a s 9 ヌクレアーゼの例示的な s g R N A 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 1 4】C a s 9 開裂を導く 1 対の s g R N A と密集しているメースマン角膜ジストロフィー (M E C D) 関連 K R T 1 2 突然変異の H D R 媒介型修復のための例示的デザインを示す図である。図 1 4 に示される修復オリゴ (s s O D N) は、L 1 3 2 P 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も働くこととなる。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、P A M 部位を再コード化するため C a s 9 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 1 5】新規 P A M を生成する 1 0 % より大きな M A F を有する T G F B I における全ての S N P を示す図である。番号付けされたボックスは、T G F B I 内のエキソンを示す。多数の病理性突然変異が見られる T G F B I 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 P A M を生成する S N P の位置を示す。新規 P A M 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 1 6】隣接 S N P による新規 P A M を利用する s g R N A 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 s g R N A 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 s g R N A は、第 2 のイントロン中に N H E J 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 S N P に誘導される P A M を利用する s g R N A 及び共通の s g R N A 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 1 7】C R I S P R / C a s 9 でヌクレオフェクションされた R 1 2 4 H 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、r s 3 8 0 5 7 0 0 S N P により生成される新規 P A M を利用した。この P A M は、その患者の R 1 2 4 H 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、単クローンを単離して、インデルが生じたかどうかを調べた。6 個の単クローンは、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ンのうち 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 7 5 % の編集効率が指摘される。3 個のクローンのうち 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 6 6 . 6 % が遺伝子破壊を誘導した。

【図 1 8】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 1 9】角膜ジストロフィーと関連する S N P 部位を含む例示的な標的配列を示す図である。

【図 2 0】T G F B I 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 2 1】T G F B I 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 2 2】T G F B I 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 2 3】T G F B I 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 2 4】 T G F B I 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 2 5】 T G F B I 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 2 6】 T G F B I 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 2 7】 T G F B I 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 2 8】 T G F B I 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 2 9】 T G F B I 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 3 0】 T G F B I 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 3 1】 T G F B I 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 3 2】 T G F B I 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 3 3】 T G F B I 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 3 4】 T G F B I 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 3 5】 T G F B I 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

【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 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 を含む一本鎖ガイド R N A (s g R N A) に関する。上記 s g R N A は、人工的な s g R N A 、人造の s g R N A 、合成の s g R N A 、及び / 又は天然に存在しない s g R N A であり得る。幾つかの実施形態において、上記 s g R N A は、(i) C R I S P R 標的化 R N A (c r R N A) 配列と、(i i) 「 s g R N A スキャフォールド」とも呼ばれ得るトランス活性化型 c r R N A (t r a c r R N A) 配列とを含む。幾つかの実施形態において、上記 c r R N A 配列及び上記 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。本明細書で使用される場合に「 s g R N A 」という用語は、(i) ガイド配列 (c r R N A 配列) と、(i i) C a s 9 ヌクレアーゼ動員配列 (t r a c r R N A) とを含む一本鎖ガイド R N A を指し得る。例示的なガイド配列には、図 1 8 ~ 図 1 9 に開示される配列が含まれる。上記 c r R N A 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、C a s 9 ヌクレアーゼ活性を導き得る配列であり得る。上記 c r R N A 配列及び上記 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。上記 s g R N A は、R N A として、又はプロモーター下で s g R N A をコードする配列 (s g R N A 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 s g R N A 又は上記 c r R N A は、標的配列 (例えば

、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ェ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「ストリンジェントな条件」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。ストリンジェントな条件は、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。ストリンジェ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、フーグ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 + 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 + 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、t r a c r R N A は、C a s 9 を活性化して、c r R N A 配列の結合のために d s D N A を開放するヘアピン構造を提供する。上記 t r a c r R N A 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 t r a c r R N A 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 R N A 特異的
 リボヌクレアーゼの R N a s e I I I によるプロセッシングを惹起し得る。更なる実施形
 態において、上記 t r a c r R N A は、S P I D R (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
 D N A 座位のファミリーを構成し得る。C R I S P R 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) (S S R) (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 S S
 R 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 (Groe
 nen 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)。C R I S P R
 座位は、リピートの構造の点でその他の S S R 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) (S R S R) 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 t
 r a c r R N A 配列は、当該技術分野で既知の C R I S P R / C a s 9 システムのための
 t r a c r R N A 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 t r a
 c r R N A 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 7 0 %、7
 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、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。上記 t r a c r R N A 配列は、当該技術分野で既知の C R I S P R / C a
 s 9 システムのための t r a c r R N A のための任意の配列であり得る。例示的な C R I
 S P R / C a s 9 システム、s g R N A、c r R N A 及び t r a c r R N A、並びにそれ
 らの製造方法及び使用は、米国特許第 8 6 9 7 3 5 9 号、米国特許出願公開第 2 0 1 5 0
 2 3 2 8 8 2 号、同第 2 0 1 5 0 2 0 3 8 7 2 号、同第 2 0 1 5 0 1 8 4 1 3 9 号、同第
 2 0 1 5 0 0 7 9 6 8 1 号、同第 2 0 1 5 0 0 7 3 0 4 1 号、同第 2 0 1 5 0 0 5 6 7 0
 5 号、同第 2 0 1 5 0 0 3 1 1 3 4 号、同第 2 0 1 5 0 0 2 0 2 2 3 号、同第 2 0 1 4 0
 3 5 7 5 3 0 号、同第 2 0 1 4 0 3 3 5 6 2 0 号、同第 2 0 1 4 0 3 1 0 8 3 0 号、同第
 2 0 1 4 0 2 7 3 2 3 4 号、同第 2 0 1 4 0 2 7 3 2 3 2 号、同第 2 0 1 4 0 2 7 3 2 3
 1 号、同第 2 0 1 4 0 2 5 6 0 4 6 号、同第 2 0 1 4 0 2 4 8 7 0 2 号、同第 2 0 1 4 0
 2 4 2 7 0 0 号、同第 2 0 1 4 0 2 4 2 6 9 9 号、同第 2 0 1 4 0 2 4 2 6 6 4 号、同第
 2 0 1 4 0 2 3 4 9 7 2 号、同第 2 0 1 4 0 2 2 7 7 8 7 号、同第 2 0 1 4 0 1 8 9 8 9
 6 号、同第 2 0 1 4 0 1 8 6 9 5 8 号、同第 2 0 1 4 0 1 8 6 9 1 9 号、同第 2 0 1 4 0
 1 8 6 8 4 3 号、同第 2 0 1 4 0 1 7 9 7 7 0 号、同第 2 0 1 4 0 1 7 9 0 0 6 号、同第

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crRNA配列を含むプライマーを含む、CRISPR/Cas9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、crRNA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配列を更に含み得て、上記ロケータ配列は、天然にはcrRNA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、CRISPR/Cas9システムのためのcrRNAをコードするためのベクター、例えばpSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)及びpX601-AAV-CMV::NLS-SaCas9-NLS-3xHA-bGHpA;U6::BsalsgRNA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crRNA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。

10

20

【0025】

別の態様において、本開示は、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及びsgRNA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 lind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。「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。

30

【0026】

一般的に「CRISPRシステム」は、Cas遺伝子をコードする配列、tracr(トランス活性化CRISPR)配列(例えば、tracrRNA又は活性の部分的tracrRNA)、tracr-mate配列(「ダイレトリート」及び内因性CRISPRシステムにおけるtracrRNAのプロセシングされた部分的ダイレトリート)、ガイド配列(本明細書では「crRNA」とも、又は内因性CRISPRシステムにおける「スパーサー」とも呼ばれる)、及び/又はその他の配列を含むCRISPR関連(Cas)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CRISPR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、sgRNAは、少なくともtracrRNA及びcrRNAの組み合わせである。幾つかの実施形態において、CRISPRシステムの1つ以上のエレメントは、II型のCRISPRシステムから誘導される。幾つかの実施形態において、CRISPRシステムの1つ以上のエレメントは、内因性CRISPR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、CRISPRシステムは、標的配列(内因性CRISPRシステムにおいてプロトスパーサーとも呼ばれる)の部位でCRISPR複合体の形成を促進するエレメントを特徴とする。C

40

50

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「標的配列」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配列は、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。

【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ッション番号 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 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その他のタンパク質（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え得る。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るように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）。

【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。

【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の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 i n v i t r o / e x v i v o 改変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、これらの改変された細胞のみを純化する追加の工程

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・シュードボルシヌス (*Streptococcus pseudoporcinus*)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus or* 10 *alis*)、ストレプトコッカス・シュードボルシヌス (*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 caba* 11 *lli*)、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 gordonii*)、ストレプトコッカス・パスツールリアヌス (*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、Kleinstiver et al, 20 16 *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. condim* 20 *enti*)、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 . カブラエ (*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. agne* 30 *tis*)、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. 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. l* 31 *ugdunensis*)、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. kloo* 32 *sii*)、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.* 40 *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 . パスツール (*S. pasteuri*)、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

66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%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Cas9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60%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

10

【0032】

幾つかの実施形態において、上記Cas9ヌクレアーゼは、該Cas9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Cas9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Cas9ヌクレアーゼは、該Cas9ヌクレアーゼ中のHNH、RuvC、及びPAM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Cas9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Cas9ヌクレアーゼは、(i)K855A、(ii)K810A、K1003A、及びR1060A、並びに(iii)K848A、K1003A、及びR1060A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Cas9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60%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%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Cas9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60%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

20

30

【0033】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載されるCRISPR/Cas9システム及び該CRISPR/Cas9システムを使用する方法は、NH₂JによりDNA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CRISPR/Cas9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。

【0034】

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14に示されるようにHDRによりDNA配列を変化させる。更なる実施形態において、このHDRアプローチは、MECDにおける遺伝子治療のためのex vivo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てもよく、KRT12コドン129、130、132、133、及び135における突然変異を修復するために使用され得る。

40

【0035】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載されるCRISPR/Cas9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。Cas9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、HDR経路によるII型のヌクレアーゼ誘導型DSB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DNA（ssDNA）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HDR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、TGFBI遺伝子、KRT3遺伝子、KRT12遺伝子、GSN遺伝子、及びUBIAD1遺伝子内の標的核酸と相同組み換えすることが可能である。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、Leu132Pro）をコードするKRT12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CRISPR/Cas9システム又は

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、及びカチオン性リボ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)、ピロソーム、リボソーム、イムノリボソーム、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、及びリボ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

30

40

【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。

50

そのような選択マーカ－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－が含まれる。さらに、選択マーカ－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－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－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－は、当該技術分野でよく知られており、これらのマーカ－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－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」としているとは、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III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てもよい。幾つかの実施形態において、ベクターは、1個以上のpol IIIプロモーター(例えば、1個、2個、3個、4個、5個以上のpol III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わせを含む。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。

【 0 0 4 3 】

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 u ²⁺、Z n ²⁺ 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。

【 0 0 4 4 】

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。

【 0 0 4 5 】

「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、及びアデノ随伴ウイルス) 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)。その他のベクター (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、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随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もできる。

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crRNA又はsgRNAが、単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、角膜中で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IC3D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TGFI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（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。更なる実施形態において、本明細書における角膜ジストロフィーは、MECD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（TGFB I）、ケラチン3（KRT3）、ケラチン12（KRT12）、GSN、及びUbiquitinリルトランスフェラーゼドメイン含有タンパク質1（UBIAD1）からなる群から選

50

扱わ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
 S N P 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 S N P 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番号 Q 1 5 5 8 2 の T G F B I にお
 ける 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 P r o 、 P h e 5 1 5 L e u 、 L e u 5 1 8 P r o 、 L e u 5 1 8 A r g 、 L e u 5 2 7 A r
 g 、 T h r 5 3 8 P r o 、 T h r 5 3 8 A r g 、 V a l 5 3 9 A s p 、 P h e 5 4 0 d e l 、 P h e 5 4 0 S e r 、 A s n 5 4 4 S e r 、 A l a 5 4 6 T h r 、 A l a 5 4 6 A s
 p 、 P h e 5 4 7 S e r 、 P r o 5 5 1 G l n 、 L e u 5 5 8 P r o 、 H i s 5 7 2 d e l 、 G l y 5 9 4 V a l 、 V a l 6 1 3 d e l 、 V a l 6 1 3 G l y 、 M e t 6 1 9 L y
 s 、 A l a 6 2 0 A s p 、 A s n 6 2 2 H i s 、 A s n 6 2 2 L y s 、 A s n 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 に相当する突然変異
 を含む突然変異 T G F B I タンパク質、(i i) 例えばタンパク質アクセッション番号 P
 1 2 0 3 5 又は N P _ _ 4 7 6 4 2 9 . 2 のケラチン 3 タンパク質における 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 に相当する突然変異を含む突
 然変異 K R T 3 タンパク質、(i i i) 例えばタンパク質アクセッション番号 Q 9 9 4 5
 6 . 1 又は N P _ _ 0 0 0 2 1 4 . 1 の K R T 1 2 における 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)
 例えばタンパク質アクセッション番号 P 0 6 3 9 6 の G S N における 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) 例えばタンパク質アクセッション番号
 Q 9 Y 5 Z 9 の U B I A D 1 における 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 に
 相当する突然変異を含む突然変異 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。例えば、上記突然変異部位又は上記 S N P 部位を含む突然
 変異配列は、タンパク質アクセッション番号 Q 1 5 5 8 2 のアミノ酸位置 5 0 9 に相当す
 るアミノ酸位置で L e u を A r g で置き換えることにより突然変異された突然変異 T G F
 B I 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 S N P 部位での突然変異は、タンパク質アクセッション番号 Q 1 5 5 8 2 のアミノ酸位
 置 5 0 9 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 L e
 u 5 0 9 A r g 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バ

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番号 Q 1 5 5 8 2 の T G F B I 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。

【 0 0 5 0 】

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、K R T 1 2 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番号 Q 9 9 4 5 6 . 1 の K R T 1 2 における L e u 1 3 2 P r o 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 S N P は、K R T 1 2 遺伝子中に存在するあらゆる S N P を除く。なおも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 S N P は、K R T 1 2 タンパク質における L e u 1 3 2 P r o 突然変異をもたらすあらゆる S N P を除く。上記突然変異又は上記 S N P は、K R T 1 2 タンパク質における L e u 1 3 2 P r o 突然変異をもたらす P A M 部位での S N P (A A G > A G G) を更に除き得る。

10

【 0 0 5 1 】

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 / C a s 9 システム及び該システムを使用する方法は、複数の S N P 部位又は祖先型 S N P での突然変異配列を変化させ得る。そのような方法は、図 1 5 ~ 図 1 6 に示されるように隣接 P A M 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 S N P 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 S N P 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 T G F B I タンパク質の発現を R 5 1 4 P 及び L 5 1 8 R の両方で変化させ得るか、又は K R T 1 2 タンパク質の発現を R 1 3 5 T 及び L 1 3 2 P の両方で変化させ得る。幾つかの実施形態において、s g R N A は、突然変異アレルに特異的な P A M 部位に隣接する s g R N A 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 P A M 部位に隣接する標的配列を含み得る。

20

【 0 0 5 2 】

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 D N A 配列の範囲を調べる場合に、遺伝形質の決定はこれらの D N A 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 S N P 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ジングにおいて利用されている。したがって、5 0 k b より長い D N A 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ジ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。より長いフェージングシーケンスのリードは、対象 S N P が本明細書に記載される C R I S P R / C a s 9 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

【 0 0 5 3 】

1 つの態様において、本明細書に記載される方法は、病因性突然変異又は S N P のどちらか一方の側での標的可能な突然変異又は S N P を特定して、病因性突然変異又は S N P 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、フェージングシーケンス実験において D N A 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 S N P は、C R I S P R / C a s 9 システムのための適切な基質ではなく、C R I S P R / C a s 9 開裂のために適した病因性突然変異又は S N P の両方の側での突然変異又は S N P の特定は、該病因性突然変異又は該 S N P を含む D N A 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 de termination 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。主題の治療方法の治療効果は、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

10

20

【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「治療的有效量」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。治療的有效量は、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。

30

【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

40

50

含む。なおも更なる実施形態において、上記 P A M は、N G G 及び 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) からなる群から選択される P A M 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 C R I S P R / C a s 9 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 C R I S P R / C a s 9 システムを、上記標的配列を有する D N A 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 C R I S P R / C a s 9 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。

【 0 0 5 7 】

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 S N P 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。

【 0 0 5 8 】

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 T G F B I 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、臍帯内臓幹細胞、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。

【 0 0 5 9 】

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 (L E S C) 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、L E S C 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 (e T A C) 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 e T A C 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 (T A C) が生成され得て、こうして最後には最終分化細胞 (D C) がもたされる。L E S C 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 L E S C 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 (F A C S) 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。L E S C 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 p 6 3、A B C G 2、C / E B P、及び B m i - 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 (C K 3)、サイトケラチン 1 2 (C K 1 2)、コネキシン 4 3、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、p 6 3、A B C G 2、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 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5

10

20

30

40

50

%、96%、97%、98%、又は99%は、p63、ABCG2、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、インボルクリン、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、インボルクリン、又はそれらの組み合わせを発現しない。LESC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LESC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、LESC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】

LESC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 Ophthalmol 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。

20

【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、ABCG2、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、ABCG2、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。なおも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、

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。

【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。

【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。

【0068】

別の態様において、本開示は、病因性突然変異又は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、TGFB1遺伝子における病因性突然変異又はSNPをサイレンシングするためのsgRNA対である。該sgRNA対は、TGFB1遺伝子における、例えばイントロン中の病因性突然変異又は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、TGFB1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。

10

20

30

40

50

【0069】

幾つかの実施形態において、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) 病因性突然変異又は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) 病因性突然変異又は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を含む、sgRNA対に関する。

10

【0070】

更なる実施形態において、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。上記PAMを生成する突然変異又はSNPは、TGFB1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PAMを生成する突然変異又はSNPは、TGFB1遺伝子のイントロン中に存在する。なおも更なる実施形態において、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ヌ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、K12及びTGFB1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
	ライスー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
	グレイソンー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

10

【 0 0 7 5 】

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 の生成のために病因性 S N P を必要とするが、アレル特異的アプローチは、病因性 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 中の全ての非病因性 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、病因性突然変異とシスに見られる十分な機会を提供し得る。病因性突然変異と「シスにある」とは、病因性突然変異と同じ 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、病因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)。

20

30

【 0 0 7 6 】

【表 2】

表 2：10%より大きいMAFを有する新規PAMを生ずるTGFB I内の変異体。新規PAMは、赤色で示された必要な変異体と一緒に示されている。

領域	番号	位置	領域開始座標 第5染色体	領域終了座標 第5染色体	変異体座標 第5染色体	SNP	変異体	新規PAM (必要とされる変異体は赤色)	ガイド配列	鎖	MAF	集団遺伝学					
エキソン1	1		136028895	136029189								全ての個体	アフリカ人	アメリカ人	東アジア人	ヨーロッパ人	南アジア人
エキソン2	1～2	インtron 2から1507塩基対に離れている	136 029 190	136 033 762	136032206 ～ 136032306	rs756 462	T/C	ccc	GAATCCA TGTAAGG ATCTAG	I	0.31	T: 69% C: 31%	T: 56% C: 44%	T: 63% C: 37%	T: 64% C: 36%	T: 79% C: 21%	T: 85% C: 15%
エキソン2	2		136033763	136033861													
エキソン3	2～3	インtron 3から1945塩基対に離れている				rs198 9972	A/C	atccca	CAGGGCT GTATTAC TGGGGC	I	0.43	A: 43% C: 57%	A: 26% C: 74%	A: 51% C: 49%	A: 42% C: 58%	A: 52% C: 48%	A: 49% C: 51%
		インtron 3から1945塩基対に離れている			136042063 ～ 136042163	rs198 9972	A/C	cca	CAGGGCT GTATTAC TGGGGC	I	0.43	A: 43% C: 57%	A: 26% C: 74%	A: 51% C: 49%	A: 42% C: 58%	A: 52% C: 48%	A: 49% C: 51%
		インtron 3から1945塩基対に離れている	136033862	136044057		rs198 9972	A/C	ccc	AGGGCTG TATTACT GGGGCT	I	0.43	A: 43% C: 57%	A: 26% C: 74%	A: 51% C: 49%	A: 42% C: 58%	A: 52% C: 48%	A: 49% C: 51%

インtron変異 体、エキソン3か ら966塩基対離 れている	3	136044058	136044122	136043042 ～ 136043142	rs380 5700	A/G	gcgggt	CTCCTGT AGGGAA CATAGA	+	0.3	A: 70% G: 30%	A: 70% G: 30%	A: 75% G: 25%	A: 74% G: 26%	A: 64% G: 36%
	3～4	136044123	136046334					TCCTGTA GGGGAAC ATAGAG	+	0.3	A: 70% G: 30%	A: 70% G: 30%	A: 75% G: 25%	A: 74% G: 26%	A: 64% G: 36%
	4	136046335	136046495					TTGCATG GTGGTCG GCTTTC	-	0.32	A: 32% G: 68%	A: 32% G: 68%	A: 37% G: 63%	A: 47% G: 53%	A: 40% G: 60%
	4～5	136046496	136046850								A: 45% G: 55%	A: 45% G: 55%	A: 37% G: 63%	A: 47% G: 53%	A: 40% G: 60%
	5	136046851	136047015								A: 70% G: 30%	A: 70% G: 30%	A: 75% G: 25%	A: 74% G: 26%	A: 64% G: 36%
	5～6	136047016	136047273								A: 32% G: 68%	A: 32% G: 68%	A: 37% G: 63%	A: 47% G: 53%	A: 40% G: 60%
インtron変異 体、エキソン217 パク質位置217	6	136047274	136047420	136047250 ～ 136047350	rs144 2	G/C	CCT	TTGCATG GTGGTCG GCTTTC	-	0.32	A: 32% G: 68%	A: 32% G: 68%	A: 37% G: 63%	A: 47% G: 53%	A: 40% G: 60%
インtron変異 体、エキソン6か ら119塩基対離 れている	6～7	136047421	136049438	136047489 ～ 136047589	rs764 567	A/G	gcgggt	TCCTGTA GGGGAAC ATAGAG	+	0.3	A: 70% G: 30%	A: 70% G: 30%	A: 75% G: 25%	A: 74% G: 26%	A: 64% G: 36%
インtron変異 体、エキソン6か ら119塩基対離 れている					rs764 567	A/G	gcgggt	CTCCTGT AGGGAA CATAGA	+	0.3	A: 70% G: 30%	A: 70% G: 30%	A: 75% G: 25%	A: 74% G: 26%	A: 64% G: 36%

10

20

30

40

[illegible]

イ ン テ	9		イ ン テ	136053943	136054080	136055587 ～ 136055687	rs686 0369	A/G	cg	CAATCA GGAGCC CCTCGT	+	0.4	A : 60% G : 40%	A : 75% G : 25%	A : 66% G : 34%	A : 43% G : 57%	A : 63% G : 37%	A : 58% G : 42%	A : 33% G : 67%	A : 49% G : 51%	A : 51% G : 49%	C : 61% G : 39%	A : 39% G : 61%	A : 11% G : 89%	C : 89% G : 11%	C : 57% G : 43%	C : 48% G : 52%	C : 49% G : 51%		
イ ン テ	9～10			136054081	136054715																									
イ ン テ	10			136054716	136054861																									
イ ン テ	10～11	イ ン テ ロ ン 変 異 体、 エキ ソ ン 1 1 から 4 3 塩 基 対		136054862	136055679																									
イ ン テ	11			136055680	136055816																									
イ ン テ	11～12			136055817	136056664																									
イ ン テ	12			136056665	136056795																									
イ ン テ	12～13	イ ン テ ロ ン 変 異 体、 エキ ソ ン 1 2 から 7 1 3 塩 基 対		136056796	136059089	136057458 ～ 136057558	rs687 1571	A/G	cg	TGCAGCC TGTGTTG GGAGGA	+	0.42	A : 58% G : 42%	A : 63% G : 37%	A : 66% G : 34%	A : 43% G : 57%	A : 63% G : 37%	A : 33% G : 67%	A : 49% G : 51%	A : 51% G : 49%	A : 51% G : 49%	C : 61% G : 39%	A : 39% G : 61%	A : 11% G : 89%	C : 89% G : 11%	C : 57% G : 43%	C : 48% G : 52%	C : 49% G : 51%		
イ ン テ	13			136059090	136059214																									
イ ン テ	13～14	イ ン テ ロ ン 変 異 体、 エキ ソ ン 1 3 から 5 3 0 塩 基 対				136059694 ～ 136059794	rs689 3691	A/G	cg	AATCTCC CTGGCTG CACCTG	+	0.39	A : 39% G : 61%	A : 49% G : 51%	A : 43% G : 57%	A : 43% G : 57%	A : 63% G : 37%	A : 33% G : 67%	A : 49% G : 51%	A : 51% G : 49%	A : 51% G : 49%	C : 61% G : 39%	A : 39% G : 61%	A : 11% G : 89%	C : 89% G : 11%	C : 57% G : 43%	C : 48% G : 52%	C : 49% G : 51%		
		イ ン テ ロ ン 変 異 体、 エキ ソ ン 1 3 から 6 4 0 塩 基 対		136059215	136060833	136059804 ～ 136059904	rs199 0199	G/C	cg	TGCATAT CTTCCTA TGCTCC	+	0.39	A : 39% G : 61%	A : 49% G : 51%	A : 43% G : 57%	A : 43% G : 57%	A : 63% G : 37%	A : 33% G : 67%	A : 49% G : 51%	A : 51% G : 49%	A : 51% G : 49%	C : 61% G : 39%	A : 39% G : 61%	A : 11% G : 89%	C : 89% G : 11%	C : 57% G : 43%	C : 48% G : 52%	C : 49% G : 51%		

10

20

30

40

【 0 0 7 7 】

図 15 に示されるように、T G F B I 内の変異体の位置は、殆どの S N P 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 T G F B I 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、C R I S P R / C a s 9 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 C R I S P R / C a s 9 システムは、種々の T G F B I 突然変異を治療するために使用することができる。上記 C R I S P R / C a s 9 システムは、突然変異アレルに特異的な P A M 部位に隣接する s g R N A 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 P A M 部位に隣接する s g R N A 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での N H E J 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 D N A 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 S N P 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

20

30

40

50

【0078】

構築物：C a s 9 及び s g R N A 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、p S p C a s 9 (B B) - 2 A - P u r o (P X 4 5 9) (ブロード研究所、M I T、A d d g e n e プラスミド 4 8 1 3 9、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、K 1 2 - L 1 3 2 P アレルに特異的な s g R N A 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' - C A C C G T A G G A A G C T A A T C T A T C A T T - 3' 及び 5' - A A A C A A T G A T A G A T T A G C T T C C T A C - 3' を p S p C a s 9 (B B) - 2 A - P u r o 中にクローニングすることによりデザインした。この s g R N A は、K 1 2 - L 1 3 2 P アレルに見られるアレル特異的 P A M 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 s g K 1 2 L P と呼ぶ。野生型及び突然変異の K 1 2 配列の両方を標的とする C a s 9 / s g R N A プラスミドを構築し (Sigma 社、英国、ジリングラム)、ポジティブコントロールとして使用した (図 1、緑色)。

【0079】

以前に記載された更なる K 1 2 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。K 1 2 - W T 又は K 1 2 - L 1 3 2 P のいずれかについての完全 m R N A 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 K 1 2 W T - L u c 及び K 1 2 L P - L u c 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 (H A) タグ付きの K 1 2 - W T 及び K 1 2 - L 1 3 2 P 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 K 1 2 W T - H A 及び K 1 2 L P - H A 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 (p R L - C M V、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。

【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 s g R N A 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、H E K A D 2 9 3 細胞 (Life Technologies 社) を、リボフェクタミン 2000 (Life Technologies 社) を使用して、K 1 2 W T - L u c 発現構築物又は K 1 2 L P - L u c 発現構築物と s g N S C 構築物、s g K 1 2 構築物、又は s g K 1 2 L P 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。

【 0 0 8 1 】

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: e28582.）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二次抗体（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。デンストメトリーを Image 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

【 0 0 8 2 】

定量的リアルタイムPCR：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PCR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 2001; 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」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

【 0 0 8 3 】

パイロシーケンシング：定量的逆転写酵素PCRにより評価された同じ c D N A 試料を使用して、パイロシーケ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

【 0 0 8 4 】

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 PCR 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) プロトコルに従って、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 $4\mu\text{g}$ 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%のバ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 $3\mu\text{l}$ のリン酸緩衝生理食塩水中に希釈された $4\mu\text{g}$ 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。

【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： $5' - \text{ACACCCCATCTTGCA GCCCTAT} - 3'$ 及び $5' - \text{AAAAATTC CCAAGCGCCTC} - 3'$ 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、*DH5* 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、 $5' - \text{TAA GTAGCTGATCTATCAGTGGG} - 3'$ (*Gon41*) 及び $5' - \text{TGGGAAGCATATCTGTCA TTTGG} - 3'$ (*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。

【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。

【0088】

KRT12 特異的 *sgRNA* の構築：*MED* 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、*MED* 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 (*AGG* > *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

10

20

30

40

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 2A)。ホタルルシフェラーゼ活性は、K12WT - Luc または 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、 $73.4 \pm 2.7\%$ の減少 ($P < 0.001$) が観察された (図 2A)。このアレル特異的な有効なノックダウンはまた、ウェスタンブロッティングにより、K12WT - HA または K12LP - HA のいずれかを発現する細胞においても観察され (図 2B、4 つのプロットを表すイメージ)、デンス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 2B)。

10

20

【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 2C)。K12 の全 mRNA の $73.1 \pm 4.2\%$ ($P < 0.001$) 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 $52.6 \pm 7.0\%$ ($P < 0.01$) のより少ない減少が測定された (図 2C)。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 2D)。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 2D)。

30

40

【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 3A)。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、マウスを安楽死させ、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 増幅、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

50

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。s g K 1 2 L P 処理された眼からの 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、C a s 9 / s g 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 i n v i v o 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 s g 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

【 0 0 9 2 】

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ぞれを標的とするようにデザインし、s g R N A / C a s 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 C a s 9 処理の 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

【 0 0 9 3 】

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 C a s 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

【 0 0 9 4 】

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、s g R N A / C a s 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。

【 0 0 9 5 】

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

【 0 0 9 6 】

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 C a s 9 プラスミド中にクローニングした。強化型 C a s 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

【 0 0 9 7 】

DNA 開裂を確認するために、野生型 T G F B I 配列又は突然変異 T G F B I 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 Cas 9 タンパク質と一緒に *in vitro* で 37 °C 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)。

【 0 0 9 8 】

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 1.5 l / 分の酸素流中の 1.5 % ~ 2 % のイソフルラン (Abbott Laboratories Ltd. 社、英国、パークシャー) を使用して麻酔した。ルシフェリン基質 (30 mg / 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 Visco tear s 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 K r t 1 2 + / l u c 2 トランスジェニックマウスの眼に滴下した。Xenogen I V I S 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、Cy 3 標識された siRNA が注射されたマウスにおいて Xenogen I V I S Lumina を使用して可視化した。

【 0 0 9 9 】

実質内注射：Cas 9 / 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、2 µl の 150 pmol / µl の Cy 3 標識された Acc e l l 修飾 siRNA を、WT の C 5 7 B L / 6 J マウスの右眼中に実質内注射した。Cy 3 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 I V I S 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 °C 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。

【 0 1 0 0 】

Cas 9 / sgRNA 発現構築物の作製：Cas 9 及び sgRNA の両方を発現するプラスミド p S p C a s 9 (B B) - 2 A - P u r o (P X 4 5 9) 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)。luc 2 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。luc 2 特異的な sgRNA を、最初にオリゴヌクレオチド 5' C A C C G T T T G T G C A G C T G C T C G C C G G 3' 及び 5' A A A C C C G G C G A G C A G C T G C A C A A A C 3' をアニーリングし、それに続いて B b s I で消化された p S p C a s 9 (B B) - 2 A - P u r o (P X 4 5 9) 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 sgLuc 2 と呼ぶ。元の p S p C a s 9 (B B) - 2 A - P u r o 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。sgLuc 2 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、Cas 9 / sgRNA 効力を調べた。簡潔には、luc 2 構築物 (p G L 4 . 1 7、Promega 社) を、sgLuc 2 又は sgNSC (両者とも Cas 9 / 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。

【 0 1 0 1 】

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、24 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 (42 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 (100%) に正規化した。

【0102】

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 = 100% 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 $p < 0.05$ 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。

【0103】

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ャーを使用して毎日 7 日間にわたり、その後 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%)。

【0104】

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 50 m l 容ファルコンチューブ中に入れた。20% 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。6.25 m l の F i c o l l - P a q u e P L U S (GE Healthcare社のカタログ番号 17 - 1440 - 02) を、別個の滅菌 50 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 q u e へと 10 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 2000 r p m にて 20 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 層があった。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 15 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 のアリコートで融解させ、再懸濁されたリンパ球に添加し、その混合物を 37 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 20% 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 24 ウェルプレートに入れた。

【0105】

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、10% の F B S を含有する 500 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容のエピENDORF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 (pH7.0)、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。

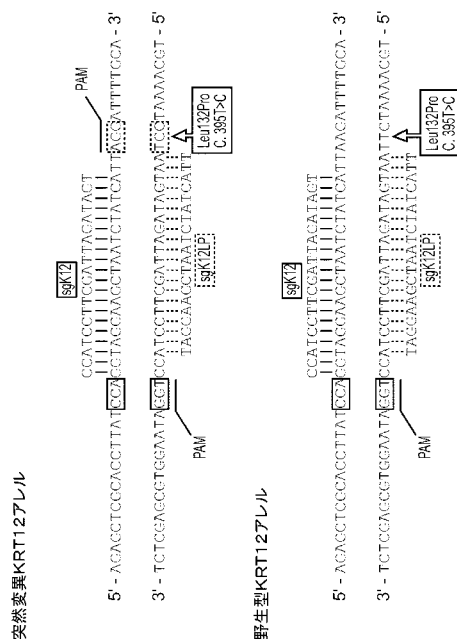
【0107】

シーケンシングのための単一アレルの単離：QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen社)を使用してDNAを単離し、PCRをCRISPR/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。単コロニーをピックし、サンガー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。

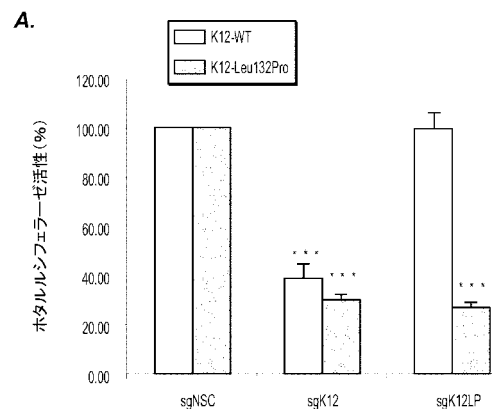
10

20

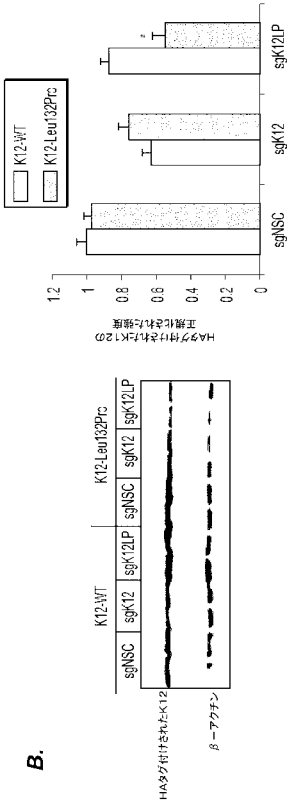
【図1】



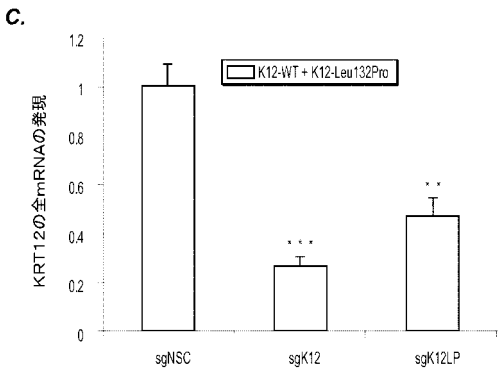
【図2A】



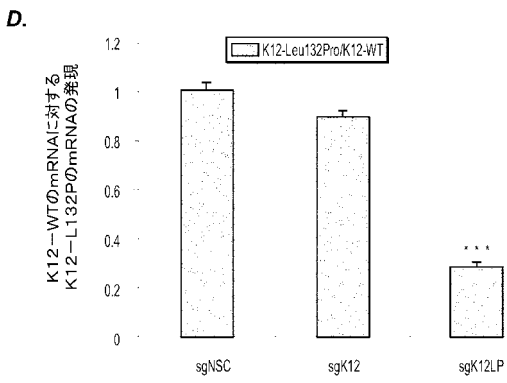
【図 2 B】



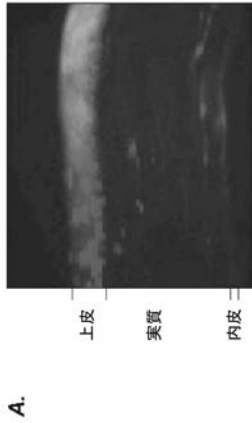
【図 2 C】



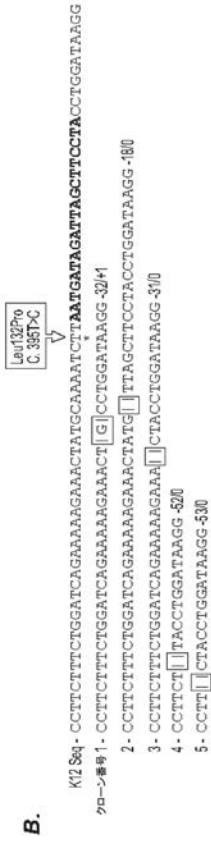
【図 2 D】



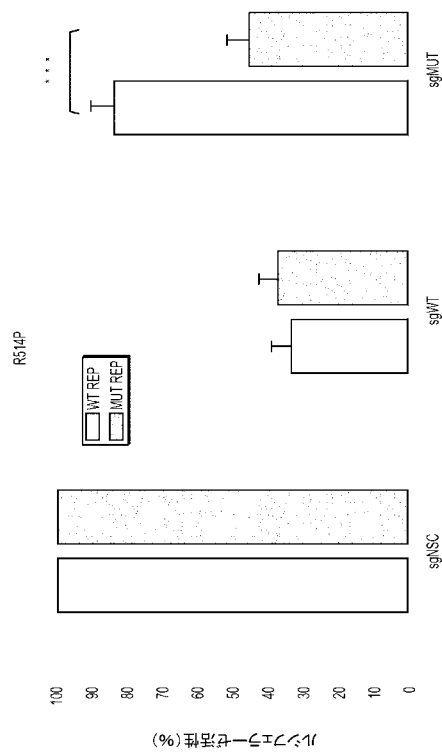
【図 3 A】



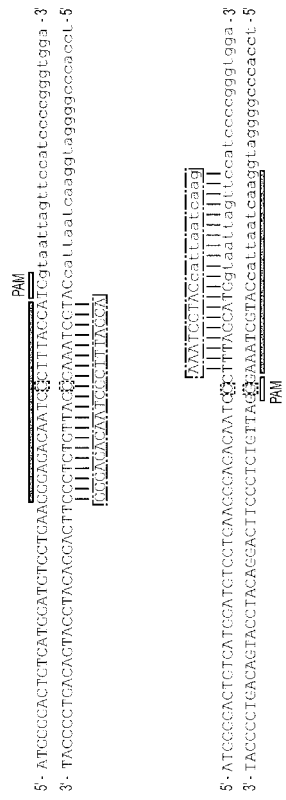
【図 3 B】



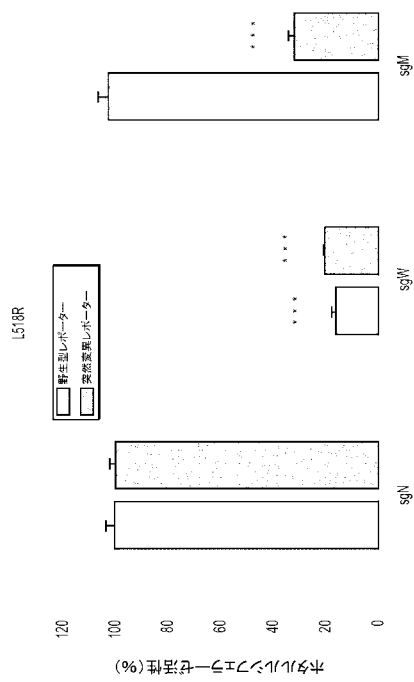
【 図 4 A - 1 】



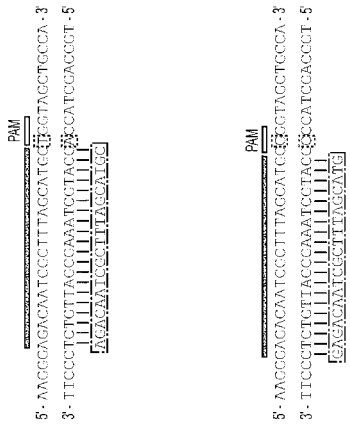
【 図 4 A - 2 】



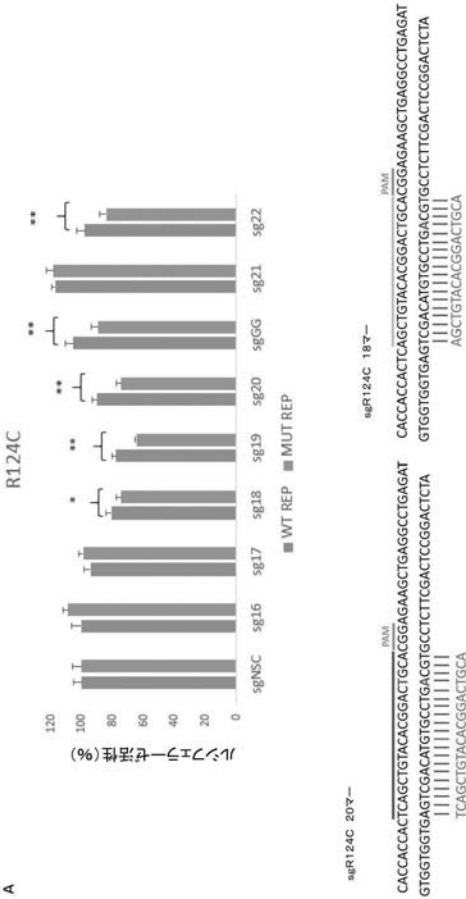
【 図 4 B - 1 】



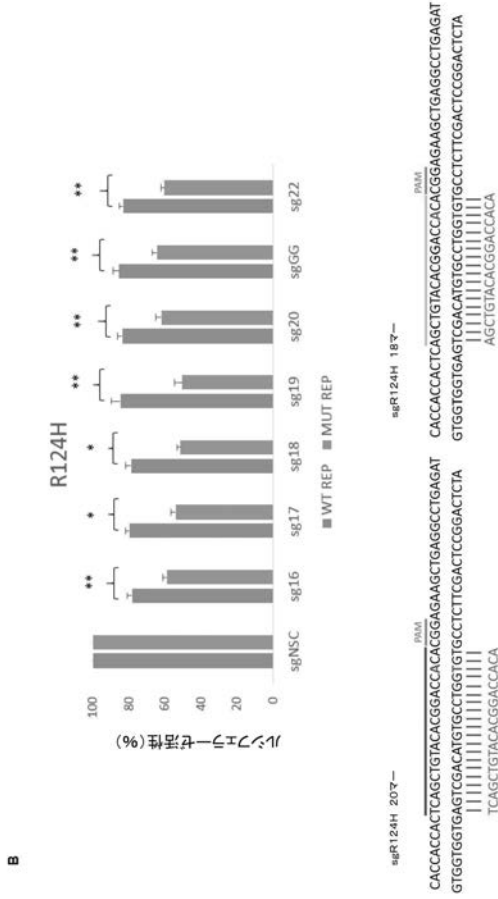
【 図 4 B - 2 】



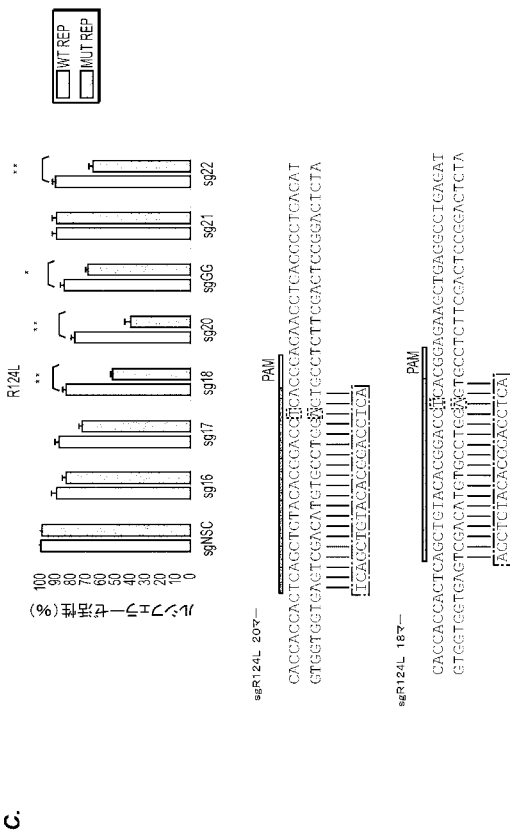
【 図 5 A 】



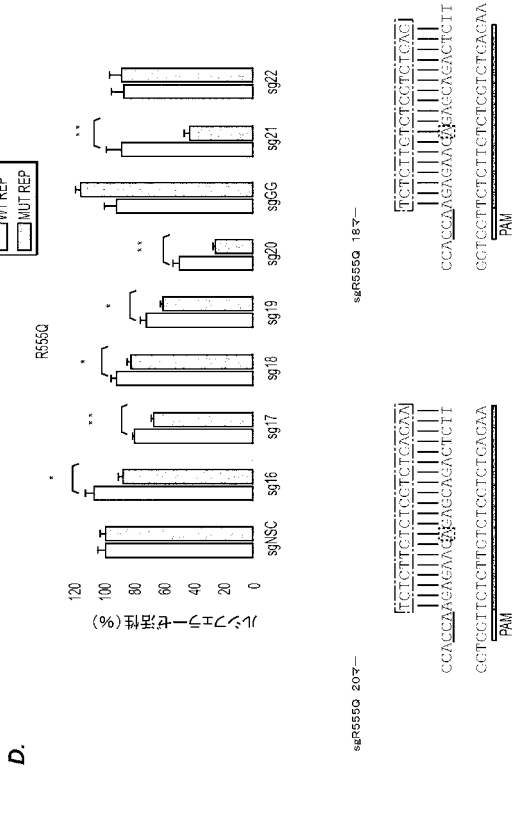
【 図 5 B 】



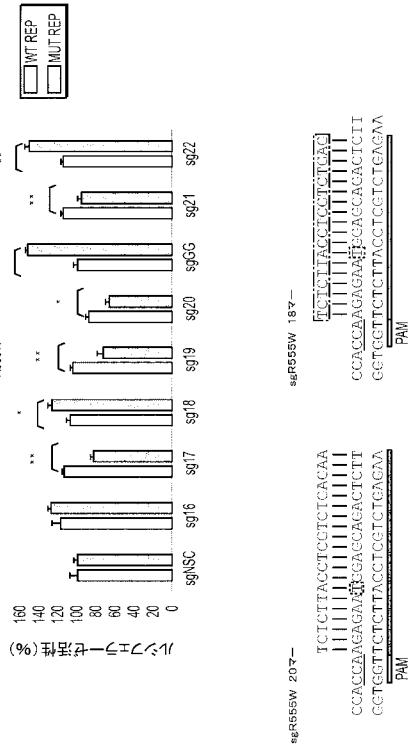
【 図 5 C 】



【 図 5 D 】

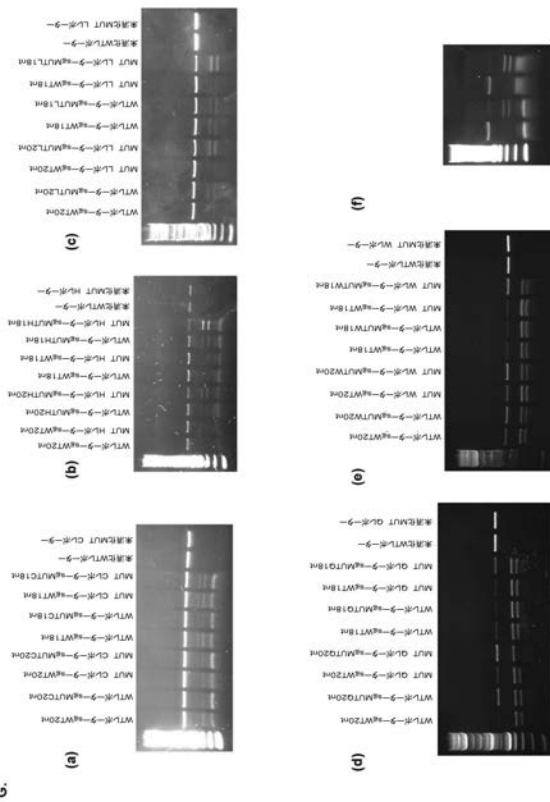


【図 5 E】



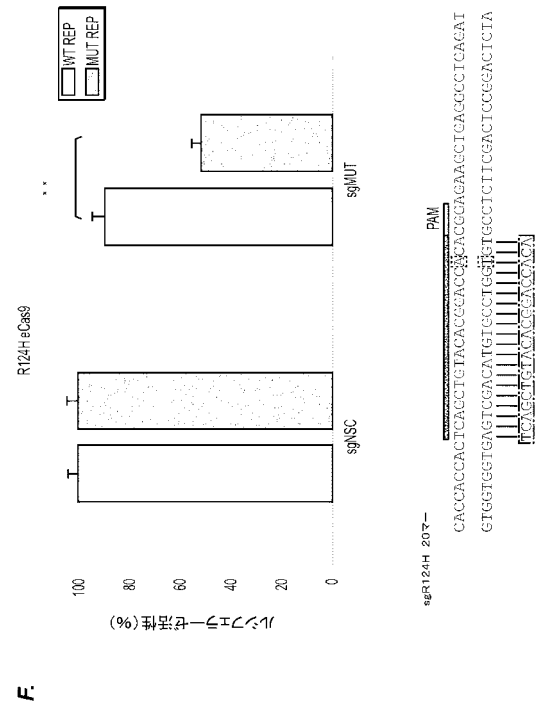
E.

【図 5 G】



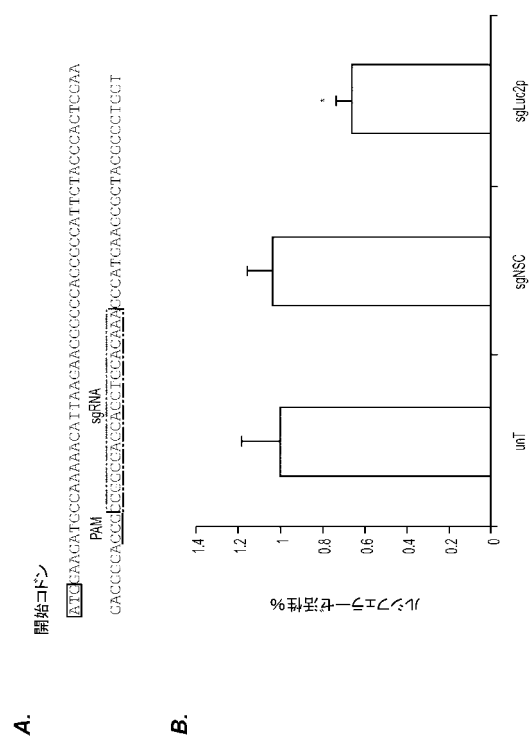
G.

【図 5 F】



F.

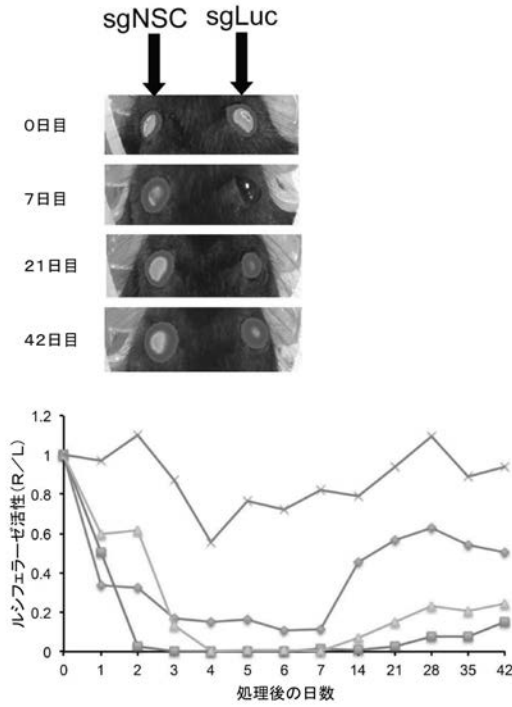
【図 6】



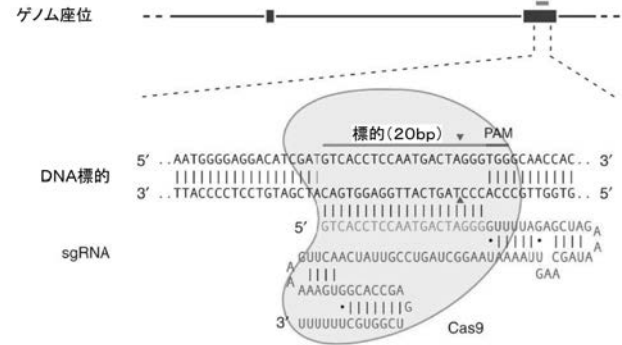
A.

B.

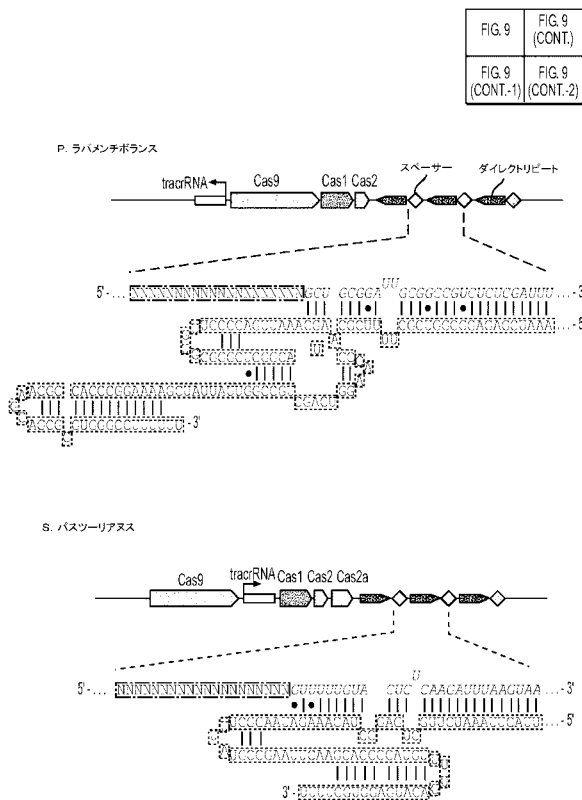
【図 7】



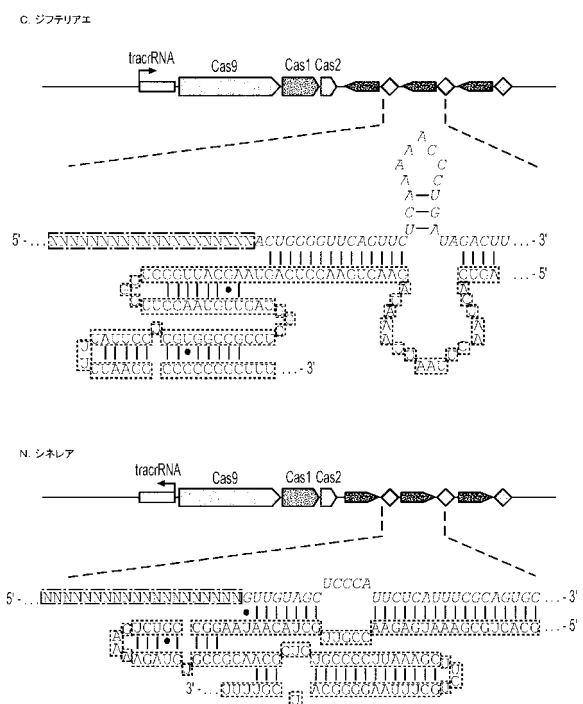
【図 8】



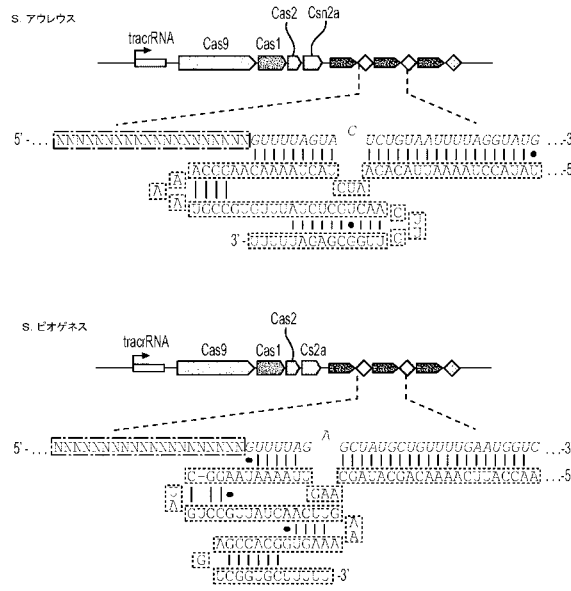
【図 9 - 1】



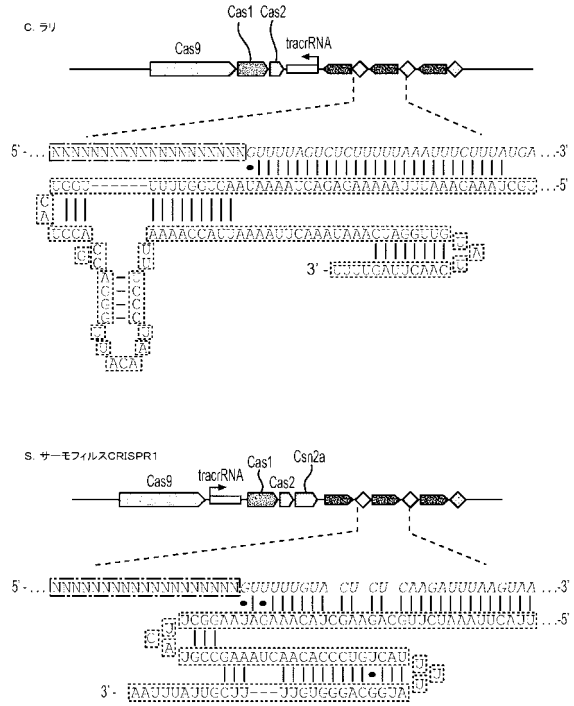
【図 9 - 2】



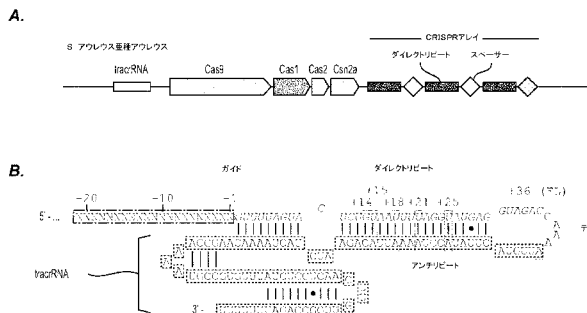
【図 9 - 3】



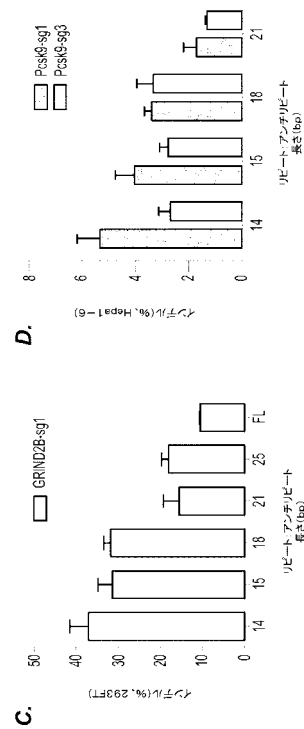
【図 9 - 4】



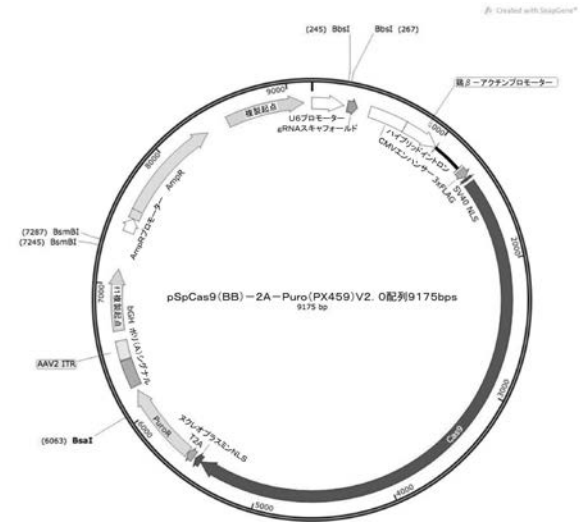
【図 10 - 1】



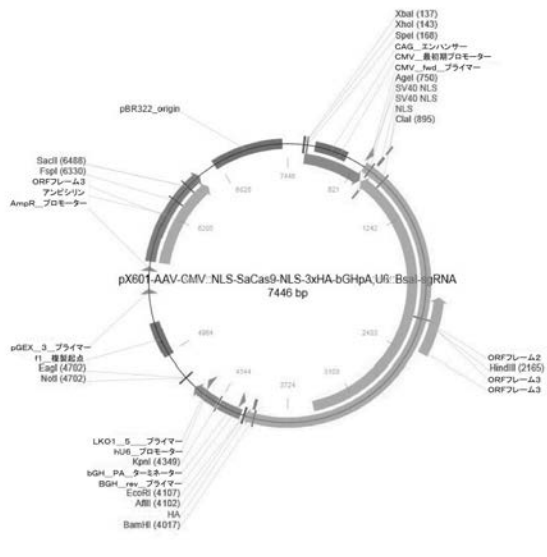
【図 10 - 2】



【 図 1 1 - 2 】



【 図 1 3 - 1 】



NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

Spy Cas9ヌクレオチド配列

[illegible]

【 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。

[illegible]

GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGUACUCUGGA.AACAGA.AUCUACU.AAAACAAAG
GCAA.AUGCCGUGUU.AUCUCGUCAACUUGUGGCCGAGA.UUUUUU(配列番号5)

ここで、"NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN"は、ssRNAにおけるギャップコード(crRNA)を表し、かつ
"GUUUUAGUACUCUGGA.AACAGA.AUCUACU.AAAACAAAGCGAUGUUU"は、

【 図 1 4 】

The diagram illustrates the CRISPR-Cas9 system. The top part shows the CRISPR array with PAM sequences and sgRNA genes. The bottom part shows the Cas9 protein bound to the sgRNA and the CRISPR array, with the Cas9 protein labeled 'CAS9 D10A'.

MAPKKRKVGIHQVPAAKRNYVJH.DIGHSIVSGYIMDYETRDVDAVGRVJFKF.ANVNENRGENS
KRG.ARLKRRRIIRIIRGVRKKLIDYVNLIDTISEL.SGDNYPARVKGLSOKI.SEEFESAALLILAK
ARRGVINSVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSK.ALEEKYV.AELQJLERLKJGVRGSDINRFKTSIDYV
AKQJLKVQK.AYIQLDQSHIDYVJLJ.FETRRVYIETGPEGSGWKIDJEWYAILMIGHCTYPIH
IR.SVKSYAYNADIVN.AJNDJN.IATIDENFKI.YETKGFQJHNVFKQKKRPIKQJAKHJNVN
EDIKGYRVTSTGKPIETIN.KVYIDIKDTARKHIEAN.ALI.DQAKIL.TYQSSDEQJEEQLT.NSIL
TQEEIEQJYRVTYGTIN.SLKYVJLJ.DEL.WITNDNQAIRNKL.VKLYVJLJ.SQOKEJPTLFTD
DHL.SPYVKRSHQSHVIN.AIIUKYJLJPNJHIDL.AREKNSQAKQKMLNMQKRNQJNFERIEHIT
TGJEN.AYVJLJIKJLJIDMFGKCTYVJLJ.EAIPJLJINSPNYVADPHIRPSVSFNSFNKVLAK
FENSKGSRNPJYVSSSDIKSYVETFKKJILN.LAKGGRISUKTKEYLJ.FEEDNRNSQKDFINR
NLVDYTRJATGLMLNLSYFRVSNL.DVVKVKSINGQDPLSRKWKFKFKRNGKYHJLAD.LI
LANADEKQWKKL.DKAKVKNMLNQADEEKQAESMEPEL.TQLEYKEJLTPHOKJIKJFDYKY
HRYDFKPNRBJNDPLSTYRKKDQNDPLVNLN.GHYVJLJNDKJDKKJLJNSPEKJLYMHYDIP
TYQJLJLMFQYDGEKPNLYKYVYETGNTYTKYSKDNGPAUKIKYVGNJLJHJLDYDIP
NSKNVYVJLJSLKPIRFDYLDNGVYKPYVKNJDIKKENYVYNSKCYEAKKJIKNSQV
HASFYNNDLJIKRFDYLVYVGNJNL.NRIEYNADITYETVLYENADDKRPIRIKJITASKTSQIK
YVJLJDLGJYEVKSKHJQIKKGRKPAATKK.AGQAKKKKSGSPYDIPDYAYPYDIPDYAYPY
DVPDYA(配 方 表)

【 図 1 9 - 2 】

[illegible]

【 図 2 0 - 1 】

Table S2 (continued)											
216-0042	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135960	557515012	216-0042	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573004	242213324
216-0043	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135961	557515013	216-0043	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573005	242213325
216-0044	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135962	557515014	216-0044	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573006	242213326
216-0045	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135963	557515015	216-0045	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573007	242213327
216-0046	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135964	557515016	216-0046	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573008	242213328
216-0047	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135965	557515017	216-0047	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573009	242213329
216-0048	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135966	557515018	216-0048	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573010	242213330
216-0049	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135967	557515019	216-0049	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573011	242213331
216-0050	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135968	557515020	216-0050	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573012	242213332
216-0051	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135969	557515021	216-0051	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573013	242213333
216-0052	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135970	557515022	216-0052	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573014	242213334
216-0053	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135971	557515023	216-0053	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573015	242213335
216-0054	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135972	557515024	216-0054	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573016	242213336
216-0055	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135973	557515025	216-0055	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573017	242213337
216-0056	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135974	557515026	216-0056	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573018	242213338
216-0057	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135975	557515027	216-0057	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573019	242213339
216-0058	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135976	557515028	216-0058	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573020	242213340
216-0059	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135977	557515029	216-0059	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573021	242213341
216-0060	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135978	557515030	216-0060	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573022	242213342
216-0061	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135979	557515031	216-0061	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573023	242213343
216-0062	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135980	557515032	216-0062	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573024	242213344
216-0063	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135981	557515033	216-0063	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573025	242213345
216-0064	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135982	557515034	216-0064	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573026	242213346
216-0065	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135983	557515035	216-0065	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573027	242213347
216-0066	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135984	557515036	216-0066	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573028	242213348
216-0067	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135985	557515037	216-0067	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573029	242213349
216-0068	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135986	557515038	216-0068	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573030	242213350
216-0069	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135987	557515039	216-0069	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573031	242213351
216-0070	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135988	557515040	216-0070	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573032	242213352
216-0071	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135989	557515041	216-0071	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573033	242213353
216-0072	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135990	557515042	216-0072	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573034	242213354
216-0073	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135991	557515043	216-0073	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573035	242213355
216-0074	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135992	557515044	216-0074	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573036	242213356
216-0075	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135993	557515045	216-0075	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573037	242213357
216-0076	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135994	557515046	216-0076	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573038	242213358
216-0077	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135995	557515047	216-0077	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573039	242213359
216-0078	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135996	557515048	216-0078	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573040	242213360
216-0079	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135997	557515049	216-0079	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573041	242213361
216-0080	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135998	557515050	216-0080	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573042	242213362
216-0081	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306135999	557515051	216-0081	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573043	242213363
216-0082	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136000	557515052	216-0082	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573044	242213364
216-0083	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136001	557515053	216-0083	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573045	242213365
216-0084	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136002	557515054	216-0084	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573046	242213366
216-0085	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136003	557515055	216-0085	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573047	242213367
216-0086	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136004	557515056	216-0086	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573048	242213368
216-0087	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136005	557515057	216-0087	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573049	242213369
216-0088	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136006	557515058	216-0088	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573050	242213370
216-0089	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136007	557515059	216-0089	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573051	242213371
216-0090	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136008	557515060	216-0090	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573052	242213372
216-0091	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136009	557515061	216-0091	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573053	242213373
216-0092	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136010	557515062	216-0092	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573054	242213374
216-0093	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136011	557515063	216-0093	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573055	242213375
216-0094	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136012	557515064	216-0094	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573056	242213376
216-0095	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136013	557515065	216-0095	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573057	242213377
216-0096	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136014	557515066	216-0096	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573058	242213378
216-0097	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136015	557515067	216-0097	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573059	242213379
216-0098	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136016	557515068	216-0098	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573060	242213380
216-0099	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136017	557515069	216-0099	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573061	242213381
216-0100	1	CGGAGGAAAAGGAGGAGG	CGG	306136018	557515070	216-0100	1	ATGAGGAGGAGGAGGAGG	A	421573062	242213382

Figure 20 (continue)

[illegible]

【圖 2 1 - 1

Figure 21. TGFB1領域におけるイントロン3~4のための例示的ガイド

[illegible]

【 図 2 2 - 3 】

Figure 22 (continued)

[illegible]

ための例示的ガイド配列

[illegible]

【 図 2 5 - 1 】

Figure 25. TGFBI領域におけるイントロン6~7のための例示的ガイド配列

[illegible]

【 図 2 5 - 3 】

Figure 25 (continued)

136048753	1	TTTCTGGTCTGTCGAGGAGC	GGG	88.7751681	56.98841793	136049097	1	CGCATGGCTAGAGGATAGCT	TGG	56.3155293	55.6768038
136048764	1	TTTTCAGTCTTATCGAAGAGC	TAH	87.7701684	49.77967067	136049088	1	TTCTATGATATATAGATGATCT	TTG	61.4804186	57.9501286
136048765	1	CTGGGGTCTCTCGAAGAGC	GGG	88.7751684	53.77938841	136049093	1	TTTTCATGGCTAGAGCTTGG	TGG	61.4278973	53.9796768
136048786	1	TTAGAGGTCTTCCAAATATCT	GGG	84.1943123	53.0327131	136049033	1	TTTGGATGCTATTCTTGCT	AGG	58.9077967	55.9238807
136048787	1	TAAGTATATCTTCCGCAATG	TGG	65.3074869	45.22257603	136049032	1	TTGGGCTTCTATTCTTGCTT	GGG	64.6218937	28.7371298
136048787	1	TTTACGCTCTGCTCACTATG	TGG	84.7606429	48.66048569	136049036	1	TTGGTCTCCGCAAGGGCTCT	AGG	79.1560239	60.7090526
136048811	1	CGAGAGAGAGAGGATATGAAA	GGG	58.1874092	63.99087931	136049150	1	CGAAGAGCTCTGAGCTCTTG	GAG	56.4913042	50.8961074
136048822	1	CGAGAGAGAGAGAGAGCTGCA	AGG	56.9806828	57.51370151	136049154	1	CGAAGAGCTCGAGGCTCTGG	GAG	60.2041474	13.54538057
136048833	1	CGAGATATATAGAGATATAGAG	AGG	56.9678614	65.77952218	136049352	1	GAGAGAGCTGAGAGCTGAGG	GAG	82.1717491	62.3606222
136048836	1	TATCATATATATAGAGATGAG	AGG	55.2229209	52.62526467	136049353	1	CGATTCAGTATGATCTCTGGG	AGG	69.8719153	56.28719726
136048845	1	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	GGG	50.7880144	79.49318715	136049354	1	AGCTTCTGCTTATCTCTGAG	AGG	69.7490054	55.3748055
136048860	1	ATAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	AGG	57.3097515	69.7315601	136049366	1	AGAGATGATAGAGAGAGCTG	TGG	58.9207498	49.8495767
136048873	1	CGAAGAGAGAGAGAGAGAGAG	GGG	53.0954712	58.8816757	136049384	1	AGATCTGTGCTGATCTCTG	TGG	53.5586261	53.8237812
136048874	1	CGCAAGAGAGAGAGAGAGAGAG	AGG	50.0051697	46.08079637	136049385	1	CGCTGTGCTGATCTCTCTG	GGG	57.5079566	68.7823782
136048884	1	TTGAGAGATATGAGAGAGAGAG	GGG	58.6289875	58.8222058	136049386	1	CTCTGATGCTGATCTCTG	GAG	55.7980559	62.81054997
136048885	1	AGGATATATATGAGAGAGAGAG	AGG	68.1871687	63.0557908	136049387	1	CGAGATGCTCTGAGATCTG	TTG	61.6013989	56.5108875
136048888	1	AGGATATATATGAGAGAGAGAG	AGG	69.4118125	40.70448995	136049401	1	CGAGAGGCTCTAGAGATCT	AGG	66.0315477	28.09812731
136048906	1	TCTGTATATATAGAGAGAGAT	CGG	63.4016547	54.55337373	136049405	1	CGGAGATGCTAGAGATCTCA	GAG	66.5275204	47.87815994

【 図 2 6 - 2 】

Figure 26 (continued)

[illegible]

【 図 2 6 - 4 】

Figure 26 (continued)

422	1:41:0107807	49 789128.0	1:39:297.187	1	AGAGAG CTTAAATAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 98495124
423	1:41:0107808	49 789128.1	1:39:298.788	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969098
424	1:41:0107809	49 789128.2	1:39:299.797	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969100
425	1:41:0107810	55 546100.0	1:39:300.799	1	AGGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	09/01/1991	55 5461175
426	1:41:0107811	55 546100.1	1:39:301.799	1	CAATAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	09/01/1991	55 5461175
427	1:41:0107812	55 546100.2	1:39:302.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	09/01/1991	55 5461175
428	1:41:0107813	50 178134.0	1:39:303.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	09/01/1991	50 17813400
429	1:41:0107814	50 178134.1	1:39:304.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	09/01/1991	50 17813400
430	1:41:0107815	49 789128.3	1:39:305.799	1	GGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969101
431	1:41:0107816	49 789128.4	1:39:306.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969102
432	1:41:0107817	49 789128.5	1:39:307.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969103
433	1:41:0107818	49 789128.6	1:39:308.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969104
434	1:41:0107819	49 789128.7	1:39:309.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969105
435	1:41:0107820	49 789128.8	1:39:310.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969106
436	1:41:0107821	49 789128.9	1:39:311.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969107
437	1:41:0107822	49 789129.0	1:39:312.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969108
438	1:41:0107823	49 789129.1	1:39:313.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969109
439	1:41:0107824	49 789129.2	1:39:314.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969110
440	1:41:0107825	49 789129.3	1:39:315.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969111
441	1:41:0107826	49 789129.4	1:39:316.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969112
442	1:41:0107827	49 789129.5	1:39:317.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969113
443	1:41:0107828	49 789129.6	1:39:318.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969114
444	1:41:0107829	49 789129.7	1:39:319.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969115
445	1:41:0107830	49 789129.8	1:39:320.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969116
446	1:41:0107831	49 789129.9	1:39:321.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969117
447	1:41:0107832	49 789130.0	1:39:322.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969118
448	1:41:0107833	49 789130.1	1:39:323.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969119
449	1:41:0107834	49 789130.2	1:39:324.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969120
450	1:41:0107835	49 789130.3	1:39:325.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969121
451	1:41:0107836	49 789130.4	1:39:326.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969122
452	1:41:0107837	49 789130.5	1:39:327.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969123
453	1:41:0107838	49 789130.6	1:39:328.799	1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGG	08/01/1991	56 91969124

【 図 2 8 】

Figure 28. TGFBI領域におけるイントロン9~10のための例示的ガイド配列

[illegible]

【 図 3 2 - 1 】

Figure 32. TGFB1領域におけるイントロン13~14のための例示的ガイド配列

[illegible]

【 図 3 4 - 1 】

Figure 34. TGFBI領域におけるイントロン15~16のための例示的ガイド配列

[illegible]

1.5kb067/16	1	TGCGGGGC TTGGCGATGCT TTAGC	TCG
1.5kb067/28	1	TTTGGAGC ATACGCT TGCGGCGC TC	ATG
1.5kb067/34	-1	TCCTTGAAATTGGAGC ATACGCT CG	GCG

[illegible][illegible]

【図 3 4 - 2】

Figure 34 (continued)

13606780	1 GGTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	49,807,198	46,32,22805,13606780	1 GCTACAGGAGAGCTTCTTAA	TTG	5,7406,158	67,54499177
13606781	1 AGCTCTAGAGCTTACCTGCTG	TGG	29,900,721	44,871,193	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	67,1309508	88,7623404
13606784	1 GGTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	59,239006	50,181396,13606784	1 AGGCTCTAGAGGAGGCTTCTT	TAG	63,4744236	529,7757979
13606785	1 GGTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	41,24679,5	51,35406,13	1 GGTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	75,714438	12,2807946
13606786	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	TGG	49,942,953	19,032,809,13	1 AGGCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	83,6127799	86,851409,38
13606789	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	51,7180,23	20,040,199,13	1 AGGCTAGAGGAGGAGGCTTCTT	AGG	62,937997	40,327,204
13606790	1 GGTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	44,485845	75,77024,30	1 GGTCTAGAGGAGGAGGAGGCTT	AGG	15,547538	47,962897
13606799	1 GGTCTAGAGCTTACCTGCTG	TGG	54,545,276	15,175,287	1 GGTCTAGAGGAGGAGGAGGCTT	AGG	73,571835	60,88239463
13606800	1 GGTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	70,9870487	15,402018	1 GGTCTAGAGGAGGAGGAGGCTT	AGG	80,5127009	49,7160385
13606806	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	67,3579,36	76,4803808	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	36,700638	57,4574051
13606812	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	TGG	60,4991,39	25,767018	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	75,642763	57,2007704
13606814	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	60,726498	44,9384617	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	57,5730783	75,4815159
13606815	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	60,573093	54,802797	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	61,379379	54,7680796
13606817	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	TGG	71,98037	54,989992	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	51,515136	46,718087
13606818	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	67,575146	54,773728	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	63,947975	54,8151075
13606819	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	TGG	60,188305	50,992413	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	TGG	60,4935307	89,1339123
13606821	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	TGG	27,708999	47,880375	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	56,753033	102,7750736
13606827	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	76,286193	47,64367	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	57,466095	51,6697657
13606828	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	27,070906	41,960677	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	54,7978424	54,9827168
13606817	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	18,02395	64,960087	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	40,177085	54,9674738
13606817	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	51,297755	35,062302	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	65,2969797	52,8476233
13606818	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	19,921005	29,866139	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	60,513122	50,4656873
13606819	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	TGG	13,851041	15,183203	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	13,156467	50,8074073
13606823	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	38,367126	50,885383	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	67,9876464	65,4464567
				13606824	1 TCTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	44,607937	49,1589703

【図 3 5】

Figure 35. TGFβ1領域におけるイントロン16~17のための引示的ガイド配列

位置	配列	PM	特異スコア	効率スコア	位置	配列	PM	特異スコア	効率スコア
13606776	1 AATGATGATGATGATGATG	AGG	87,901067	99,878034	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	51,565657	40,5157895	
13606777	1 TTTGAGGATGATGATGATG	AGG	81,677747	96,677804	1 GGTCTAGAGCTTACCTGCTG	TGG	47,4877185	36,1407733	
13606782	1 GGTCTAGAGCTTACCTGCTG	AGG	62,900139	54,2104417	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	52,05913	50,3147729	
13606781	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	67,507171	61,9634713	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	57,997495	61,4079615	
13606784	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	63,211454	27,1964918	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	54,987095	68,1051444	
13606789	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	48,991909	17,3479787	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	61,171094	47,2017197	
13606794	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	57,771601	47,0679388	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	48,158989	51,6764615	
13606795	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	TGG	58,355781	47,2648575	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	61,987009	62,7079385	
13606790	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	67,49799	57,467796	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	71,610798	66,994792	
13606794	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	57,407564	57,6174409	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	75,051814	67,8801949	
13606794	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	48,215919	66,1374879	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	69,917951	57,8190560	
13606795	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	47,854778	57,0582379	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	61,5170901	51,1584308	
13606810	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	50,845975	49,9452807	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	55,082922	60,7485402	
13606795	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	39,675113	58,3217674	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	92,831321	76,4993003	
13606795	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	53,771184	58,8776787	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	52,868945	51,6771994	
13606796	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	56,771177	44,9897971	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	57,442668	50,8107834	
13606796	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	56,577768	17,1567647	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	54,742175	47,790706	
13606784	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	59,713143	41,0467368	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	60,647408	56,2527660	
13606795	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	56,813077	47,9678767	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	39,527608	54,3617466	
13606796	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	56,876706	65,674409	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	49,620098	51,7497941	
13606795	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	40,98187	52,7851916	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	43,640763	56,7087473	
13606794	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	52,948739	37,0513189	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	42,1760709	50,0284638	
13606792	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	56,680779	67,3634451	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	78,155596	48,6157317	
13606795	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	35,080601	39,9537323	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	53,571078	39,79147062	
13606794	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	50,951068	52,7894537	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	49,620098	51,7497941	
13606790	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	58,655781	47,7182178	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	56,980173	60,8789107	
13606787	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	27,854846	59,9077056	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	57,9810219	71,7913774	
13606790	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	52,948739	37,0513189	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	42,1760709	50,0284638	
13606795	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	56,680779	67,3634451	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	78,155596	48,6157317	
13606799	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	72,2408099	54,742331	1 TACGCTAGAGGAGGCTTCTT	AGG	38,1264755	47,7733686	

【配列表】

2019524149000001_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
Y		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)

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:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ 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.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOS: 10, 11

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. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ 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. ☒ 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. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ 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. ☒ 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

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ 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.
- ☐ 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 administering 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 administering 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.Cl.		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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(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 シーノオー 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 ネスビット アンドリュウ

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 シーノオー 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 シーノオー 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 クリスティー 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 シーノオー 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 シーノオー 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