

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7436145号  
(P7436145)

(45)発行日 令和6年2月21日(2024.2.21)

(24)登録日 令和6年2月13日(2024.2.13)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09 1 1 0
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00
請求項の数 15 (全39頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2018-563152(P2018-563152)	(73)特許権者	591100596
(86)(22)出願日	平成29年6月2日(2017.6.2)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サ
(65)公表番号	特表2019-517262(P2019-517262		ンテ エ ドゥ ラ ルシェ ルシュ メディカル
	A)		フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、
(43)公表日	令和1年6月24日(2019.6.24)		リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1
(86)国際出願番号	PCT/EP2017/063549	(73)特許権者	516369608
(87)国際公開番号	WO2017/207797		イセエム (アンスティチュ・デュ・セル
(87)国際公開日	平成29年12月7日(2017.12.7)		ヴォー・エ・ドゥ・ラ・ムワル・エビニ
審査請求日	令和2年5月25日(2020.5.25)		エール)
審判番号	不服2022-10650(P2022-10650/J		ICM (INSTITUT DU CER
	1)		VEAU ET DE LA MOELLE
審判請求日	令和4年7月7日(2022.7.7)		EP INIERE)
(31)優先権主張番号	16172964.5		フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、
(32)優先日	平成28年6月3日(2016.6.3)		ブルヴァール・ドゥ・ロピタル 4 7
(33)優先権主張国・地域又は機関			/ 8 3、オピタル・ピティエ・サルベト
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C a s 9ヌクレアーゼをコードする核酸の食餌コントロール発現及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体の少なくとも1つのターゲット細胞におけるC a sヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸であって、

- 最小プロモーターと、1～20個のA A R E (アミノ酸応答エレメント)核酸とを含む調節ポリヌクレオチドであって、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌の消費により、個体において活性化される調節ポリヌクレオチド；及び

- C a sヌクレアーゼをコードする核酸であって、前記調節ポリヌクレオチドのコントロール下に置かれた核酸を含む、核酸。

【請求項 2】

C a sヌクレアーゼがC a s 9ヌクレアーゼである、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】

アミノ酸応答エレメント (A A R E) 核酸が、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4 及び配列番号：5 の配列の核酸を含む群において選択される、請求項 1 又は 2 に記載の核酸。

【請求項 4】

調節ポリヌクレオチドが2～10個のA A R E 核酸を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 5】

調節ポリヌクレオチドが 2 ～ 6 個の A A R E 核酸を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 6】

C a s ヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸ベクターであって、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の核酸を含む、核酸ベクター。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の核酸又は請求項 6 に記載の核酸ベクターを含む、送達粒子。

【請求項 8】

ターゲット細胞の膜に露出したターゲットレセプターに対する結合に適切な 1 つ以上のリガンドをその表面に含む、請求項 7 に記載の送達粒子。

10

【請求項 9】

( i ) 請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の核酸又は請求項 6 に記載の核酸ベクター又は請求項 7 若しくは 8 に記載の送達粒子と、( i i ) 薬学的に許容し得るビヒクルとを含む、医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の核酸又は請求項 6 に記載の核酸ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 11】

医薬として使用するための、請求項 9 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 12】

少なくとも 1 つのターゲット細胞中にゲノムを編集するための活性剤として使用するための、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

ターゲット細胞が少なくとも遺伝子突然変異を有する、請求項 12 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 14】

疾患を予防及び／又は治療するための活性剤として使用するための、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

30

疾患を治療及び／又は予防するためのキットであって、

- 請求項 9 に記載の医薬組成物、及び
- 薬学的に活性化化合物

を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、個体における C a s 9 ヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸に関する。

40

【0002】

特に、核酸の発現は、少なくとも 1 つの必須アミノ酸が欠乏した食餌の消費により、コントロールされ得る。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

ターゲティング可能なヌクレアーゼを使用したゲノム編集は、細菌から植物及び動物（ヒトを含む）に至る生物の正確なゲノム改変のための新たな技術である。その魅力は、他の種類の方法ではターゲットゲノム改変が不可能であったほぼ全ての生物に使用可能であることである。

50

## 【 0 0 0 4 】

例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ ( Z F N )、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ ( T A L E N ) 及びメガヌクレアーゼを実行するターゲットゲノム改変への最近のアプローチにより、科学界では、二本鎖切断を導入して修復経路を活性化することによって、永久的な突然変異を生成することが可能になった。

## 【 0 0 0 5 】

ゲノム中の所望の位置において D N A 二本鎖切断を生成する Z F N 及び T A L E N のような設計ヌクレアーゼの能力は、遺伝子座特異的ゲノム操作の治療応用に対する楽観的な見方を作り出した。しかしながら、これらのアプローチは操作に費用及び時間がかかり、特に、大規模なハイスループットの研究では、それらの広範な使用が制限される。

10

## 【 0 0 0 6 】

より最近では、完全に別個の特異的な系 (すなわち、*Streptococcus pyogenes* 由来の細菌 C R I S P R 関連タンパク質 - 9 ヌクレアーゼ ( C a s 9 ) ) をベースとする新たなツールが大きな関心を生んでいる。

## 【 0 0 0 7 】

他の遺伝子編集方法とは異なり、それは安価で迅速で使いやすく、世界中の研究室で急速に広がった。この系の力は、ゲノム配列及び遺伝子発現の高効率なターゲット変化を実施することであり、間違いなく、バイオテクノロジーの全ての分野を変革し、ヒト疾患のための新規分子治療薬の開発を促すであろう。

## 【 0 0 0 8 】

20

2 0 1 2 年におけるその初期実証の後、C R I S P R / C a s 9 系は広く採用されている。この系は既に、ヒト (Mali et al., 2013, Science, Vol. 339: 823-826)、細菌 (Fa bre et al., 2014, PLoS Negl. Trop. Dis., Vol. 8:e2671)、ゼブラフィッシュ (Hwang et al., 2013, PLoS One, Vol. 8:e68708)、C. elegans (Hai et al., 2014 Cell Res. doi: 10.1038/cr.2014.11)、植物 (Mali et al., 2013, Science, Vol. 339: 823-826)、Xenopus tropicalis (Guo et al., 2014, Development, Vol. 141: 707-714)、酵母 (DiCarlo et al., 2013, Nucleic Acids Res., Vol. 41: 4336-4343)、ショウジョウバエ (Gratz et al., 2014 Genetics, doi:10.1534/genetics.113.160713)、サル (Niu et al., 2014, Cell, Vol. 156: 836-843)、ウサギ (Yang et al., 2014, J. Mol. Cell B iol., Vol. 6: 97-99)、ブタ (Hai et al., 2014, Cell Res. doi: 10.1038/cr.2014.11)、ラット (Ma et al., 2014, Cell Res., Vol. 24: 122-125) 及びマウス (Mashiko et al., 2014, Dev. Growth Differ. Vol. 56: 122-129) を含む多くの細胞株及び生物において、重要な遺伝子をターゲットングするために使用され成功している。

30

## 【 0 0 0 9 】

加えて、ゲノム編集は、前臨床レベル及び第 I 相臨床試験において数多くの疾患に適用され成功している (例えば、Cox et al., Nat Med. 2015 Feb;21(2):121-31 による総説を参照のこと)。ゲノム編集ベースの治療の実行可能性の評価では、最初に、所望の遺伝子変化の治療効果を明確に立証すべきである。続いて、所定の戦略の成功は、治療改変「閾値」が達成される容易性、編集細胞の適性によって決定される基準、ゲノムを編集するために利用される D S B 修復経路、及びターゲット細胞型へのゲノム編集分子の送達効率に依存するであろう。

40

## 【 0 0 1 0 】

しかしながら、その能力にもかかわらず、C R I S P R - C a s 9 技術は、現在、編集プロセスに関連するオフターゲット効果 (すなわち、望ましくないゲノム位置におけるゲノム編集) によって、及び細菌ヌクレアーゼ C a s 9 の免疫原性によって大きく制限されている。

## 【 0 0 1 1 】

これまでは、Porteus (Genome Biology, 2015, 16:286) によって強調されているように、オフターゲット問題は、ヌクレアーゼ活性を支配する機構的特徴に固有のものであると思われる。Porteusは、「適切な送達戦略の決定において重要な検討事項は、遺

50

伝子増大戦略とは対照的に、ゲノム編集がヒット・アンド・ランアプローチであることである」と考えている。さらに、Porteusは、「ヌクレアーゼの持続的発現は、不要であるだけでなく回避すべきであり、ヌクレアーゼの継続的発現は、有害なゲノム不安定性の確率を増加させ、編集細胞の適性を損ない得るか、又は細胞がトランスフォーメーションを受けやすくし得る」と考えている。最後に、Porteusは、「細胞のin vivo編集を必要とする治療適用では、課題がより大きく、解決策が決定されていない」と結論付けている。

【0012】

いくつかの適用において有害であり得るオフターゲットを緩和するための直接的な手段は、より大きな特異性を有する新規ヌクレアーゼを同定／設計することである。

【0013】

したがって、当技術分野では、特に、安全な遺伝子治療アプローチのために、個体におけるCasヌクレアーゼ（特に、Cas9ヌクレアーゼ）をコードする核酸の発現のための新たな微調整コントロール発現系を提供する必要がある。

【発明の概要】

【0014】

本発明の一態様は、個体におけるCasヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸であって、

- 最小プロモーターと、少なくとも1個のAARE（アミノ酸応答エレメント）核酸とを含む調節ポリヌクレオチドであって、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌の消費により、個体において活性化される調節ポリヌクレオチド；及び

- Casヌクレアーゼをコードする核酸であって、前記調節ポリヌクレオチドのコントロール下に置かれた核酸

を含む核酸に関する。

【0015】

本発明の別の態様は、Casヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸ベクターであって、本明細書で定義される核酸を含む核酸ベクターに関する。

【0016】

本発明のさらに別の態様は、本明細書で定義される核酸又は核酸ベクターを含む送達粒子に関する。

【0017】

別の態様では、本発明はまた、(i)本明細書で定義される核酸又は核酸ベクター又は送達粒子と、(ii)薬学的に許容し得るビヒクルとを含む医薬組成物に関する。

【0018】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で定義される核酸又は核酸ベクターを含む宿主細胞に関する。

【0019】

本発明の別の態様は、医薬として使用するための、本明細書で定義される医薬組成物に関する。

【0020】

さらなる態様では、本発明はまた、少なくとも1つのターゲット細胞中のゲノムを編集するための活性剤として使用するための、本明細書で定義される医薬組成物に関する。

【0021】

一態様では、本発明は、少なくとも1つのターゲット細胞中のゲノムを編集するための方法であって、本明細書で定義される医薬組成物を、それを必要とする個体に投与する工程を少なくとも含む方法に関する。

【0022】

別の態様では、本発明は、疾患を予防及び／又は治療するための活性剤として使用するための、本明細書で定義される医薬組成物に関する。

【0023】

本発明の一態様はまた、疾患を予防及び／又は治療するための方法であって、本明細書

10

20

30

40

50

で定義される医薬組成物を、それを必要とする個体に投与する工程を少なくとも含む方法に関する。

【0024】

最後に、さらなる態様では、本発明は、疾患を治療及び／又は予防するためのキットであって、

- 本明細書で定義される医薬組成物、及び
- 薬学的に活性な化合物

を含むキットに関する。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】GCN2 - eIF2 - ATF4シグナリング経路を示すスキーム。EAA飢餓に応じて、活性化GCN2はeIF2をリン酸化し、転写因子ATF4のアップレギュレーション及びAARE配列へのそのリクルートをもたらし、ターゲット遺伝子発現を誘導する。

【図2】AARE - Casヌクレアーゼ構築物の描写を示すスキーム：6コピーのTrb3由来AARE（黒点）プロモーター及びTk最小プロモーターがこの構築物を構成する。

【図3】pTrip - 2xAARE - NLS - FLAG - CAS9プラスミドを示すスキーム。pTKは、最小TKプロモーターの位置を示す；2xAAREは、AARE核酸の位置を示す；矢印「NLS - FLAG - CAS9」は、Cas9ヌクレアーゼをコードする核酸の位置を示す；矢印「AmpR」は、アンピシリン耐性をコードする核酸を表す。

【図4】pTRIP - blast\_\_U6 - AAVS1\_\_2xAARE - Cas9 - Flag - RFPプラスミドを示すスキーム。下パネルは、上パネルの続きである。上パネルの右端のEcoR1制限部位は、下パネルの左端のEcoR1制限部位を指す。

【図5】ロイシンが欠乏した培地（293T - C9 Leu - ；実線）又はツニカマイシンを含む培地（293T - C9 Tu ；破線）のいずれかを用いて、T0の時点において誘導した際の293T細胞におけるCas9発現を示すプロット。T0の時点において誘導を実施し、24時間の時点において除去する。誘導を除去した24時間後及び48時間後に（すなわち、それぞれT0 + 48時間及びT0 + 72時間の時点において）、発現をモニタリングする。横軸はタイムライン（時）を表し、縦軸はCas9ヌクレアーゼのバンド強度を表し、したがってCas9発現を表すものである。誘導の24時間後に、Cas9の最大発現（これが任意に100%の発現を表す）が観察される。

【図6】293T細胞のゲノムのAAVS1部位におけるドナーDNA（Do）の組み込みを示すプロット。プラスミド「pTRIP - blast\_\_U6 - AAVS1\_\_2xAARE - Cas9 - flag - RFP」（C9）と、カセット「AAVS1切断部位 - GFP - p2a - プューロマイシン\_\_AAVS1切断部位」を含有するドナープラスミド（Do）とで293T細胞をトランスフェクションした。ツニカマイシン（293 + Do + C9 i Tu）の存在下で、又はロイシン枯渇培地（293 + Do + C9 i Leu - ）を用いて誘導した際のプューロマイシン耐性細胞の数（縦軸）をカウントする。コントロールとして、誘導の非存在下（293 + Do + C9 ni）、両プラスミド（Do及びC9）でトランスフェクションした293T細胞をアッセイする。最後に、C9プラスミドのいかなるコピーも有しない293T細胞をドナープラスミド（Do）でトランスフェクションし、プューロマイシン耐性細胞の数をさらにカウントした。

【図7】図6と同様に、1コピーのC9プラスミドを含有する293T細胞（293 - C9細胞）のゲノムのAAVS1部位におけるドナーDNA（Do）の組み込みを示すプロット。カセット「AAVS1切断部位 - GFP - p2a - プューロマイシン\_\_AAVS1切断部位」を含有するドナープラスミド（Do）で293 - C9細胞をトランスフェクションした。ツニカマイシン（293\_\_C9 + Do i Tu）の存在下で、又はロイシン枯渇培地（293\_\_C9 + Do i Leu - ）を用いて誘導した際のプューロマイシン耐性細胞の数（縦軸）をカウントする。コントロールとして、誘導の非存在下（293\_\_C9 + Do - ni）、プラスミドDoでトランスフェクションした293 - C9細胞をアッセ

10

20

30

40

50

イする。最後に、誘導の非存在下、ドナープラスミド (D<sub>o</sub>) でトランスフェクションしたピューロマイシン耐性 293 - C9 細胞の数をさらにカウントした。

【発明を実施するための形態】

【0026】

発明の詳細な説明

本明細書で言及される引用は、参照により組み入れられる。

【0027】

本発明者らは、遺伝子治療に理想的に適した調節系を達成するために、1つの必須アミノ酸が枯渇した食餌に対する栄養適応経路の顕著な特徴を評価した。本発明者らは、食餌特異的アミノ酸飢餓ベースの系が、合成転写因子又は調節タンパク質の発現も薬理的誘導因子の投与も必要としないことを見出した。それは生理学的に非毒性であり、臨床適用に適切である。この新規な栄養ベースの調節系は、ヒト遺伝子治療における未解決の主要問題の1つを解決する能力を有する生理学的アプローチである。

10

【0028】

理論に縛られるものではないが、本発明者らは、本明細書に開示されるコントロール発現系が、C a sヌクレアーゼ (C R I S P R (クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)) 関連タンパク質) の微調整発現のための特に適切な系であると考ええる。

【0029】

国際公開公報第2013/068096号には、いくつかのタンパク質のためのこのようなコントロール発現系が開示されており、ルシフェラーゼタンパク質の発現を用いて概念実証が実施されたことに注目すべきである。Chaveroux et al. (Science Signaling, 2015, vol. 8(374), 1-10)では、e I F 2 α - A T F 4シグナリング経路の特性評価のためにこの系が利用された。

20

【0030】

しかしながら、ターゲット宿主細胞においてC a sヌクレアーゼを発現させることに関する制約 (例えば、漏出の非存在) により、国際公開公報第2013/068096号及びChaveroux et al.に開示されている栄養ベースの調節系は、C a sヌクレアーゼのコントロール発現のための適切なツールを提供しないと予想され得る。

【0031】

30

本明細書に開示されるように、C a sヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸は、効率的なコントロール発現系の欠如 (発現の「漏出」) により通常観察されるオフターゲットを制限又は回避することを可能にする。

【0032】

・C a sヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸

本発明の第1の態様は、個体におけるC a sヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸であって、

- 最小プロモーターと、少なくとも1個のA A R E (アミノ酸応答エレメント) 核酸とを含む調節ポリヌクレオチドであって、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌の消費により、個体において活性化される調節ポリヌクレオチド; 及び

40

- C a sヌクレアーゼをコードする核酸であって、前記調節ポリヌクレオチドのコントロール下に置かれた核酸

を含む核酸に関する。

【0033】

別の態様では、本発明はまた、個体の少なくとも1つのターゲット細胞におけるC a sヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸であって、

- 最小プロモーターと、少なくとも1個のA A R E (アミノ酸応答エレメント) 核酸とを含む調節ポリヌクレオチドであって、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌の消費により、個体において活性化される調節ポリヌクレオチド; 及び

- C a sヌクレアーゼをコードする核酸であって、前記調節ポリヌクレオチドのコントロール

50

ール下に置かれた核酸  
を含む核酸に関する。

【 0 0 3 4 】

本発明の範囲内では、「コントロール発現」という表現は、誘導の瞬間、誘導の持続時間に関して、発現が正確に誘導されるか又は「オン」になり、停止するか又は「オフ」になることを意味することを意図する。

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施態様では、C a sヌクレアーゼは、クラスI C a sヌクレアーゼ、クラスII C a sヌクレアーゼ及びクラスIII C a sヌクレアーゼを含む群において選択される。

10

【 0 0 3 6 】

タイプI、タイプII又はタイプIII C a sタンパク質について、当業者であれば、Chylinski et al. (2014, Nucleic Acids Research, Vol. 42(10) : 6091-6105); Sinkunas et al. (2011, The EMBO Journal, Vol. 30(7) : 1335-1342); Aliyari et al. (2009, Immunological Reviews, Vol. 227(1) : 176-188); Cass et al. (Biosci Rep, doi:10.1042/BSR20150043), Makarova et al. (2011, Biology Direct, Vol. 6 : 38); Gasiunas et al. (2012, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 109(39) : E2579-E2586); Heler et al. (2015, Nature, Vol. 519(7542) : 199-202); Esvelt et al. (2013, Nat Methods, Vol. 10(11) : doi :10.138/nmeth.2681), Zetsche et al. (Cell. 2015 Oct 22;163(3):759-771)又はChylinski et al. (2013, Biology, Vol. 10(5) : 726-737)を参照し得る。

20

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施態様では、クラスI C a sヌクレアーゼは、C a s 3、C a s 8 a、C a s 8 b、C a s 8 c、C a s 1 0 d、C s e 1 及びC s y 1を含む群において選択される。

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施態様では、クラスII C a sヌクレアーゼは、C a s 9、C p f 1、C s n 2 及びC a s 4 を含む群において選択される。

【 0 0 3 9 】

いくつかの実施態様では、クラスIII C a sヌクレアーゼは、C a s 1 0、C s m 2 及びC m r 5 を含む群において選択される。

30

【 0 0 4 0 】

いくつかの実施態様では、C a sヌクレアーゼは、C a s 9ヌクレアーゼである。

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施態様では、C a s 9ヌクレアーゼは、細菌源、特に、Acaryochloris marina、Actinomyces naeslundii、Alcanivorax dieselolei、Belliella baltica、Campylobacter jejuni、Corynebacterium diphtheriae、Coriobacterium glomerans、Corynebacterium ulcerans、Desulfomonile tiedjei、Dickeya dadantii、Escherichia coli、Francisella tularensis、Lactobacillus kefirianofaciens、Listeria innocua、Methylobacterium extorquens、Micrococcus luteus、Myxococcus fulvus、Neisseria meningitidis、Pasteurella multocida、Prevotella intermedia、Prochlorococcus marinus、Psychroflexus torquis、Sphaerobacter thermophilus、Sphingobacterium sp.、Staphylococcus aureus、Streptococcus mutans、Streptococcus pneumoniae、Streptococcus pyogenes、Streptococcus thermophilus及びStreptomyces bingchenggensisを含む群において選択される細菌に由来し得る。

40

【 0 0 4 2 】

いくつかの実施態様では、C a s 9ヌクレアーゼは、古細菌源、例えばMethanoculleus bourgensisなどに由来し得る。

【 0 0 4 3 】

限定されないが、本明細書に開示されるC a s 9ヌクレアーゼは、天然に存在するC a

50

s 9ヌクレアーゼのホモログ、パラログ及びオルソログ及び変異体を包含する。

【0044】

特定の実施態様では、Cas9変異体は、SpCas9-HF1 (Kleinstiver et al.; Nature. 2016 Jan 28;529(7587):490-5)、fCas9 (これは、触媒的に不活性なCas9とFokIヌクレアーゼと融合物である(Guilinger et al.; Nat. Biotechnol. 2014; 32(6): 577-582))及びSlaymaker et al. (Science. 2016 Jan 1;351(6268):84-8)によって開示されているように改善された特異性を有する任意の合理的に操作されたCas9ヌクレアーゼを含む得る。

【0045】

いくつかの実施態様では、Cas9ヌクレアーゼをコードする核酸及び/又はCas9ヌクレアーゼをコードするベクターは、例えば、SIGMA-ALDRICH (登録商標) から市販されているものであり得る。

【0046】

いくつかの他の実施態様では、Casヌクレアーゼは、タンパク質の指向性進化のための方法によって同定され得る。Packer and Liu (Nat Rev Genet. 2015 Jul;16(7):379-94)。

【0047】

いくつかの実施態様では、Casヌクレアーゼは、DNA又はRNAガイドCasヌクレアーゼである。

【0048】

本発明の範囲内では、「DNA又はRNAガイド」は、ガイドDNA又はRNAの存在下で、Casヌクレアーゼが核酸(この配列は、ガイドDNA及びRNAと相補的である)にターゲティングされることを意味することを意図する。特定の実施態様では、Casヌクレアーゼをコードする核酸の発現は、Casヌクレアーゼをコードする核酸の転写に起因するmRNA発現の測定、及び/又はCasヌクレアーゼ発現の測定を含む当技術分野で使用可能な任意の適切な方法によって測定され得る。

【0049】

いくつかの実施態様では、Casヌクレアーゼ発現の測定は、前記Casヌクレアーゼに特異的に結合する抗体(anti- antibodies)を用いて、Casヌクレアーゼの発現を測定することによって実施され得る。

【0050】

本発明の範囲内では、誘導発現は、基本非誘導発現と比較した発現倍率として表され得る。

【0051】

いくつかの実施態様では、誘導発現は、基本発現と比較して2倍~10,000倍、好ましくは4倍~500倍、より好ましくは8倍~250倍、最も好ましくは10倍~1000倍で変動し得る。

【0052】

本発明の範囲内では、2倍~10,000倍は、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍、1,000倍、2,000倍、3,000倍、4,000倍、5,000倍、6,000倍、7,000倍、8,000倍及び9,000倍を含む。

【0053】

本発明の範囲内では、「最小プロモーター」という表現は、下流に位置する目的の遺伝子の転写を適切に開始させるために必要な全てのエレメントを含むプロモーターを意味することを意図する。本発明の範囲内では、「最小プロモーター」及び「コアプロモーター」は、同等の表現であるとみなされる。当業者であれば、「最小プロモーター」が、少なくとも転写開始部位、RNAポリメラーゼのための結合部位、及び一般的な転写因子のた

10

20

30

40

50



めの結合部位 (T A T A ボックス) を含むことを理解する。

【 0 0 5 4 】

適切な最小プロモーターは、当業者に公知である。

【 0 0 5 5 】

いくつかの実施態様では、本発明を行うために適切な最小プロモーターは、チミジンキナーゼのプロモーター、 $\beta$ -グロビンのプロモーター、サイトメガロウイルス (C M V) のプロモーター、S V 4 0 プロモーターなどを含む群において選択され得る。

【 0 0 5 6 】

いくつかの実施態様では、個体は、ヒト又は非ヒト哺乳動物、好ましくはヒトである。

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施態様では、非ヒト哺乳動物は、ペット、例えばイヌ、ネコ、家畜ブタ、ウサギ、フェレット、ハムスター、マウス、ラットなど；霊長類、例えばチンパンジー、サルなど；経済的に重要な動物、例えばウシ、ブタ、ウサギ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、マウス、ラットを含む群において選択される。

【 0 0 5 8 】

本発明の範囲内では、「ターゲット細胞」は、C a s スクレアーゼの発現が有益な前記個体に由来する細胞を指すことを意図する。

【 0 0 5 9 】

本発明の範囲内では、「必須アミノ酸」という表現は、ヒスチジン (H i s、H)、イソロイシン (I l e、I)、ロイシン (L e u、L)、リシン (L y s、K)、メチオニン (M e t、M)、フェニルアラニン (P h e、F)、トレオニン (T h r、T)、トリプトファン (T r p、W) 及びバリン (V a l、V) を含む。

【 0 0 6 0 】

本発明の範囲内では、「少なくとも1つの必須アミノ酸」という表現は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ又は9つの必須アミノ酸を意味することを意図する。

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌は、10分、15分、20分、25分、30分、45分、1時間、1時間30分、2時間、2時間30分、3時間、3時間30分、4時間、4時間30分、5時間、5時間30分、6時間、6時間30分、7時間、7時間30分、8時間、8時間30分、9時間、9時間30分、10時間、10時間30分、11時間、11時間30分を含む5分～12時間の期間にわたって個体に投与され得る。

【 0 0 6 2 】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌は、個体に1日1回、2回、3回、4回、5回、6回又はそれ以上投与され得る。

【 0 0 6 3 】

特定の実施態様では、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌は、個体に1日1回又は2回投与され得る。

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌は、早朝に、例えば朝食で個体に投与され得、次いで、個体は、昼食及び夕食で通常の食餌を投与され得る。

【 0 0 6 5 】

本発明の範囲内では、「通常の食餌」という表現は、いかなる必須アミノ酸も欠乏していない食餌を意味することを意図する。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌は、個体に毎日、隔日、週1回、週2回、週3回投与され得る。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌は、半日、1

10

20

30

40

50

日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日又はそれ以上の期間にわたって個体に投与され得る。

【0068】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌は、毎週、隔週、毎月、又はそれ以上反復され得る。

【0069】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した食餌は、MILUPA（登録商標）の名称でNUTRICA METABOLICS（登録商標）から市販されているイソロイシンフリー、ロイシンフリー及びバリンフリーの粉末食品によって提供され得る。この食餌は、メーブルシロップ尿疾患（この疾患は、分枝鎖アミノ酸代謝に影響を及ぼすと思われる）を有する個体に適合される。

10

【0070】

特定の実施態様では、ロイシンフリー、イソロイシンフリー又はバリンフリーの食餌は、イソロイシンフリー、ロイシンフリー及びバリンフリーの粉末を2つの他のアミノ酸の外部供給源と混合することによって得られ得る。

【0071】

特定の実施態様では、フェニルアラニンフリーの食餌は、MEAD JOHNSON（登録商標）から市販されているフェニルアラニンフリーの粉末によって提供され得る。この食餌は、フェニルケトン尿症を有する個体に適合される。

20

【0072】

実際には、粉末は、所望の必須アミノ酸を含まない適合された液体又は半固体食と混合される。

【0073】

特定の実施態様では、アミノ酸飢餓は、ハロフジノン、又は分子「4（3H）-キナゾリノン，7-ブromo-6-クロロ-3-[3-（3-ヒドロキシ-2-ピペリジニル）-2-オキソプロピル]-，trans-（±）-」に対応する任意の他の名称のもの、又は例えばHalocur、Stenorol、Flavomycin、Lincomix、Stafacとして商品化されているものの投与によって模倣され得る。

【0074】

一実施態様では、アミノ酸応答エレメント（AARE）核酸は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4及び配列番号：5の配列の核酸を含む群において選択される。

30

【0075】

本発明の範囲内では、「少なくとも1個のAARE核酸」という表現は、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個及び少なくとも5個のAARE核酸を含む。したがって、「少なくとも1個のAARE核酸」という表現は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個及び20個のAARE核酸を含む。

【0076】

特定の実施態様では、調節ポリヌクレオチドは、少なくとも2個のAARE核酸を含む。

40

【0077】

いくつかの他の実施態様では、調節ポリヌクレオチドは、1～20個のAARE核酸、好ましくは2～10個のAARE核酸を含む。

【0078】

特定の実施態様では、調節ポリヌクレオチドは、2～6個のAARE核酸を含む。

【0079】

いくつかの実施態様では、調節ポリヌクレオチドは、配列番号：2及び配列番号：4の配列の核酸を含む群において選択される2個のAARE核酸を含む。

【0080】

50

いくつかの実施態様では、調節ポリヌクレオチドは、配列番号：１の配列の６個のＡＡＲＥ核酸を含む。

【００８１】

特定の実施態様では、２個のＡＡＲＥ核酸又はあるいは少なくとも２個のＡＡＲＥ核酸は、同一又は別個のものであり得る。

【００８２】

いくつかの実施態様では、Ｃａｓヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸に含まれる調節ポリヌクレオチドはまた、個体へのハロフジノン、ツニカマイシンなど（すなわち、ＡＡＲＥ核酸の活性化特性を有することが公知の化合物）の投与により活性化され得る。

【００８３】

・核酸ベクター

別の態様では、本発明はまた、Ｃａｓヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸ベクターであって、本明細書で定義されるＣａｓヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸を含む核酸ベクターに関する。

【００８４】

いくつかの実施態様では、本発明のＣａｓヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸は、遺伝子治療に適切なベクターに組み込まれる。

【００８５】

本発明の範囲内では、「遺伝子治療に適切なベクター」という表現は、ベクターが、ターゲット細胞におけるＣａｓヌクレアーゼをコードする核酸の発現を達成するための必須エレメントを含むことを意味することを意図する。

【００８６】

特定の実施態様では、ベクターは、ウイルスベクターである。

【００８７】

いくつかの実施態様では、ウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、アルファウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、非組み込み型レンチウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス及びバキュロウイルスを含む群において選択される。

【００８８】

・送達粒子

いくつかの実施態様では、本明細書で定義されるＣａｓヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクターは、特に他の化合物と一緒に、例えば脂質、タンパク質、ペプチド又はポリマーなどと共に粒子に含まれ得る。

【００８９】

本発明の範囲内では、前記粒子又は「送達粒子」は、Ｃａｓヌクレアーゼをコードする核酸又はＣａｓヌクレアーゼをコードする前記核酸を含む核酸ベクターをターゲット細胞に提供又は「送達」することを意図する。

【００９０】

さらに他の態様では、本発明はさらに、本明細書で定義されるＣａｓヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクターを含む送達粒子に関する。

【００９１】

特定の実施態様では、送達粒子は、カチオン性脂質を含みリポプレックス；脂質ナノエマルジョン；固体脂質ナノ粒子；ペプチドベースの粒子；特に天然及び／又は合成ポリマーを含むポリマーベースの粒子の形態であり得る。

【００９２】

いくつかの実施態様では、ポリマーベースの粒子は、タンパク質；ペプチド；多糖、特にキトサンを含み得る。

【００９３】

いくつかの実施態様では、ポリマーベースの粒子は、合成ポリマー、特に、ポリエチレ

10

20

30

40

50

ンイミン（PEI）、デンドリマー、ポリ（DL-ラクチド）（PLA）、ポリ（DL-ラクチド-コ-グリコシド）（PLGA）、ポリメタクリレート及びポリホスホエステルを含み得る。

【0094】

いくつかの実施態様では、送達粒子は、ターゲット細胞の膜に露出したターゲットレセプターに対する結合に適切な1つ以上のリガンドをその表面に含む、

【0095】

・医薬組成物

本発明の別の態様は、(i)本明細書で定義されるCasヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクター又は送達粒子と、(ii)薬学的に許容し得るビヒクルとを含む医薬組成物に関する。

10

【0096】

本発明の医薬組成物の製剤化は、当業者に周知である。

【0097】

本明細書で言及されるように、本開示で定義されるCasヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクター又は送達粒子は、活性剤に相当し得る。

【0098】

いくつかの実施態様では、医薬組成物は、唯一の活性剤として、本開示で定義されるCasヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクター又は送達粒子を含み得る。

20

【0099】

いくつかの実施態様では、本発明の適切な薬学的に許容し得るビヒクルとしては任意の及び全ての従来の溶媒、分散媒、充填剤、固体担体、水性溶液、コーティング剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などが挙げられる。

【0100】

特定の実施態様では、適切な薬学的に許容し得るビヒクルとしては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール及びそれらの混合物が挙げられ得る。

【0101】

いくつかの実施態様では、薬学的に許容し得るビヒクルは、細胞の貯蔵寿命又は有効性を増強する微量の補助物質、例えば湿潤剤又は乳化剤、保存剤又はバッファーをさらに含み得る。薬学的に許容し得るビヒクルの調製及び使用は、当技術分野で周知である。

30

【0102】

任意の従来の媒体又は薬剤が有効成分と不適合である場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるその使用が企図される。

【0103】

いくつかの実施態様では、医薬組成物は、任意の経路によって、すなわち経口投与、局所投与又は非経口投与によって、例えば皮下投与、静脈投与、動脈投与、筋肉内投与、眼内投与及び耳介内投与を含む注射によって、それを必要とする個体に投与され得る。

40

【0104】

特定の実施態様では、注射による医薬組成物の投与は、特に、前記医薬組成物に含まれる核酸又は核酸ベクターの拡散を回避するために、目的のターゲット組織において直接実施され得る。

【0105】

本発明者らは、脳組織がターゲットである場合、これが特に重要であると考える。核酸ベクターの注入は、例えば、磁気共鳴断層撮影装置を利用して、特にフレイムレス定位照準デバイスを使用して、脳組織の特定部分において非常に正確に行われ得る。今や、MRIガイドンス及び新たな定位照準デバイスの使用は、神経遺伝子治療のための強固な基盤を確立して、介入神経学において認められた手順になっている。

50

## 【 0 1 0 6 】

他の投与様式は、肺製剤、座薬及び経皮適用を用いる。

## 【 0 1 0 7 】

いくつかの実施態様では、本発明の経口製剤は、通常の賦形剤、例えば医薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。

## 【 0 1 0 8 】

いくつかの実施態様では、有効量の前記化合物は、それを必要とする前記個体に投与される。

## 【 0 1 0 9 】

本発明の範囲内では、「有効量」は、単独で所望の転帰を刺激する（すなわち、包含される疾患、特に遺伝性障害の症候を緩和又は根絶する）前記化合物の量を指す。

## 【 0 1 1 0 】

所望の転帰を観察するために、C a sヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクター又は送達粒子の有効量を決定することは、当業者の通常の知識の範囲内である。

## 【 0 1 1 1 】

本発明の範囲内では、投与すべき化合物の有効量は、医師又は当業者によって決定され得、処置の時間経過内において適切に適合され得る。

## 【 0 1 1 2 】

特定の実施態様では、投与すべき有効量は、投与のために選択される材料、投与が単回投与又は複数回投与であるか、並びに年齢、身体状態、サイズ、体重、性別及び処置すべき疾患の重症度を含む個体のパラメータを含む様々なパラメータに依存し得る。

## 【 0 1 1 3 】

特定の実施態様では、有効量の活性剤は、約 0 . 0 0 1 mg ~ 約 3 0 0 0 mg / 投与量単位、好ましくは約 0 . 0 5 mg ~ 約 1 0 0 mg / 投与量単位を含み得る。

## 【 0 1 1 4 】

本発明の範囲内では、約 0 . 0 0 1 mg ~ 約 3 0 0 0 mg は、約

## 【表 1】

0.002 mg, 0.003 mg, 0.004 mg, 0.005 mg, 0.006 mg, 0.007 mg,  
0.008 mg, 0.009 mg, 0.01 mg, 0.02 mg, 0.03 mg, 0.04 mg, 0.05 mg, 0.06 mg, 0.07 mg,  
0.08 mg, 0.09 mg, 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4 mg, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg, 0.8 mg, 0.9  
mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg,  
50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg,  
400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg,  
900 mg, 950 mg, 1000 mg, 1100 mg, 1150 mg, 1200 mg, 1250 mg, 1300 mg, 1350 mg,  
1400 mg, 1450 mg, 1500 mg, 1550 mg, 1600 mg, 1650 mg, 1700 mg, 1750 mg, 1800 mg,  
1850 mg, 1900 mg, 1950 mg, 2000 mg, 2100 mg, 2150 mg, 2200 mg, 2250 mg, 2300 mg,  
2350 mg, 2400 mg, 2450 mg, 2500 mg, 2550 mg, 2600 mg, 2650 mg, 2700 mg, 2750 mg,  
2800 mg, 2850 mg, 2900 mg 及び 2950 mg

/ 投与量単位を含む。

## 【 0 1 1 5 】

特定の実施態様では、活性剤は、被験体体重 1 k g あたり、1 日に、約 0 . 0 0 1 mg / kg ~ 約 1 0 0 mg / kg、約 0 . 0 1 mg / kg ~ 約 5 0 mg / kg、好ましくは、約 0 . 1 mg / kg ~ 約 4 0 mg / kg、好ましくは、約 0 . 5 mg / kg ~ 約 3 0 mg / kg、約 0 . 0 1 mg / kg ~ 約

10 mg/kg、約 0.1 mg/kg ~ 約 10 mg/kg、より好ましくは約 1 mg/kg ~ 約 25 mg/kg を送達するために十分な投与量レベルであり得る。

【0116】

いくつかの特定の実施態様では、有効量の活性剤は、本開示で定義される Cas ヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクター又は送達粒子約  $1 \times 10^5$  ~ 約  $1 \times 10^{15}$  コピー / 投与量単位を含み得る。

【0117】

本発明の範囲内では、約  $1 \times 10^5$  ~ 約  $1 \times 10^{15}$  コピーは、

【表 2】

$2 \times 10^5, 3 \times 10^5, 4 \times 10^5, 5 \times 10^5, 6 \times 10^5, 7 \times 10^5, 8 \times 10^5, 9 \times 10^5, 1 \times 10^6, 2 \times 10^6,$   
 $3 \times 10^6, 4 \times 10^6, 5 \times 10^6, 6 \times 10^6, 7 \times 10^6, 8 \times 10^6, 9 \times 10^6, 1 \times 10^7, 2 \times 10^7, 3 \times 10^7, 4 \times 10^7, 5 \times 10^7, 6 \times 10^7,$   
 $7 \times 10^7, 8 \times 10^7, 9 \times 10^7, 1 \times 10^8, 2 \times 10^8, 3 \times 10^8, 4 \times 10^8, 5 \times 10^8, 6 \times 10^8, 7 \times 10^8, 8 \times 10^8, 9 \times 10^8, 1 \times 10^9,$   
 $2 \times 10^9, 3 \times 10^9, 4 \times 10^9, 5 \times 10^9, 6 \times 10^9, 7 \times 10^9, 8 \times 10^9, 9 \times 10^9, 1 \times 10^{10}, 2 \times 10^{10}, 3 \times 10^{10}, 4 \times 10^{10},$   
 $5 \times 10^{10}, 6 \times 10^{10}, 7 \times 10^{10}, 8 \times 10^{10}, 9 \times 10^{10}, 1 \times 10^{11}, 2 \times 10^{11}, 3 \times 10^{11}, 4 \times 10^{11}, 5 \times 10^{11}, 6 \times 10^{11},$   
 $7 \times 10^{11}, 8 \times 10^{11}, 9 \times 10^{11}, 1 \times 10^{12}, 2 \times 10^{12}, 3 \times 10^{12}, 4 \times 10^{12}, 5 \times 10^{12}, 6 \times 10^{12}, 7 \times 10^{12}, 8 \times 10^{12},$   
 $9 \times 10^{12}, 1 \times 10^{13}, 2 \times 10^{13}, 3 \times 10^{13}, 4 \times 10^{13}, 5 \times 10^{13}, 6 \times 10^{13}, 7 \times 10^{13}, 8 \times 10^{13}, 9 \times 10^{13}, 1 \times 10^{14},$   
 $2 \times 10^{14}, 3 \times 10^{14}, 4 \times 10^{14}, 5 \times 10^{14}, 6 \times 10^{14}, 7 \times 10^{14}, 8 \times 10^{14}, 9 \times 10^{14}$

10

20

コピー / 投与量単位を含む。

【0118】

・ターゲット細胞及び宿主細胞

さらなる態様では、本発明は、本明細書で定義される Cas ヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクターを含む宿主細胞に関する。

【0119】

ターゲット細胞及び / 又は宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞の中から選択され得る。

【0120】

本発明の範囲内では、「原核細胞」は、細菌細胞及び古細菌細胞を包含する。

30

【0121】

いくつかの実施態様では、ターゲット細胞及び / 又は宿主細胞は、真核細胞である。

【0122】

本発明の範囲内では、「真核細胞」は、酵母、藻類細胞、植物細胞、動物細胞、好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくはヒト細胞を包含する。

【0123】

いくつかの好ましい実施態様では、真核細胞は、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞である。

【0124】

特定の実施態様では、本発明のターゲット細胞及び / 又は宿主細胞は、限定されないが、中枢神経系の細胞、上皮細胞、筋肉細胞、胚細胞、生殖細胞、幹細胞、前駆細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞、人工多能性幹細胞 (iPSC) を包含する。

40

【0125】

いくつかの特定の実施態様では、ターゲット細胞及び / 又は宿主細胞は、幹細胞、前駆細胞、胚芽細胞又は胚細胞ではない。

【0126】

いくつかの実施態様では、ターゲット細胞及び / 又は宿主細胞は、筋肉組織、神経組織、結合組織及び上皮組織を含む群において選択される組織に属し得る。

【0127】

いくつかの実施態様では、ターゲット細胞及び / 又は宿主細胞は、膀胱、骨、脳、乳房

50

、中枢神経系、頸部、結腸、子宮内膜、腎臓、喉頭、肝臓、肺、食道、卵巣、膵臓、胸膜、前立腺、直腸、網膜、唾液腺、皮膚、小腸、軟組織、胃、精巣、甲状腺、子宮、膣を含む群において選択される器官に属し得る。

【0128】

・使用

本発明の別の態様は、医薬として使用するための医薬組成物であって、本明細書で定義されるCasヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクター又は送達粒子と、薬学的に許容し得るビヒクルとを含む医薬組成物に関する。

【0129】

一態様では、本発明はまた、医薬を調製又は製造するための、本明細書で定義されるCasヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸の使用に関する。

10

【0130】

さらに他の態様では、本発明は、少なくとも1つのターゲット細胞中のゲノムを編集するための活性剤として使用するための医薬組成物であって、本明細書で定義されるCasヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクター又は送達粒子と、薬学的に許容し得るビヒクルとを含む医薬組成物に関する。

【0131】

本発明の別の態様はさらに、少なくとも1つのターゲット細胞中のゲノムを編集するための活性剤としての、本明細書で定義されるCasヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸の使用に関する。

20

【0132】

特定の実施態様では、ゲノムの編集は、in vivo、in vitro又はex vivoで実施され得る。

【0133】

いくつかの実施態様では、ゲノムの編集は、Komor et al. Nature; 2016 Apr 20;533(7603):420-4のように実施され得る。

【0134】

一実施態様では、ターゲット細胞は、少なくとも1つの遺伝子突然変異を有する。

【0135】

いくつかの実施態様では、遺伝子突然変異は、

30

40

50

## 【表 3】

MTTP; CNGB3; SLC39A4; TRMU; ACOX1; ADA; ABCD1; SAMHD1; MAN2B1; HBA; ATRX; COL4A3; COL4A4; COL4A5; ALMS1; SLC12A6; ASL; CYP19A1; SLC35A3; ASNS; AGA; TTPA; ATM; SACS; BBS10; BBS1; BBS2; BBS12; CIITA; BSND; GP1BA; HSD3B2; ACAT1; GPR56; BTBD; BLM; ASPA; CPS1; CPT1A; CPT2; RAB23; RMRP; SLC6A8; GAMT; CYP27A1; NDRG1; PRPS1; GJB1; VPS13A; CHM; CYBA; CYBB; SLC25A13; ASS1; VPS13B; ACSF3; GFM1; TSFM; PROP1; LHX3; PSAP; CYP17A1; MPL; PMM2; MPI; ALG6; NTRK1; CHRNE; RAPSN; HAX1; VPS45; SLC4A11; CYP11B2; CFTR; CTNS; HSD17B4; LOXHD1; DMD; RTEL1; COL7A1; ADAMTS2; EVC; EMD; NR2E3; ETHE1; GLA; F9; F11; IKBKAP; LDLR; LDLRAP1; ABCC8; KCNJ11; MEFV; FANCA; FANCC; FANCG; FMR1; FH; GALK1; GALT; GBA; SLC12A3; GCDH; ETFA; ETFDH; AMT; GLDC; G6PC; SLC37A4; GAA; AGL; GBE1; PYGM; PFKM; BCS1L; HFE2; TFR2; ALDOB; TECPR2; HPS1; HPS3; HMGCL; HLCS; CBS; MTHFR; MTRR; HYLS1; SLC25A15; EDA; ALPL; GNE; MED17; IVD; TMEM216; RGPRI1L; LAMA3; LAMB3; LAMC2; GALC; TGM1; CEP290; RDH12; RPE65; LCA5; CRB1; LRPPRC; GLE1; EIF2B5; CAPN3; DYSF; SGCG; SGCA; SGCB; FKRP; DLD; STAR; LPL; HADHA; SLC7A7; BCKDHA; BCKDHB; MKS1; ACADM; MLC1; ATP7A; ARSA; MCCC1; MCCC2; OPA3; MMAA; MMAB; MUT; MMACHC; VSX2; ACAD9; NDUFAF5; NDUFS6; MPV17; PUS1; GNPTAG; MCOLN1; IDUA; IDS; NAGLU; HGSNAT; GNS; GLB1; HYAL1; ARSB; SUMF1; POMGNT1; TYMP; MTM1; NAGS; NEB; AQP2; NPHS1; NPHS2; CLN3; CLN5; CLN6; CLN8; MFSD8; PPT1; TPP1; SMPD1; NPC1; NPC2; NBN; GJB2; WNT10A; RAG2; DCLRE1C; OAT; OTC; TCIRG1; SLC26A4; PAH; PHGDH; PKHD1; AIRE; VRK1; RARS2; SLC22A5; DNAI1; DNAH5; DNAI2; AGXT; GRHPR; HOGA1; SEPSECS; ABCB11; PCCA; PCCB; CTSK; PDHA1; PDHB; PTS; ATP6V1B1; EYS; CERKL; FAM161A; DHDDS; PEX7; AGPS; ESCO2; SLC17A5; HEXB; SMARCAL1; TH; ALDH3A2; DHCR7; SMN1; MESP2; COL27A1; LIFR; SLC26A2; HEXA; FAH; MYO7A; USH1C; CDH23; PCDH15; USH2A; CLRN1; ACADVL; FKTN; ATP7B; LIPA; RS1; IL2RG; PEX1; PEX2; PEX6 及び PEX10.

10

20

30

40

を含む群において選択される遺伝子中に存在する。

## 【0136】

一態様では、本発明は、疾患を治療及び／又は予防するための活性剤として使用するための医薬組成物であって、本明細書で定義される Cas スクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクター又は送達粒子と、薬学的に許容し得るビヒクルとを含む医薬組成物に関する。

## 【0137】

いくつかの実施態様では、疾患は、遺伝性障害、感染性疾患及びガンを含む群において選択される。

## 【0138】

50



いくつかの実施態様では、疾患は、遺伝性障害である。

【0139】

特定の実施態様では、遺伝性障害は、無リボタンパク血症；色覚異常；腸性先端皮膚炎；急性幼児肝不全；アシル-CoAオキシダーゼI欠損症；アデノシンデアミナーゼ欠損症；副腎白質ジストロフィー、X連鎖；アイカルディ-グティエール症候群；-マンノシドーシス；-サラセミア；-サラセミア精神遅滞症候群；アルポート症候群；アルストレム症候群；アンダーマン症候群；アルギニノコハク酸尿症；アロマターゼ欠損症；関節拘縮症、精神遅滞及び発作；アスパラギンシンテターゼ欠損症；アスパルチルグルコサミン尿症；ビタミンE単独欠乏性運動失調症；毛細血管拡張性失調症；シャルルボア・サグネの常染色体劣性痙攣性運動失調症；バルデー・ビードル症候群；不全リンパ球症候群、タイプII；バター症候群、タイプ4A；ベルナル・スーリエ症候群、タイプA1；-グロビン関連異常ヘモグロビン症；3--ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼタイプII欠損症；-ケトチオラーゼ欠損症；両側前頭頭頂多小脳回症；ピオチニダーゼ欠損症；ブルーム症候群；カナバン病；カルバモイルホスフェートシンテターゼI欠損症；カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼIA欠損症；カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼII欠損症；カーペンター症候群；軟骨毛髪形成不全症；脳クレアチン欠乏症候群1；脳クレアチン欠乏症候群2；脳髄黄色腫症；シャルコー・マリー・トゥース病、タイプ4D；シャルコー・マリー・トゥース病、タイプ5/Arts症候群；シャルコー・マリー・トゥース病、X連鎖；有棘赤血球舞蹈病；先天性脈絡膜欠如；慢性肉芽腫症；慢性肉芽腫症；シトリン欠損症；シトルリン血症、タイプ1；コーエン症候群；マロン酸性尿酸及びメチルマロン酸性尿酸の複合型；複合型酸化的リン酸化欠乏症1；複合型酸化的リン酸化欠乏症3；複合型下垂体ホルモン欠損症2；複合型下垂体ホルモン欠損症3；複合型SAP欠損症；17--ヒドロキシラーゼ欠損による先天性副腎過形成；先天性無巨核球性血小板減少症；グリコシル化の先天性障害、タイプIa；グリコシル化の先天性障害、タイプIb；グリコシル化の先天性障害、タイプIc；全身無汗無痛症；先天性筋無力症候群；先天性筋無力症候群；先天性好中球減少症；先天性好中球減少症；角膜ジストロフィー及び感音性難聴；コルチコステロンメチルオキシダーゼ欠損症；嚢胞性線維症；シスチン症；D-二官能性タンパク質欠損症；難聴、常染色体劣性77；デュシェンヌ筋ジストロフィー/ベッカー筋ジストロフィー；先天性角化異常症；栄養障害性表皮水疱症；エーラス・ダンロス症候群、タイプVIIIC；エリス・ファン・クレフェルト症候群；エメリ・ドレフュス型筋ジストロフィー1；S錐体増強症候群；エチルマロン酸脳症；ファブリー病；第IX因子欠損症；第XI因子欠損症；家族性自律神経失調症；家族性高コレステロール血症；家族性高コレステロール血症、常染色体劣性；家族性高インスリン症；家族性地中海熱；ファンコニ貧血、グループA；ファンコニ貧血、グループC；ファンコニ貧血、グループG；脆弱性X症候群；フマラーゼ欠損症；ガラクトキナーゼ欠損症；ガラクトース血症；ゴーシェ病；ギテルマン症候群；グルタル酸血症、タイプI；グルタル酸血症、タイプIIa；グルタル酸血症、タイプIIc；グリシン脳症；グリシン脳症；グリコーゲン貯蔵症、タイプIa；グリコーゲン貯蔵症、タイプIb；グリコーゲン貯蔵症、タイプII；グリコーゲン貯蔵症、タイプIII；グリコーゲン貯蔵症、タイプIV/成人ポリグルコサン小体病；グリコーゲン貯蔵症、タイプV；グリコーゲン貯蔵症、タイプVII；GRACILE症候群及び他のBCS1L関連障害；ヘモクロマトーシス、タイプ2A；ヘモクロマトーシス、タイプ3；遺伝性フルクトース不耐症；遺伝性痙攣性対麻痺49；ヘルマンスキー・パドラック症候群、タイプ1；ヘルマンスキー・パドラック症候群、タイプ3；HMG-CoAリアーゼ欠損症；ホロカルボキシラーゼシンテターゼ欠損症；ホモシスチン尿症；MTHFR欠損によるホモシスチン尿症；ホモシスチン尿症、cblEタイプ；Hydrolethals症候群；高オルニチン血症-高アンモニア血症-ホモシトルリン尿症候群；無汗性外胚葉形成不全症1；低ホスファターゼ血症；封入体ミオパチー2；小児脳及び小脳萎縮症；イソ吉草酸血症；ジュベール症候群2；ジュベール症候群7/メッケル症候群5/COACH症候群；接合部型表皮水疱症；接合部型表皮水疱症；接合部型表皮水疱症；クラッペ病；葉状魚鱗癬、タイプ1；

10

20

30

40

50

レーバー先天性黒内障 10 及び他の C E P 2 9 0 関連繊維毛関連疾患；レーバー先天性黒内障 13；レーバー先天性黒内障 2 / 網膜色素性色素症 20；レーバー先天性黒内障 5；レーバー先天性黒内障 8 / 網膜色素性色素症 12 / 色素性静脈傍網脈絡膜萎縮；リー症候群、フランス系カナダ人タイプ；致命性先天性拘縮症候群 1 / 前角細胞疾患を伴う致死性関節拘縮症；白質の消失を伴う白質脳症；肢帯筋ジストロフィー、タイプ 2 A；肢帯筋ジストロフィー、タイプ 2 B；肢帯筋ジストロフィー、タイプ 2 C；肢帯筋ジストロフィー、タイプ 2 D；肢帯筋ジストロフィー、タイプ 2 E；肢帯筋ジストロフィー、タイプ 2 I；リポアミドデヒドロゲナーゼ欠損症；リポイド副腎過形成；リポタンパク質リパーゼ欠損症；長鎖 3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ欠損症；リシン尿性タンパク不耐症；メーブルシロップ尿症、タイプ 1 a；メーブルシロップ尿症、タイプ 1 b；メッケル症候群 1 / バルダー・ピードル症候群 13；中鎖アシル - C o A デヒドロゲナーゼ欠損症；皮質下嚢胞を伴う大頭型白質脳症；メンケス病；異染性白質ジストロフィー；3 - メチルクロトニル - C o A カルボキシラーゼ欠損症；3 - メチルクロトニル - C o A カルボキシラーゼ欠損症；3 - メチルグルタコン酸性尿症、タイプ I I I / 白内障を伴う視神経萎縮 3；メチルマロン酸血症；メチルマロン酸尿症及びホモシスチン尿症、コバラミン C タイプ；小眼球症 / 無眼球症；ミトコンドリア複合体 I 欠損症；ミトコンドリア複合体 I 欠損症；ミトコンドリア複合体 I 欠損症；ミトコンドリア D N A 枯渇症候群 6 / ナバホ神経性肝障害；ミトコンドリアミオパチー及び鉄芽球性貧血 1；ムコリピドーシス I I I / I I I A；ムコリピドーシス I I I ガンマ；ムコリピドーシス I V；ムコ多糖症、タイプ I；ムコ多糖症、タイプ I I；ムコ多糖症、タイプ I I I B；ムコ多糖症、タイプ I I I C；ムコ多糖症、タイプ I I I D；ムコ多糖症、タイプ I V b / G M 1 ガングリオシドーシス；ムコ多糖症、タイプ I X；ムコ多糖症、タイプ V I；複数スルファターゼ欠損症；筋肉 - 眼 - 脳疾患及び他の P O M G N T 1 関連先天性筋ジストロフィー - ジストログリカノパシー；神経胃腸脳症；筋細管ミオパチー 1；N - アセチルグルタミン酸シンターゼ欠損症；ネマリンミオパチー 2；腎性尿崩症、タイプ I I；ネフローゼ症候群 / 先天性フィンランドネフローゼ；ネフローゼ症候群 / ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群；神経セロイドリポフスチン症；神経セロイドリポフスチン症；ニーマン・ピック病、タイプ A / B；ニーマン・ピック病、タイプ C；ナイミーヘン切断症候群；非症候性難聴；歯牙 - 爪 - 皮膚異形成症 / ショフ・シュルツ・パサージ症候群；オーメン症候群；オーメン症候群 / 重症複合型免疫不全症、アサバスカンタイプ；オルニチンアミノトランスフェラーゼ欠損症；オルニチントランスカルボミラーゼ欠損症 (Ornithine Transcarbamylase Deficiency)；大理石骨病 1；ペンドレッド症候群；フェニルアラニンヒドロキシラーゼ欠損症；3 - ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ欠損症；多発性嚢胞腎、常染色体劣性；多腺性自己免疫症候群、タイプ 1；橋小脳低形成、タイプ 1 A；橋小脳低形成、タイプ 6；原発性カルニチン欠損症；原発性線毛運動障害；原発性高シュウ酸尿症、タイプ 1；原発性高シュウ酸尿症、タイプ 2；原発性高シュウ酸尿症、タイプ 3；進行性小脳 - 脳萎縮症；進行性家族性肝内胆汁鬱滞、タイプ 2；プロピオン酸血症；プロピオン酸血症；濃化異骨症；ピルビン酸デヒドロゲナーゼ E 1 - 欠損症；ピルビン酸デヒドロゲナーゼ E 1 - 欠損症；6 - ピルボイル - テトラヒドロプテリンシンターゼ欠損症；腎尿細管アシドーシス及び難聴；網膜色素変性症 25；網膜色素変性症 26；網膜色素変性症 28；網膜色素変性症 59；肢根型点状軟骨異形成症、タイプ 1；肢根型点状軟骨異形成症、タイプ 3；ロバーツ症候群；サラ病；サンドホフ病；シムケ免疫性骨形成不全；セガワ症候群；シェーグレン・ラルソン症候群；スミス・レムリ・オピッツ症候群；脊髄性筋萎縮症；脊椎胸郭異骨症；スチール症候群；ステューブ・ヴィーデマン症候群；硫酸輸送体関連骨軟骨異形成症；テイ・サックス病；チロシン血症、タイプ I；アッシャー症候群、タイプ I B；アッシャー症候群、タイプ I C；アッシャー症候群、タイプ I D；アッシャー症候群、タイプ I F；アッシャー症候群、タイプ I I A；アッシャー症候群、タイプ I I I；超長鎖アシル - C o A デヒドロゲナーゼ欠損症；ウォーカー・ワールブルク症候群及び他の F K T N 関連ジストロフィー；ウィルソン病；ウォルマン病 / コレステリルエステル貯蔵症；X 連鎖若年性網膜症；X 連鎖重症複合型免疫不全症及びツェルヴェーガー症候群スペクトル

10

20

30

40

50

を含む非限定的な群において選択される。

【0140】

いくつかの実施態様では、疾患は、感染性疾患である。

【0141】

特定の実施態様では、感染性疾患は、アナプラズマ病；炭疽病；バベシア症；ボツリヌス中毒症；ブルセラ症；Burkholderia mallei感染症（鼻疽）；Burkholderia pseudo mallei感染症（類鼻疽症）；カンピロバクター症；カルバペネム耐性腸内細菌科感染症（CRE）；軟性下疳；チクングニヤ感染症；クラミジア感染症；シガテラ中毒；Clostridium difficile感染症；Clostridium perfringens感染症（エプシロン毒素）；コクシジオイデス菌真菌感染症（パレー熱）；クロイツフェルト・ヤコブ病、伝染性海綿状（CJD）；クリプトスポリジウム症；サイクロスポーラ症；デング熱；ジフテリア；E. Coli感染症；東部ウマ脳炎（EEE）；エボラ出血熱（エボラ）；エーリキア症；アルボウイルス脳炎又は傍感染性脳炎；非ポリオエンテロウイルス感染症；D68エンテロウイルス感染症、（EV-D68）；ジアルジア症；淋菌感染症（淋菌）；鼠径部肉芽腫；タイプB Haemophilus Influenza疾患（Hib又はH-flu）；ハantaウイルス肺症候群（HP S）；溶血性尿毒症症候群（HUS）；A型肝炎（Hep A）；B型肝炎（Hep B）；C型肝炎（Hep C）；D型肝炎（Hep D）；E型肝炎（Hep E）；ヘルペス；帯状ヘルペス、帯状VZV（帯状疱疹）；ヒストプラズマ症；ヒト免疫不全ウイルス/AIDS（HIV/AIDS）；ヒトパピローマウイルス（HPV）；インフルエンザ（Flu）；鉛中毒；レジオネラ症（レジオネラ病）；癩（ハンセン病）；レプトスピラ症；リステリア症；ライム病；Lymphogranuloma venereum感染症（LVG）；マラリア；麻疹；ウイルス性髄膜炎；髄膜炎菌性疾患；中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）；ムンプス；ノロウイルス；麻痺性貝中毒；シラミ寄生症（シラミ、頭及び体のシラミ）；骨盤内炎症性疾患（PID）；百日咳；腺ペスト、敗血症性ペスト又は肺ペスト；肺炎球菌性疾患；急性灰白髄炎（ポリオ）；オウム病；ケジラミ症（カニ；ケジラミの蔓延）；膿疱性発疹病（天然痘、サル痘、牛痘）；Q熱；狂犬病；リシン中毒；リケッチア症（ロッキーマウンテンスポット熱）；先天性風疹を含む風疹（ドイツ麻疹）；Salmonellosis gastroenteritis感染症；疥癬の蔓延；サバ中毒；重症急性呼吸器症候群（SARS）；Shigellosis gastroenteritis感染症；天然痘；メチシリン耐性ブドウ球菌感染症（MRSA）；ブドウ球菌食中毒；バンコマイシン中間ブドウ球菌感染症（VISA）；バンコマイシン耐性ブドウ球菌感染症（VISA）；連鎖球菌病、グループA；連鎖球菌病、グループB；連鎖球菌毒素ショック症候群（STSS）；原発性、続発性、早期潜伏、後期潜伏又は先天性梅毒；破傷風感染症（破傷風）；旋毛虫病；結核（TB）；潜伏結核（LTBI）；野兎病（ウサギ熱）；腸チフス、グループD；チフス；腫症；水疱瘡（水痘）；Vibrio cholerae感染症（コレラ）；ビブリオ症（ビブリオ）；ウイルス性出血熱（エボラ、ラッサ、マールブルグ）；西ナイルウイルス感染症。黄熱；エルシニア感染症及びジカウイルス感染症を含む非限定的な群において選択される。

【0142】

いくつかの実施態様では、疾患は、ガンである。

【0143】

いくつかの実施態様では、ガンは、膀胱ガン、骨ガン、脳ガン、乳ガン、中枢神経系のガン、頸部のガン、上気道消化管のガン、結腸直腸ガン、子宮内膜ガン、生殖細胞ガン、神経膠芽細胞腫、ホジキンリンパ腫、腎臓ガン、喉頭ガン、白血病、肝臓ガン、肺ガン、骨髄腫、腎芽細胞腫（ウィルムス腫瘍）、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、食道ガン、骨肉腫、卵巣ガン、膵臓ガン、胸膜ガン、前立腺ガン、網膜芽細胞腫、皮膚ガン（メラノーマを含む）、小腸ガン、軟組織肉腫、胃ガン、精巣ガン及び甲状腺ガンを含む非限定的な群において選択される。

【0144】

いくつかの実施態様では、当業者であれば、幹細胞及び前駆細胞、造血幹細胞及び前駆細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）並びに異なる種由来の成体細胞を含むex vivo操作

及び／又は治療は、本発明の範囲内に包含され得ることを理解し得る。理論に縛られるものではないが、本発明者らは、熟練技術者が再生医療を実施する際、これが特別な関心対象であると考える。

【0145】

特定の実施態様では、本発明によって包含される核酸及び核酸ベクターは、基本的な倫理原則を踏まえて、動物又は植物モデル、例えば前臨床研究のための動物モデルを操作するために用いられ得る。

【0146】

・方法

本明細書に開示される方法は、*in vitro*、*in vivo*又は*ex vivo*で達成され得る。

【0147】

本発明の別の態様は、少なくとも1つのターゲット細胞中のゲノムを編集するための方法であって、本明細書で定義される医薬組成物を、それを必要とする個体に投与する工程を少なくとも含む方法に関する。

【0148】

一態様では、本発明は、疾患を予防及び／又は治療するための方法であって、本明細書で定義される医薬組成物を、それを必要とする個体に投与する工程を少なくとも含む方法に関する。

【0149】

いくつかの実施態様では、上記方法は、少なくとも1つの必須アミノ酸、特にヒスチジン(His、H)、イソロイシン(Ile、I)、ロイシン(Leu、L)、リシン(Lys、K)、メチオニン(Met、M)、フェニルアラニン(Phe、F)、トレオニン(Thr、T)、トリプトファン(Trp、W)及びバリン(Val、V)を含む群において選択されるアミノ酸が欠乏した食餌を個体に提供する工程をさらに含む。

【0150】

特定の実施態様では、上記方法は、有利には、調節ポリヌクレオチドに含まれるAARE核酸を活性化することが公知の化合物、特にハロフジノン、ツニカマイシンなどを含む群において選択される化合物を投与する工程を含む。

【0151】

いくつかの実施態様では、疾患は、遺伝性障害、感染性疾患及びガンを含む群において選択される。

【0152】

いくつかの実施態様では、医薬組成物は、任意の経路によって、すなわち経口投与、局所投与又は非経口投与によって、例えば皮下投与、静脈投与、動脈投与、筋肉内投与、眼内投与及び耳介内投与を含む注射によって、それを必要とする個体に投与され得る。

【0153】

他の投与様式は、肺製剤、座薬及び経皮適用を用いる。

【0154】

いくつかの実施態様では、本発明の経口製剤は、通常の賦形剤、例えば医薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。

【0155】

いくつかの実施態様では、有効量の前記化合物は、それを必要とする前記個体に投与される。

【0156】

本発明の範囲内では、「有効量」は、単独で所望の転帰を刺激する(すなわち、包含される疾患、特に遺伝性障害の症候を緩和又は根絶する)前記化合物の量を指す。

【0157】

所望の転帰を観察するために、本明細書で定義される医薬組成物に含まれるCasヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸又は核酸ベクター又は送達粒

10

20

30

40

50

子の有効量を決定することは、当業者の通常の知識の範囲内である。

【0158】

本発明の範囲内では、投与すべき化合物の有効量は、医師又は当業者によって決定され得、処置の時間経過内において適切に適合され得る。

【0159】

特定の実施態様では、投与すべき有効量は、投与のために選択される材料、投与が単回投与又は複数回投与であるか、並びに年齢、身体状態、サイズ、体重、性別及び処置すべき障害の重症度を含む個体のパラメータを含む様々なパラメータに依存し得る。

【0160】

本発明の別の態様はまた、少なくとも1つのターゲット細胞中のゲノムを編集するための方法であって、

- 該ターゲット細胞に、

o 本明細書に開示される Cas ヌクレアーゼをコードする核酸のコントロール発現のための核酸；

o 編集すべきゲノムターゲット核酸に特異的なガイド DNA 又は RNA ；

o 該ターゲットゲノム核酸を置き換えることを目的とする核酸を含むドナー核酸を提供する工程；

- Cas ヌクレアーゼの発現を誘導する工程を含む方法に関する。

【0161】

Cas ヌクレアーゼの誘導により、Cas ヌクレアーゼは、ガイド DNA 又は RNA の支援を得てゲノムターゲット核酸中で、及びドナー核酸上で一本鎖又は二本鎖切断を促進するであろう。続いて、ゲノムターゲット核酸に代えて、ドナー核酸由来の核酸がゲノムに組み込まれ得る。

【0162】

いくつかの実施態様では、Cas ヌクレアーゼの発現の誘導は、少なくとも1つの必須アミノ酸が欠乏した培地、又はハロフジノン及び/若しくはツニカマイシンを含む培地をターゲット細胞に提供することによって実施され得る。

【0163】

いくつかの実施態様では、ターゲット核酸は、遺伝子突然変異を有する。

【0164】

・キット

さらなる態様では、本発明は、疾患を治療及び/又は予防するためのキットであって、

- 本明細書で定義される医薬組成物、及び

- 薬学的に活性な化合物

を含むキットに関する。

【0165】

いくつかの実施態様では、疾患は、遺伝性障害、感染性疾患及びガンを含む群において選択される。

【0166】

本発明の範囲内では、「薬学的に活性な化合物」という表現は、所定の疾患の予防及び/又は治療に対する利益を有する化合物を意味することを意図する。

【0167】

当業者であれば、「利益」という用語は、所定の疾患に関連する少なくとも1つの症候を軽減又は緩和するためのプラス効果を有することを理解する。また、当業者であれば、「利益」によって、所定の疾患の進行が減速又は停止し得ることを理解する。

【0168】

いくつかの実施態様では、薬学的に活性な化合物は、感染性疾患、特に細菌感染症、真菌感染症又はウイルス感染症と闘うために一般的に用いられる化合物から当業者によって適切に選択され得る抗菌化合物である。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 9 】

特定の実施態様では、抗菌化合物は、ペニシリン、特にペニシリン及びアモキシシリン；カルバペネム、特にイミペネム；セファロスポリン、特にセファレキシン；アミノグリコシド、特にゲンタマイシン及びトブラマイシン；テトラサイクリン、特にテトラサイクリン及びドキシサイクリン；マクロライド、特にエリスロマイシン及びクラリスロマイシン；キノロン、特にシプロフロキサシン及びレボフロキサシン；並びにスルホンアミド、特にスルファメチゾール及びスルファメトキサゾールを含む群において選択される抗生物質である。

## 【 0 1 7 0 】

特定の実施態様では、抗菌化合物は、ノイラミニダーゼ阻害剤；グアニンのヌクレオシド類似体；チミジンのヌクレオシド類似体；ヌクレオチド逆転写酵素阻害剤；及びプロテアーゼ阻害剤を含む非限定的な群において選択される抗ウイルス剤である。

10

## 【 0 1 7 1 】

いくつかの実施態様では、薬学的に活性な化合物は、化学療法において一般的に用いられる化合物から当業者によって適切に選択され得る抗ガン化合物である。

## 【 0 1 7 2 】

特定の実施態様では、抗ガン化合物は、アルキル化剤、プリン類似体、ピリミジン類似体、アントラサイクリン、プレオマイシン、マイトマイシン、トポイソメラーゼ 1 の阻害剤、トポイソメラーゼ 2 の阻害剤、タキサン、モノクローナル抗体、サイトカイン、プロテインキナーゼの阻害剤などを含む群において選択され得る。

20

## 【実施例】

## 【 0 1 7 3 】

実施例 1：必須アミノ酸飢餓による C A S 9 発現の誘導

図 1 は、G C N 2 - e I F 2 - A T F 4 シグナル伝達経路を示す。E A A 飢餓に応じて、活性化 G C N 2 は e I F 2 をリン酸化し、転写因子 A T F 4 のアップレギュレーション及び A A R E 配列へのそのリクルートをもたらし、ターゲット遺伝子発現を誘導する。

## 【 0 1 7 4 】

図 2 は、T k 最小プロモーターのレギュレーション下にある C a s ヌクレアーゼをコードする核酸と、6 コピーの T r b 3 由来 A A R E 核酸（黒点）とを構築するための全体的戦略を示す。

30

## 【 0 1 7 5 】

C A S 9 活性に対処するために、単一コピーの G F P 導入遺伝子を有する H E K 2 9 3 T 細胞由来の細胞モデルを使用する（293T<sup>GFP</sup>細胞株）。

## 【 0 1 7 6 】

2 つの異なるレンチウイルスベクターで、この細胞株をコトランスダクションする。

## 【 0 1 7 7 】

第 1 のものは、2 × A A R E - T K レギュレーションプロモーター（配列番号：6 及び配列番号：7）のコントロール下に置かれた F L A G タグ付バージョンの C A S 9（Shen et al Cell Res. 2013 Apr 2. doi: 10.1038/cr.2013.46；配列番号：8）を発現する。

40

## 【 0 1 7 8 】

第 2 のベクターは、U 6 プロモーター（R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター）（Ma, H et al. Mol Ther Nucleic Acids 2014 doi: 10.1038/mtna.2014.12）のコントロール下に置かれた G F P レポーター遺伝子（g R N A<sup>GFP</sup>）を特異的にターゲティングするガイド R N A を発現する。

## 【 0 1 7 9 】

p T R I P レンチウイルス骨格で、両レンチウイルスベクターを構築した（Zennou et al., 2000; Cell 101, 173-185）。

## 【 0 1 8 0 】

p T r i p - 2 × A A R E - N L S - F L A G - C A S 9 プラスミドの核酸（配列番号

50

： 9 ) は、図 3 に表されている。

【 0 1 8 1 】

コントロールとして、E F 1 a ユビキタスプロモーターのコントロール下で F L A G - C A S 9 を発現する第 3 のレンチウイルスベクターを作製する。

【 0 1 8 2 】

培養液中で、トランスダクション細胞を増幅する。誘導の非存在下で、2 × A A R E - C A S 9 細胞及び E F 1 a - C A S 9 細胞を溶解し、定量的 R T P C R によって C A S 9 の発現をモニタリングし、続いて、F L A G タグのウェスタンブロット検出によって C A S 9 タンパク質発現の量をモニタリングする。このような条件下で、遍在的に発現される C A S 9 のみを検出及び定量する。

10

【 0 1 8 3 】

次に、L e u 又は T h r のいずれかが枯渇した特定培地中で、トランスダクション細胞を培養下に置く。m R N A 及びタンパク質のレベルの両方で、2 × A A R E - C A S 9 細胞における C A S 9 発現の誘導を経時的にモニタリングする。それにより、最適な処置期間を決定する。

【 0 1 8 4 】

最後に、2 9 3 T <sup>G F P</sup> 細胞が C A S 9 と g R N A <sup>G F P</sup> の両方を発現している場合、これらの細胞における G F P の発現は減少し、それゆえ、フローサイトメトリーによって測定された G F P 陽性細胞のパーセンテージは、G F P 発現をノックアウトする C A S 9 効率に対処するための正確な手段である。

20

【 0 1 8 5 】

したがって、アミノ酸飢餓なしの場合、F L A G - C A S 9 トランスダクション 2 9 3 T <sup>G F P</sup> 細胞における G F P 陽性細胞の割合は、培養液中で一定である。枯渇 A A 培地を用いた培養における最適な誘導後、G F P 細胞の割合は劇的に減少する。全体的な有効性を、E F 1 a - C A S 9 でトランスダクションした細胞における C A S 9 の連続発現と比較する。

【 0 1 8 6 】

実施例 2 : 必須アミノ酸飢餓による C A S 9 発現の誘導

プロモーター 2 × A A R E は、必須アミノ酸 ( E A A ) 飢餓又は他の細胞ストレス、例えばツニカマイシン ( T u ) によって小胞体に誘導されるストレスの条件で迅速に誘導される転写因子 A T F 4 のための 6 つの結合配列を含有する。

30

【 0 1 8 7 】

プロモーター 2 × A A R E によって細菌ヌクレアーゼ C a s 9 の発現をレギュレーションすることができるかを評価するために、F L A G タグ、自己触媒 P 2 A ペプチド及び赤色蛍光タンパク質 ( R F P ) に融合した *Streptococcus pyogenes* の C a s 9 遺伝子 ( s p C a s 9 ) を、A T F 4 のための 4 つの結合部位を含有する 2 × A A R E エンハンサーと、単純ヘルペスウイルス ( H S V ; 図 4 ) 由来のチミジンキナーゼ遺伝子の最小プロモーター ( T K m ) とのコントロール下にクローニングした。

【 0 1 8 8 】

この H I V 由来のレンチウイルスベクターは、ベクターの組み込み事象の選択のための耐性遺伝子プラスサイズの安定発現を可能にする。第 2 のカセットは、U 6 プロモーター及びガイド R N A A A V S 1 ( 配列番号 : 1 0 ) 及び C R I S P R 関連 R N A 足場を含有し、ヒト遺伝子 P P P 1 R 1 2 C の A T G の後方における切断を可能にする。第 3 の発現カセットは、プロモーター 2 × A A R E - T K m のコントロール下にある遺伝子 s p C a s 9 - f l a g - R F P を含有する。

40

【 0 1 8 9 】

このプラスミドを使用して、ベクタープラスミド + V S V エンベロープをコードするプラスミド ( p V S V ) + H I V R e v 遺伝子をコードするプラスミド ( p R e v ) + H I V の G a g 及び P o l 遺伝子をコードするプラスミド ( p 8 . 9 ) のコトランスフェクションの標準的なプロトコールにしたがって、2 9 3 T 細胞においてレンチウイルス粒子

50

を生産した。48時間後、細胞の上清を回収し、濃縮のために超遠心分離し、使用まで -80℃で保存した。リアルタイム定量的PCRを用いてベクターストックを力価測定して、ゲノム/mlのウイルスRNAコピーを測定した(Saeed et al.; Mol Ther Nucleic Acid s. 2014 Dec 2;3:e213)。

#### 【0190】

EAA飢餓(ロイシンを含まない培地、Leu-)又はツニカマイシン(Sigma-Aldrich(登録商標))によって、spCas9-flag-RFPの発現をモデュレーションすることができるかを評価するために、細胞当たり100のvRNAcで293T細胞をトランスダクションし、次いで、2µg/mlブラストサイジン(Sigma-Aldrich(登録商標))で選択した。非トランスダクション293T細胞は全て死亡した一方で、トランスダクション細胞は正常に成長したが、これは、それらが全て、少なくとも1コピーのベクターpTRIPblast-U6AAVS1-2xAARE-Cas9-flag-RFPを含有していたことを示している。

10

#### 【0191】

293-C9と称されるこの集団をエクспанションし、さらなる実験に使用した。細胞を24ウェルプレートにプレーティングし(細胞105個/ウェル)、10%血清を含むロイシン枯渇培養培地(DMEM Leu-)、0.5µg/mlツニカマイシンを含む培養培地(DMEM完全+Tu)又はコントロール培地(DMEM完全)を用いて、遺伝子Cas9-flag-RFPの発現を誘導した。

#### 【0192】

誘導の数時間後(4時間、8時間、24時間)に、並びに誘導培地を除去してそれを完全培地と交換した24時間後(すなわち、誘導の48時間後)及び48時間後(すなわち、誘導の72時間後)に、細胞を収集した。様々な時点において収集した細胞をペレット化し、タンパク質精製のために溶解した(抗プロテアーゼを含むトリス-HCl 0.05M; SDS 0.5%; 1mM DTT; pH 8.0)。

20

#### 【0193】

ブラッドフォード試験を使用してタンパク質濃度を測定し、ローディングバッファー及びβ-メルカプトエタノールと混合して95℃で5分間加熱した溶解物30µgを変性SDS 10%ポリアクリルアミドゲルにロードした。電気泳動を用いて、タンパク質を分離した。色付のラダーを用いて、移動をモニタリングした。

30

#### 【0194】

半乾燥転写によって、ゲル上のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、抗FLAG M2 MAB(Sigma-Aldrich(登録商標))を使用したイムノプロットにこの膜を使用し、次いで、HRPにカップリングした二次抗マウス抗体を用いて検出した。化学発光HRP基質(Luminata crescendo-Millipore(登録商標))を用いて、ペルオキシダーゼ活性を明らかにし、化学発光検出器Fusion FX7(Vilber(登録商標))を用いて描写した。

#### 【0195】

Fusion FX7検出器(Vilber(登録商標))のソフトウェアを用いて、検出された193kDaのspCas9-Flag-RFPのバンドの密度を定量した。抗アクチン一次抗体を使用する以外は同じ方法で、各サンプル中のβ-アクチンのレベルも測定した。β-アクチンの密度を用いて、Cas9-flag-RFPに対応するバンドの密度を正規化した。データを均一化するために、異なるゲルでこれらの実験を実施したので、(両方の場合において誘導の24時間後の)最高密度のバンドを100%の発現とみなし、低密度の他のバンドの値を、各ゲルにおける最も強い参照の割合として比較した。

40

#### 【0196】

図5に見られるように、非誘導基本発現レベルの2xAARE-Tkmでは、Cas9-flag-RFP融合物は依然として検出不能である。しかしながら、Leu-培地を細胞に追加すると(実線)、又はTuを含有する完全培地を追加すると(破線)、融合物の発現が迅速に誘導される。(24時間の時点において)誘導培地を除去して完全培地と交換すると、タンパク質Cas9-flag-RFPの発現は徐々に減少した(48時間

50



及び72時間の時点を参照のこと)。これは、プロモーター2×AARE-Tkmが、EAA飢餓によって又はERストレスの誘導を介して、Cas9発現のコントロールを可能にすることを示している。タンパク質Cas9-flag-RFPの誘導が、ゲノム中のAAVS1ゲノム位置において切断(すなわち、二本鎖切断の実施)を可能にするかを評価するために、DMEM完全又はDMEM Leu-のいずれかを用いて、293-C9細胞を24時間培養した。24時間後に細胞を回収し、ペレット化し、DNA easy Kit (Qiagen(登録商標))を使用してゲノムDNAを精製した。AAVS1切断部位の5'(配列番号:11)及び3'(配列番号:12)にハイブリダイゼーションするプライマーを用いて、PCRを実施した。540bpのPCR産物を精製し、配列決定し、ターゲットであることを確認した。

10

#### 【0197】

Cas9が切断されたかをさらに評価するために、本発明者らは、T7ヌクレアーゼ試験(New England Biolabs(登録商標))を実施した。非誘導及び誘導293-C9の精製ゲノムDNAからAAVS1バンドを増幅するPCRを変性させ、供給業者のガイドラインにしたがって徐々に再ハイブリダイゼーションした(<https://www.neb.com/protocols/2014/08/11/determining-genome-targeting-efficiency-using-t7-endonuclease-i>)。

#### 【0198】

細胞機構によってCas9誘導性二本鎖切断が修復され、切断部位において挿入及び欠失(インデル(indels))が生じるので、異なるインデルの混合物を含有する細胞集団から得られたPCRバンドの再ハイブリダイゼーションは、ミスマッチを含有するDNAフラグメントを生じさせる。これらは、T7ヌクレアーゼによって切断され、より小さなバンドのDNAが放出される。

20

#### 【0199】

293-C9細胞において、DMEM Leu-を用いてCas9-flag-RFP発現を24時間誘導することにより、全DNAの約20%に相当するPCRバンドの中央に位置する切断部位AAVS1に対応する250bpのより小さなバンドが生じることを観察することができた。非誘導293-C9細胞では、このようなバンドは見られないが、これは、遺伝子Cas9-flag-RFPの誘導まで、AAVS1部位が依然として未切断であることを示している。

30

#### 【0200】

したがって、本明細書に開示されるオン/オフモードによるCas9のコントロール発現のための系は、ゲノムを安全に編集するためのツールを提供する。実際、誘導の非存在下では、発現系のいかなる検出可能な漏出もないので、任意の望ましくないゲノム編集を防止するための安全機能が提供される。

#### 【0201】

逆に、誘導の存在下では、誘導の除去が有効になり次第、迅速に発現が停止し得る。

#### 【0202】

次いで、2つの機能試験を実施して、ドナーDNA(Do)をAAVS1部位に組み込んだ。

40

#### 【0203】

第1の試験では、プラスミド「pTRIP blast\_\_U6 AAVS1\_\_2×AARE-Cas9-flag-RFP」と、カセット「AAVS1切断部位-GFP-p2a-ピューロマイシン\_\_AAVS1切断部位」(これは、GFP-p2a-ピューロマイシン遺伝子の5'及び3'においてCas9+gRNA AAVS1による切断を受け入れる)を含有するドナープラスミドとで、293T細胞をトランスフェクションした(リン酸Ca<sup>2+</sup>法)。

#### 【0204】

293T細胞のゲノム中のガイドRNAによってターゲティングされる選択AAVS1部位は、遺伝子PPP1R12CのATG開始コドンを含む。ターゲティングされると、

50

それは、放出された G F P - p 2 a - ピューロマイシンカセットが P P P 1 R 1 2 C のエクソン 1 に代えて挿入され、続いて、P P P 1 R 1 2 C プロモーターによって発現されることを可能にするであろう。この場合、リコンビナント細胞は G F P を発現して、ピューロマイシン耐性となるので、それらを選択して、組み込み事象に対応するクローンをカウントすることが可能になる。

【 0 2 0 5 】

図 6 に示されているように、完全培地 ( n i ) ではなく ( i ) ロイシン枯渇培地 ( i L e u - ) 又はツニカマイシン含有培地 ( i T u ) のいずれかを用いて、2 x A A R E 誘導と一緒に、プラスミド「p T R I P b l a s t \_ U 6 A A V S 1 \_ 2 x A A R E - C a s 9 - f l a g - R F P」( C 9 ) 及びドナー「p A A V S 1 切断部位 - G F P - p 2 a - ピューロマイシン \_ A A V S 1 切断部位」( D o ) の両方を提供した場合にのみ、ドナー構築物は、ピューロマイシン耐性クローンを生じさせる。これは、ターゲット組み込みのための C a s 9 活性がプロモーター 2 x A A R E の誘導を必要とすることを示している。

10

【 0 2 0 6 】

2 つの A A V S 1 切断部位に隣接する - G F P - p 2 a - ピューロマイシンを含有するドナープラスミド ( D o ) でトランスフェクションした 2 9 3 - C 9 細胞において、この実験を反復した。このようなプラスミドでは、p A A V S 1 ガイド C a s 9 活性は、G F P - p 2 a - ピューロマイシン配列を放出させるであろう。

【 0 2 0 7 】

20

図 5 に見られるように、ドナープラスミド ( D o ) で 2 9 3 - C 9 細胞をトランスフェクションした場合、誘導の非存在下 ( n i ) では、ピューロマイシン耐性コロニーは生じない。対照的に、ドナープラスミド ( D o ) で 2 9 3 - C 9 細胞をトランスフェクションし、ツニカマイシン又はロイシン枯渇培地の存在下で誘導した場合、両条件下で、これらの細胞はピューロマイシン耐性コロニーを生じさせた。

【 0 2 0 8 】

これは、C a s 9 発現の誘導により、C a s 9 ヌクレアーゼは、A A V S 1 切断部位にガイドされると、( 1 ) ドナープラスミド ( ドナーカセットが放出される ) 及び ( 2 ) ゲノム D N A 中の A A V S 1 部位 ( ドナーカセットが組み込まれる ) の両方において二本鎖切断を効率的に生成することをさらに裏付けている。

30

【 0 2 0 9 】

上記実施例は、C a s 9 ヌクレアーゼ ( この発現は A A R E に基づく ) のコントロール発現のための系が誘導条件によって微調整され得ることを示す説得力のある実験データを提供する。

【 0 2 1 0 】

実際、誘導の非存在下では、検出可能な発現は観察されないが、これは、漏出が観察されないことを意味する。

【 0 2 1 1 】

加えて、ゲノム編集は、誘導時にのみ観察することができ、誘導条件の除去により迅速に停止させることができる。

40

【 0 2 1 2 】

したがって、この系は、非常に正確にオン及びオフすることができるので、この系は、それを必要とする個体におけるゲノム編集及びそれ故に遺伝子治療を提供するための安全なツールを提供する。

【 0 2 1 3 】

本発明に開示される核酸配列

以下の表 1 には、本明細書で使用する核酸配列が開示されている：

【表 4】

本発明に開示される核酸配列

以下の表 1 には、本明細書で使用される核酸配列が開示されている：

配列番号：	タイプ	コメント
1	核酸	TRIB3 遺伝子由来の AARE 配列
2	核酸	CHOP 遺伝子由来の AARE 配列
3	核酸	ASNS 遺伝子由来の AARE 配列
4	核酸	ATF3 遺伝子由来の AARE 配列
5	核酸	SNAT2 遺伝子由来の AARE 配列
6	核酸	チミジンキナーゼ最小プロモーター
7	核酸	2×AARE 核酸
8	核酸	NLS-FLAG CAS9 核酸
9	核酸	pTRIP 2×AARE- NLS-FLAG CAS9 核酸
10	核酸	ガイド RNA AAVS1
11	核酸	5'プライマー
12	核酸	3'プライマー

10

20

TRIB3 遺伝子由来の AARE 配列：配列番号：1

【表 5】

cggttgcacccg

30

CHOP 遺伝子由来の AARE 配列：配列番号：2

【表 6】

aacattgcatcatccc

ASNS 遺伝子由来の AARE 配列：配列番号：3

【表 7】

gaagtttcatcatgcc

ATF3 遺伝子由来の AARE 配列：配列番号：4

【表 8】

agcgttgcacccg

40

SNAT2 遺伝子由来の AARE 配列：配列番号：5

【表 9】

gatattgcatcagttt

チミジンキナーゼ最小プロモーター核酸：配列番号：6

50

## 【表 1 0】

cgagggtccacttcgcatattaaggtgacgcgtgtggcctcgaacaccgagcgaccctgcagcgacccgcttaacagcgtaaca  
gcgtgccgca

2 x A A R E 核酸：配列番号：7

## 【表 1 1】

gattagctccggtttgcatcacccggaccgggggattagctccggtttgcatcacccggaccgggggattagctccggtttgcatc  
acccggaccggggggccggcgcggtgtagcgattagctccggtttgcatcacccggaccgggggattagctccggtttgcatca  
cccgaccgggggattagctccggtttgcatcacccggaccgggg

10

N L S - F L A G C A S 9 核酸：配列番号：8

## 【表 1 2】

atgggacctaagaaaaagaggaaggtgcctaagaaaaagaggaaggtgcctaagaaaaagaggaaggtggcgccgctgact  
acaaggatgacgacgataaatctagagacaagaaatactctattggactggatatcgggacaaactccgttggctggggccgtcata  
accgacgagtataaggtgccaagcaagaaattcaaggtgctgggtaatactgaccgccattcaatcaagaagaacctgatcgag  
cactctcttcgactccggtgaaaccgtgaagctactcggtgaagcggaccgcaaggcggagataacccgccgaagaatc  
ggatatgttatctgcaagagatctttagcaacgaaatggctaaggtggacgactccttcttcaccgcctggaagagagctttctggt  
ggaggaggataagaaacacgagaggcaccttatctcgaaatatcgtggatgaggtggcttaccatgaaaagtatcctacaatct  
accatctgaggaagaagctggtggacagcaccgataaagcagacctgaggtcatctatctggccctggctcatatgataaagttt  
agaggacactttctgatcgaggcgacctgaatcccataattccgatgtggataaactcttcattcaactggtgcagacataatacc  
aactgttcgaggagaatcccataaacgcttctggtgtggatgccaaaggctattctgtccgctcggtgtccaagtcacgcagactgg  
agaatctgattgcccactgccaggagaaaagaacggcctgtttgggaacctcatcgccctgagcctgggcctgacacctaa  
cttcaagtccaattttgatctggccgaagatgctaaactccagctctccaaggacacctatgacgatgatctggacaacctgctcgca  
cagataggcgaccagtacgccgatctctttctggctgctaagaatctctccgacgccattctgctgagcgacatactccgggtcaac  
actgagatcacaaaagcactctgagcgctccatgataaaacgctatgatgaacacctcaagacctgactctgctcaaaagccct  
cgtgaggcaacagctgccagagaagtacaaagatatcttcgaccagagcaagaatggatatgccggatacatgatggcgg  
agcatcacaggaagaattttacaagttcatcaaaccaatcctcgagaagatggacggtactgaagagctgctggtgaagctgaaca  
gggaggacctgctgaggaagcagaggacctttgataatggctccattccacatcagatacacctgggagagctgcatgcaatcct  
ccgcaggcaggaggatttctatccttctgaaggataaccgggagaagatagagaagatcctgaccttcaggatcccttattacgt

20

30

40

50

cgccctctggttagagcaactcccgttcgttgatgaccaggaaatctgaggagacaattactccttgaactcgaagagg  
tcgtggaataaggcgcaagcgcccgatcattcatgaacggatgaccaatttcgataagaacctgccaacgagaaggtcctgcc  
caaacttactcctgtacgagtatttcaccgtctataacgagctgactaaagtgaagtacgtgaccgagggcatgaggaagcctg  
ccttcctgtccggagagcagaagaaggctatcgttgatctgcttcaagactaatagaaagggtgacagtgaagcagctcaaggag  
gattactttaagaagatcgaatgctttgactcagtggaatctctggcgtggaggaccgtttaatgccagcctgggcacttaccatg  
atctgctgaagataatcaaagacaaagatttctcgataatgaggagaacgaggacatcctggaagatatcgtgctgacctgactc  
tgttcgaggatagagagatgatcgaagagcgctgaagacctatgccatctgtttgacgataaagtcataaacagctcaagcgg  
cggcgctacactgggtgggtagactctccaggaaactcataaacggcatccgcgacaaacagagcggaaagaccatcctgga  
tttctgaaatccgacggattcgttaacaggaactcatgcaactgattcacgatgactctctgacatttaaaggacatccagaag  
gcacaggtgagcggtaaggcgacagcctgcacgagcacatcgccaacctcgtggatcacccgccataaagaagggaact  
gcagacagtcgaaggtcgtggacgaactcgtcaaatgatgggtcggcacaaagccagagaatatcgttatcgaatggcaaggga  
gaaccaaaccaccagaaggcgccagaagaactctcggaacggatgaaaagaatcgaagagggaattaaggagctgggatct  
cagatactgaaggagcacctgtggagaatacacagctccagaacgagaaactctactgtactacctccagaacggcggggac  
atgtacgttgaccaggaactgcacataaccggctgtcgtgattatgacgtggaccatattgtccacagtccttctcaaatgact  
ccattgacaacaagggtgctgaccagatccgataagaatcgcggtgaagtctgacaatgttccatcagaagaggtgtaagaagat  
gaagaattactggcgagctcctcaacgccaaactgatccaccagcggaagtttgacaatctgactaaggcagaagaggagg  
tctgagcgaactcgacaaggccggctttattaagggaactggtcgaaacacgccagattaccaaacacgtggcacaatcctc  
gactctaggatgaacactaagtacgatgagaacgataagctgatcagggaagtgaagtataactcgaagagcaagctggtgt  
ctgacttcgggaaggactttcaattctacaaagttcgcaataaacaattaccatcatgctcacgatgcctatctcaatgctgtcgtt  
gcaccgacctgatcaagaataccctaactggagctgtggtcgtgtacggtgactataaagtctacgatgtgaggaagatgatag  
caaaagtctgagcaagagattggcaaaagccaccgccaagtacttctactctataatcatgaatttcttaagactgagataacctg  
gtaacggcgaaatccggaagcgccactgatcgaacaaacggagaacaggagaaatcgtgtgggataaaggcagggact  
tcgcaactgtcggaagggtgtgtccatgccacaagtcaatcgtgaagaagaccgaagtgcagaccggcgattctcaagg  
agagcatcctgcaaagcggaactctgacaagctgatcgccaggaagaagattgggacccaagaagtatggcgggttcgattc  
ccctacagtggcttattcgttctgtgtggcaaaagtgggaaaggcaagtccaagaaactcaagctgttaaggagctgctcg  
gaattactattatggagagatccagcttcgagaagaatccaatcgatttctggaagctaaaggctataaagaagtgaagaaagatc  
tcatcatcaaactgccaagtactctctttgagctggagaatggtagggaagcggtgctggcctccggcgagagctgcagaaa  
ggaaaagagctggctctgccctcaaatcgtgaacttctgtatctggcctccactacgagaaactcaaggtagccctgaaga  
caatgagcagaagcaactctttgtgagcaacataaactacctggacgaatcattgaacagattagcgagttcagcaagcggg  
ttattctggccgatgaaaacctgataaagtgtgagcgcatataaagcacagggacaagccaattcgcaacaagcagagaa  
tattatccacctcttactctgactaatctggcgctcctgctgcctcaagtatttcgatacaactattgacaggaagcggtacacctt  
accaaagaagttctcgatgccaccctgatacaccagtcaattaccggactgtacgagactcgatcgacctgtctcagctcgcggg  
cgactag

10

20

30

40

p T r i p - 2 x A A R E - N L S - F L A G - C A S 9 プラスミドの核酸：配列番号：9

【表 1 3】

ccagatcctctacgccggacgcatcgtggccggcatcaccggcgccacaggtgcgggtgctggcgctatatcgccgacatcac  
 cgatgggggaagatcgggctcggcacttcgggctcatgagcgcttgttcggcggtgggtatgggtggcagggccccgtggccggggg  
 actgttggcgccatctccttgcacacattccttgcggcgcggtgctcaacggcctcaacactactgggctgcttctaagt  
 caggagtcgcataagggagagcgctgaatggtgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacac  
 ccgccaacacccgctgacgcgcctgacgggcttgtctgctcccggtacccgttacagacaagctgtgaccgtctccggagct  
 gcatgtgtcagaggtttaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctattttataggttaatgtcat  
 gataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttttctaaatacattcaaata  
 tgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtgcc  
 cttattccctttttgcggcattttgecttctgttttgcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtg  
 cacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcggaagaacgtttccaatgatgagca  
 cttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgattgacgcccgggaagagcaactcggtcgccgatacactatttctcagaat  
 gacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttaccggatggcatgacagtaagagaattatgagtgctgccataacatg  
 agtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatca  
 tghtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatg  
 gcaacaacgttgcgcaaacactattaactggcgaactacttactctagcttccgggcaacaattaatagactggatggaggcgataaa  
 gttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggt  
 atcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacg  
 aaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatactttgattgattta  
 aaacttcatttttaatttaaaaggatctagggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgtccactga  
 gcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaccacc  
 gctaccagcgggtggtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacacia  
 tactgtccttctagttagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaactctgttacc  
 agtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggc  
 tgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcattgagaa  
 agcggccacgcttcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggga  
 gcttccaggggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttcgccaccttgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagg  
 gggcgaggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggtcctggccttttgcctgctacatgttcttctctg  
 cgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgacccgaacgaccgagcgcagc

10

20

30

40

50

gagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgccaatacgcaaaccgctctccccgcgcttgccgattcattaatgcagctgt  
ggaatgtgtcagtgtaggtgtggaaagtcgccaggtccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagca  
accaggtgtggaaagtcgccaggtccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcgccg  
ccctaactccgccatcccgccctaactccgccaggtccgccattctccgccatggctgactaatttttttattatgcagagg  
ccgaggccgctcgccctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcaaaaagcttgacaca  
agacaggcttgcgagatattgttgagaataccactttatcccgctcagggagaggcagtgcgtaaaaagacgaggactcatgtg  
aaatactggttttttagtgcgcagatctctataatctcgcgcaacctattttccctcgaacacttttaagccgtagataaacaggctg  
ggacacttcacatgagcgaaaaatacatctgcacctgggacatgttgagatccatgcacgtaaacgcgaagccgactgagctct  
tctgaacaatggaaaggcattattgccgtaagccgtggcggtctgtaccgggtgcgttactggcgcgtaactgggtattcgtcatg  
tcgataccggtttgatttccagctacgatcacgacaaccagcgcgagcttaagtgctgaaacgcgcagaaggcgatggcgaagg  
cttcacgttattgatgacctggtggataccggtggtactgcggttgcgattcgtgaaatgtatccaaaagcgactttgtccacctt  
cgcaaaaccggtgctgctcgctggttgatgactatgtgttgatatacccgcaagatacctggattgaacagccgtgggatatggg  
cgctgtattcgtccgccaatctccggtcgtaacttttcaacgcctggcactgccggcggtgttcttttaacttcaggcggttac  
aatagtttccagtaagtattctggaggctgcatccatgacacaggcaaacctgagcgaaaccctgttcaaaccccgctttaaatac  
ctgaaacctgcagcgtagtcggcgctttaatcacggcgcaaacccgctgtgcagtcggcccttgatggtaaaacctccctcac  
tggtatcgcatgattaacctgtgatgtggatctggcgcgcatgaccacgcgaaatcctgcagtcaggcagctattgtgatg  
agcgatgccgaacgtaccgacgatgattatagatacgggtattggctaccgtggcggaactggatttatgagtgggccccgga  
tctttgtgaaggaaaccttacttctgtgtgtgacataattggacaaactacacagagatttaaagctctaaggtaataataaaatttta  
agtgtataatgtgttaactactgattctaattgtttgtgtatttttagattccaacctatggaactgatgaatgggagcagtggtggaatg  
ccttaatgaggaaaacctgtttgtcagaagaaatgccatctagtgtgatgaggctactgctgactctaacattctactcctcaa  
aaaagaagagaaaggtagaagaccccaaggactttccttcagaattgctaagtttttgagtcagctgtgttttagtaatagaactcttg  
cttgccttctatttacaccacaaaggaaaaagctgcactgtatatacaagaaaattatggaaaaatattctgtaacctttataagtaggc  
ataacagttataatacatacactgtttttctactccacacaggcatagagtgtctgtattaataactatgctcaaaaattgtgtacct  
ttagcttttaatttgaagggggtaataagggaattttgatgtatagtccttgactagagatcataatcagccataccacattttaga  
ggttttacttgcttaaaaaacctccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtttgtaactgtttattgcag  
cttataatgggtacaaataaagcaatgcatcacaaatttcacaaataaagcattttttactgcattctagtgtgtgttgccaaactca  
tcaatgtatcttatcatgtctggatcaactggataactcaagtaacaaaatcatccaaaactccccccataccctattaccactg  
ccaattacctagtgttttcttactctaaacctgtgattcctctgaattattttcattttaagaaattgtattgttaaatgtactacaac  
ttagtagttggaagggtcaattcactcccaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttcctgatt  
agcagaactacacaccagggccagggtcagataccactgtgatttggtgctacaagctagtagcaggtgagccagataa  
ggtagaagaggccaataaaggagagaacaccagctgtttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaag  
tgtagagtgagggttgacagccgcttagctttcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatc

10

20

30

40

50

gagcttgctacaagggactttccgctggggactttccagggaggcgtggcctgggaggactggggagtggcgagccctcagat  
cctgcatataagcagctgcttttgcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggga  
cccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgtctcaagtagtgtgtcccgtctgtgtgtgactctgtaactagagatccct  
cagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtgggcgccgaacagggacttgaagcgaaagggaaccagaggagctc  
tctgcagcgaggactcggcttctgaagcgcgacggcaagaggcgagggcgaggactggtgagtacccaaaaattttgac  
tagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtttaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaattc  
gggttaaggccagggggaagaaaaatataaaatataatagttgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcc  
tggcctgttagaatacagaaaggctgtagacaaatactgggacagctacaacatcccttcagacaggatcagaagaacttagat  
cattatataatacagtagcaacctctattgtgtgcatcaaaaggatagagataaaagacaccaagggaagcttagacaagatagagg  
aagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcgccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattg  
gagaagtgaattatataataaagtagtaaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcag  
agagaaaaaagagcagtggggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgagcgtcaatga  
cgctgacgggtacaggccagacaattattgtctgtatagtgcagcagcagaacaatttgcaggggctattgaggcgcaacagcat  
ctgttgcaactcagctctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtgaaagatacctaaaggatcaacagctcct  
ggggatttgggggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttgggaatgctagtggagtaataatctctggaacagattt  
ggatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactcctaattgaagaatcgcaaaac  
cagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgggaattggttaacataacaaattggctgtggt  
atataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagggttaagaatagttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcaggg  
atattcaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccgaggggaccgcagggcccgaagggaatagaagaagaggtggaga  
gagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgccgaattcacaaatggcagttatccacaatttt  
aaaaaagaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaatt  
acaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggtttattacagggacagcagagatccactttggctgatacgcggtatcgcggt  
caagtttgcataaaaaagcaggctccgcgccgcccccttcaccggtaccgattagctcgggttgcacccggaccggggga  
ttagctccggttgcacacccggaccgggggattagctccggttgcacacccggaccgggggattagctccggttgcacaccc  
agctccggttgcacacccggaccgggggattagctccggttgcacacccggaccgggggattagctccggttgcacaccc  
ggaccggggactcgaggtccacttcgcatattaagggtgacgcgtgtggcctcgaacaccgagcgaccctgcagcgacccgctta  
acagcgtaacacgcgtgccgaagcttgaattctgatcagcattccggtactgttggttaagccaccatgggacctaaagaaaaga  
ggaaggtgcctaagaaaaagaggaaggtgcctaagaaaaagaggaaggtggcgccgctgactacaaggatgacgacgataa  
atctagagacaagaaatactctattggactggatcgggacaaactccgttggctggcgccgataaccgacgagataaggtgc  
caagcaagaaattcaaggtgctgggtaatactgaccgccattcaatcaagaagaacctgatcgagcactctcttcgactccggt  
gaaaccgctgaagctactcggctgaagcgaccgcaagcgagatacaccgcccgaagaatcgatattgtatctgcaaga  
gatctttagcaacgaaatggctaagggtggagactcctcttaccgcctggaagagagcttctggtggaggaggataaagaac

10

20

30

40

50



acgagaggcaccctatattcggaatatcgtggatgaggtggcttaccatgaaaagtatcctacaatctaccatctgaggaagaag  
ctgggtggacagcaccgataaagcagacctgaggtcatctatctggccctggctcatatgataaagtttagaggacactttctgac  
gaggcgacctgaatcccgataattccgatgtggataaactcttcatcactggtgcagacatataaccaactgttcgaggagaat  
cccataaacgcttctggtgtggatgccaggctattctgtccgctcggctgtccaagtcacgcagactggagaatctgattgccaa  
ctgccaggagaaaagaagaacggcctgttgggaacctcatcgccctgagcctgggcctgacacctaactcaagtccaatttga  
tctggccgaagatgctaaactccagctctccaaggacacatgacgatgatctggacaacctgtctgcacagataggcgaccag  
tacccgatctcttctggctgctaagaatctctccgacgccattctgctgagcgacatactccgggtcaacactgagatcaccaaag  
cacctctgagcgccctcatgataaacgctatgatgaacacatcaagacctgactctgctcaagccctctgtaggcaacagctg  
ccagagaagtacaaagagataattcttcgaccagagcaagaatggatgcccggatacatcgatggcggagcatcacaggaagaa  
tttacaagttcatcaaacatctcgcagaagatggacggctactgaagagctgctggtgaagctgaacagggaggacctgctgag  
gaagcagaggaccttfgataatggctccattccacatcagatacacctgggagagctgcatgcaatcctccgaggcaggaggat  
ttctatcttctcgaaggataaccgggagaagatagagaagatctgaccttcaggatcccttattacgtcggccctctggctagag  
gcaactcccgtctcgttggatgaccaggaaatctgaggagacaattactccttggaaactcgaagaggtcgtggataaggcgca  
agcgcccagtcattcatcgaacggatgaccaatttcgataagaacctgcccacgagaaggtcctcccaaacattcactctgta  
cgagtatttcaccgtctataacagagctgactaaagtgaagtacgtgaccgaggcatgaggaagcctgccttctgtccggagagc  
agaagaaggctatcgttcatctgtcttcaagactaatagaagggtgacagtgaagcagctcaaggaggattttaagaagatcg  
aatgctttgactcagtggaatctctggctggaggaccgctttaatgccagcctgggcacttaccatgatctgctgaagataatcaa  
agacaaagatttctcgataatgaggagaacgaggacatcctggaagatcgtgctgacctgactctgttcgaggatagagaga  
tgatcgaaagagcgccctgaagacatgcccactgtttgacgataaagtcagaaacagctcaagcgccggcgctacactgggtg  
gggtgactctccaggaaactcataaacggcatccgcgacaaacagagcggaagaccatcctggatttctgaaatccgacgg  
attcgtaacaggaactcatgcaactgattcagatgactctctgacatttaagaggacatccagaaggcacagggtgagcggtca  
aggcgacagcctgcacgagcacatcgccaacctcgtggatcacccgcataaagaagggaatactgcagacagtcgaaggtcg  
tggacgaactcgtcaaatgtatgggtcggcacaagccagagaatatcgttatcgaaatggcaaggggagaaccaaacaccaga  
agggccagaagaactctcgggaacggatgaaaagaatcgaagagggaattaaggagctgggatctcagatactgaaggagcac  
cctgtggagaatacacagctccagaacgagaactctacctgtactacctcagaacggcgggacatgtacgttgaccaggaaac  
tcgacatcaaccggctgtccgattatgacgtggaccatattgttccacagtccttctcaagatgactccattgacaacaagggtgct  
gaccagatccgataagaatcgcggtgaagtctgacaatgttccatcagaagaggtggtcaagaagatgaagaattactggcggcag  
ctctcaacgccaaactgatcacccagcggaagtttgacaatctgactaaggcagaaagaggaggtctgagcgaactcgacaag  
gccgctttattaaggaggcaactggctgaaacacgccagattaccaaacacgtggcacaatcctcgactctaggtgaacactaa  
gtacgatgagaacgataagctgatcagggaagtgaagtataactctgaagagcaagctgggtgtctgacttccggaaggactttc  
aattctacaaagttcgcgaaataaacaattaccatcatgctcagatgcctatctcaatgctgtcgttggcaccgcccctgatcaagaa  
ataccctaaactggagctgagttcgtgtacggtgactataaagtctacgatgtgaggaagatgatagcaagctctgagcaagagat

10

20

30

40

tg gcaaa gccacc gccaagt actctt ctactcta atatcat gaattt cttaag actgag ataacc ctggcta acggcg aaatcc gga  
agc gccc actgat cgaacaa acggaga aacagg agaaatc gtgtgg gataaa ggcaagg gacttc gcaact gtgcgg aaggtg  
ctgtcc atgccaca agtcaata tctgtga agaagacc gaagtgc agaccggc ggattt ccaaagg agagcatc ctgcca aagcgg  
aactct gacaag tcatgcc aggaaga agattgg gaccca aagaagt atggcg gtttcg attccc tacagt ggcttatt ccgtt  
ctggct gtggcaaa agtgaga aaggca agtcca agaaact caagtct gttaagg agctgctc ggaatt actatt atggag agatc  
cagcttc gagaaga atccaat cgaattt ctgga agcta agggct ataaaga agtga agaaag atctcat caaaact gcccaagt  
actctc tctttg agctgg agaatt gtagga agcggat gctggc ctccg ccggag agctgc agaaag gaaacg agctgg ctctgc  
cctcca aatacgt gaactt ctgtat ctggcct cccact acgagaa actcaa aggtag ccctga agacaat gagcaga agcaactc  
ttgttg agcaac ataact actctgg acgaaat cattga acagatt agcagat tcagca agcgggtt atttct ggccgat gcaaac  
ctcgata aagtgct gagcgc atataata agcacagg gacaagcca attcgc gaacaagc agagaat attatcc actctt tactctg  
actaat ctgggc gctcct gctgcctt caagtatt tgcata caactat tgacagg aagcgg tacacct ctacca aagaagt tctc gatg  
ccacct gatac accagt caattacc ggactgt acgag actc gcatc gacctgt ctcagctc ggcgcg gactag taaagc ggccg  
ggctcg agtctaga aagggt gggcgc gccgac ccagctt tctgtf acaaagt ggctcg acggta ctttaag accaat gacttaca  
aggcag ctgtag atcttag ccactt ttttaa agaaaagg ggggact ggaagg gctaatt cactcca acgaag acaaaatcgtcga  
gagatg ctgcata aagcag ctgtttt gctgtact gggtct ctctgt tagacc agatct gagcct gggagct ctctgg ctaacta  
gggaac ccactg cttaa gctcaata aagctt gccttg agtgc ttaagt agtgtg cccgtc tgttgt gactct ggtaact agag  
atccctc agaccct tttagtc agtgggaaa tcttagc agtagt agttcat gtcattt attattc agtattt ataactt gcaagaaat  
gaatatc agagagt gagaggc cttagc attata atagatt tagcag gaattga actagg agtgag cacacagg caaagctgcag  
aagtactt ggaaga agccacc agagata tccagctt gcacata cctggc taatccc agatccta aggattac attaagt ttaacta  
acattt atataat gatttata gtttaa agtataa acttatc taattt actattt ctgacag atattaa ttaactc caaatat cataag agatgatt  
actatt atcccc attaac acaag aggaactg agaggg aaagat gttga agtaattt cccaca attacag catccgtt agttacgac  
tctatg atcttctgac acaatt ccattt actcctc accctatg actcagtc gaatatat caaagttat ggacattat gctaag taacaaat  
taccctt tttatag taataact gtagtag attgag agaaga aattgtt gcaacctg aatagctt caagaaga agagaagt gaggat  
aagaata acagttgt catttaaca agtttaaca agtaactt ggtaga aagggtt caaatgc ataagg caaggata aattttct gg  
caacaag actata caataa accctt aaatag acttca aataattgtt ggaactt gataaa actaattaa atattt gaagattat caaat  
tataaat gtaattt actttt aaaaagg gaacat agaaatgt gtatc attagat gtagaa acaatc ctattat cacaattt gcaaaaca  
gtttgtt ataacaca agtaga atactgc attcaatta agttg actgcag attttgtgtttt gtaaaattagaaa gagataa caacaattg  
aattatt gaaagta acatgtaaat gttctac atacgttctt gacatctt gttcaat cattgatc gaagttctt atctt ggaaga attgtt  
ccaaag actctgaaata aggaaa caatct attatata gctc acacctt gtttact ttttagt gatttca attaata atgtaaat ggttaa  
aatttatt ctctctg agatcattt cacttgc agatagaaa cctgag actggg taattttt ataaatcta atttaattc agaaacac  
atcttatt cttaacat caattttc agttg atattat catataa agtcag ccttct catctg caggtt ccacac aaaaaatcca accaac  
tgtggat caaaaatatt gggaaaaa ataaaa tagcaata caacaata aaaaaata caaatc agaaaaa cagcac agtataa caa  
ctttatt tagcatttaca atctatt aggtattata agtaattc tag

10

20

30

40

ガイドRNA AASV1：配列番号：10

【表14】

ggggcgggcgggtgcgatgtcgt

5'プライマー：配列番号：11

【表15】

agggccacttctgctaattg

3'プライマー：配列番号：12

50

【表 1 6】  
gataccgtcggcggttggtg

10

20

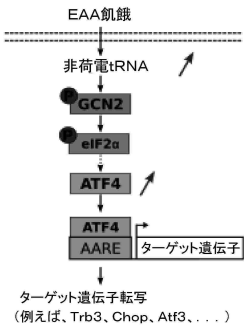
30

40

50

【図面】

【図 1】

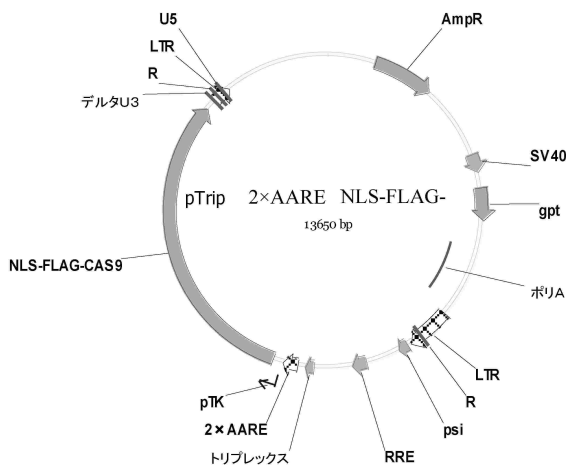


【図 2】

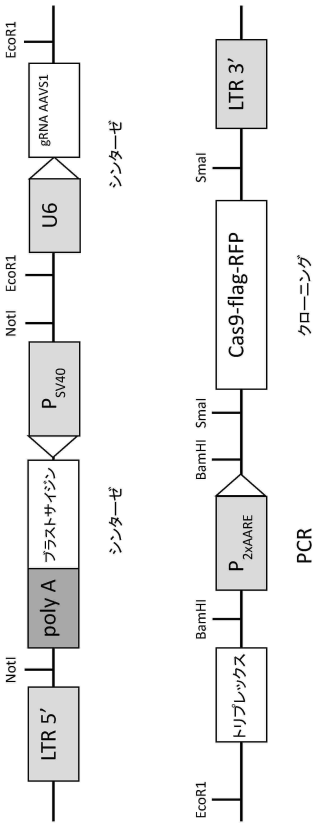


10

【図 3】



【図 4】



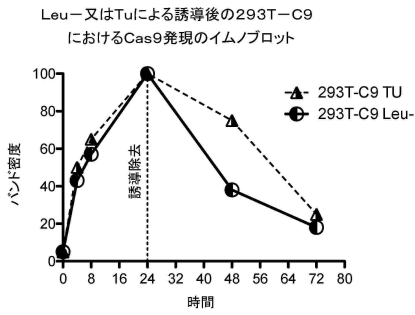
20

30

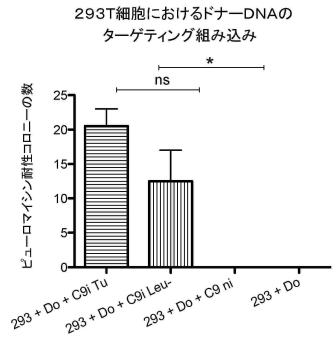
40

50

【 図 5 】

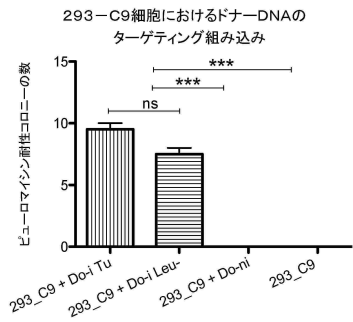


【 図 6 】



10

【 図 7 】



20

【 配列表 】

0007436145000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z Z N A

欧州特許庁(EP)

リエール

## (73)特許権者 595040744

サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシエルシュ・シャンティフィク  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
フランス国、7 5 0 1 6 パリ、リュ・ミシェル・アンジュ 3

## (73)特許権者 518059934

ソルボンヌ・ユニヴェルシテ  
SORBONNE UNIVERSITE  
フランス国、7 5 0 0 6 パリ、リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メドゥシーヌ 2 1

## (73)特許権者 502124444

コミッサリア ア レネルジー アトミック エ オ ゼネルジ ザルタナティヴ  
フランス国 エフ - 7 5 0 1 5 パリ、パティマン ル ポナン、リュ ルブラン 2 5

## (73)特許権者 591140123

アシスタンス ピュブリク - オピトー ドゥ パリ  
ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS  
フランス国パリ、ブルヴァール、ディデュロ、5 5

## (74)代理人 110001508

弁理士法人 津国

## (72)発明者 ラヴァサール、フィリップ

フランス国、7 5 0 1 3 パリ、ブールヴァール・ドゥ・ロピタル 4 7、オピタル・ピティエ・サルペトリエール、パティマン・イセエム、アンスティテュ・デュ・セルヴォー・エ・ドゥ・ラ・ムワル・エパニエール(イセエム)、セエヌエールエス・ユエムエール 7 2 2 5 ; アンセルム・ユ 9 7 5

## (72)発明者 マル、ジャック

フランス国、7 5 0 1 3 パリ、ブールヴァール・ドゥ・ロピタル 4 7、オピタル・ピティエ・サルペトリエール、パティマン・イセエム、アンスティテュ・デュ・セルヴォー・エ・ドゥ・ラ・ムワル・エパニエール(イセエム)、セエヌエールエス・ユエムエール 7 2 2 5 ; アンセルム・ユ 9 7 5

## (72)発明者 セルゲーラ、シェ

フランス国、9 2 2 6 5 フォントネー - オー - ローズ、ルート・デュ・パノラマ 1 8、セエア・エメイエレセエエネ、アンセルム・ユエセ 2 7

合議体

審判長 上條 肇

審判官 藤井 美穂

審判官 飯室 里美

## (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 2 2 1 8 4 ( U S , A 1 )

国際公開第 2 0 1 5 / 0 8 9 4 6 2 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 1 5 / 0 8 9 4 6 5 ( W O , A 1 )

SCIENCE SIGNALING, 2 0 1 5 年, VOL : 8 , NR : 3 7 4 ( R S 5 ) , PAGE ( S ) : 1 - 1 0

NATURE CHEMICAL BIOLOGY, 2 0 1 5 年, Vol . 1 1 , No . 3

---

, p . 1 9 8 - 2 0 0

NATURE BIOTECHNOLOGY , V o l . 3 3 , N o . 4 , 2 0 1 5 年 , p  
. 3 9 0 - 3 9 4

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C12N15/00-15/90

A61K

A61P

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / B I O S I S / E M B A S E ( S T  
N )