

(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

C 12 N	15/09 (2006.01)	F I	C 12 N	15/09	1 1 0
A 61 K	31/7088(2006.01)		A 61 K	31/7088	
A 61 K	35/76 (2015.01)		A 61 K	35/76	
A 61 K	48/00 (2006.01)		A 61 K	48/00	
A 61 P	31/00 (2006.01)		A 61 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)
 (86)(22)出願日 平成29年6月2日(2017.6.2)
 (65)公表番号 特表2019-517262(P2019-517262
 A)
 (43)公表日 令和1年6月24日(2019.6.24)
 (86)国際出願番号 PCT/EP2017/063549
 (87)国際公開番号 WO2017/207797
 (87)国際公開日 平成29年12月7日(2017.12.7)
 審査請求日 令和2年5月25日(2020.5.25)
 審判番号 不服2022-10650(P2022-10650/J
 1)
 審判請求日 令和4年7月7日(2022.7.7)
 (31)優先権主張番号 16172964.5
 (32)優先日 平成28年6月3日(2016.6.3)
 (33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 591100596
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サ
 ンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メディカル
 フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、
 リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1
 (73)特許権者 516369608
 イセエム (アンスティチュ・デュ・セル
 ヴォー・エ・ドゥ・ラ・ムワル・エビニ
 エール)
 I C M (I N S T I T U T D U C E R
 V E A U E T D E L A M O E L L E
 E P I N I E R E)
 フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、
 プールヴァール・ドゥ・ロピタル 4 7
 / 8 3、オピタル・ピティエ・サルペト
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 Cas 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 Cas 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
- Cas 9 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。

10

【請求項 2】

Cas 9 ヌクレアーゼが Cas 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】

20

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】

Cas9 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つて、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、(ii) 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つて、

- 請求項 9 に記載の医薬組成物、及び
- 薬学的に活性な化合物

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 Cas9 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 】

2012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(Fabre 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 Biol., 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ティングするために使用され成功している。

20

【 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。

30

【 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。

40

【 0 0 1 1 】

これまででは、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ている。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、「スクレアーゼの持続的発現は、不要であるだけではなく回避すべきであり、ス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スクレアーゼを同定／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スクレアーゼ（特に、Cas9スクレアーゼ）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であって、

- 最小プロモーターと、少なくとも1個のAAARE（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ス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、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、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】G C N 2 - e I F 2 - A T F 4 シグナリング経路を示すスキーム。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て、ターゲット遺伝子発現を誘導する。

【図2】A A R E - C a s ヌクレアーゼ構築物の描写を示すスキーム：6 コピーの T r b 3 由来 A A R E (黒点) プロモーター及び T k 最小プロモーターがこの構築物を構成する。

【図3】p T r i p - 2 × A A R E - N L S - F L A G - C A S 9 プラスミドを示すスキーム。p T K は、最小 T K プロモーターの位置を示す； 2 × A A R E は、A A R E 核酸の位置を示す； 矢印「N L S - F L A G - C A S 9 」は、C a s 9 ヌクレアーゼをコードする核酸の位置を示す； 矢印「A m p R 」は、アンピシリン耐性をコードする核酸を表す。

【図4】p T R I P _ b l a s t _ U 6 _ A A V S 1 _ 2 × A A R E - C a s 9 - F l a g - R F P 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 E c o R 1 制限部位は、下パネルの左端の E c o R 1 制限部位を指す。

【図5】ロイシンが欠乏した培地 (2 9 3 T - C 9 _ L e u - ; 実線) 又はツニカマイシンを含む培地 (2 9 3 T - C 9 T U ; 破線) のいずれかを用いて、T 0 の時点において誘導した際の 2 9 3 T 細胞における C a s 9 発現を示すプロット。T 0 の時点において誘導を実施し、2 4 時間の時点において除去する。誘導を除去した 2 4 時間後及び 4 8 時間後に (すなわち、それぞれ T 0 + 4 8 時間及び T 0 + 7 2 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 C a s 9 ヌクレアーゼのバンド強度を表し、したがって C a s 9 発現を表すものである。誘導の 2 4 時間後に、C a s 9 の最大発現 (これが任意に 1 0 0 % の発現を表す) が観察される。

【図6】2 9 3 T 細胞のゲノムの A A V S 1 部位におけるドナー D N A (D o) の組み込みを示すプロット。プラスミド「 p T R I P _ b l a s t _ U 6 _ A A V S 1 _ 2 × A A R E - C a s 9 - f l a g - R F P 」 (C 9) と、カセット「 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 」を含有するドナープラスミド (D o) とで 2 9 3 T 細胞をトランスフェクションした。ツニカマイシン (2 9 3 + D o + C 9 i _ T u) の存在下で、又はロイシン枯渇培地 (2 9 3 + D o + C 9 i _ L e u -) を用いて誘導した際のピ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 (2 9 3 + D o + C 9 n i) 、両プラスミド (D o 及び C 9) でトランスフェクションした 2 9 3 T 細胞をアッセイする。最後に、C 9 プラスミドのいかなるコピーも有しない 2 9 3 T 細胞をドナープラスミド (D o) でトランスフェクションし、ピ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 C 9 プラスミドを含有する 2 9 3 T 細胞 (2 9 3 - C 9 細胞) のゲノムの A A V S 1 部位におけるドナー D N A (D o) の組み込みを示すプロット。カセット「 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 」を含有するドナープラスミド (D o) で 2 9 3 - C 9 細胞をトランスフェクションした。ツニカマイシン (2 9 3 - C 9 + D o i _ T u) の存在下で、又はロイシン枯渇培地 (2 9 3 - C 9 + D o i _ L e u -) を用いて誘導した際のピ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 (2 9 3 - C 9 + D o - n i) 、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 細胞をアッセイ

10

20

30

40

50

イする。最後に、誘導の非存在下、ドナーブラスミド(Do)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学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、Casヌクレアーゼ(CRISPR(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、eIF2alpha-ATF4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Cas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、Cas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。

30

【0031】

本明細書に開示されるように、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、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】

- 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

本発明の第1の態様は、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。

40

【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

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、Casヌクレアーゼは、クラスI Casヌクレアーゼ、クラスII Casヌクレアーゼ及びクラスIII Cas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 Cas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); S inkunas 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):759-71)又はChylinski et al. (2013, Biology, Vol. 10(5) : 726-737)を参考し得る。

20

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施態様では、クラスI Casヌクレアーゼは、Cas3、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1及びCsy1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 Casヌクレアーゼは、Cas9、Cpf1、Csn2及びCas4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 Casヌクレアーゼは、Cas10、Csm2及びCmr5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、Casヌクレアーゼは、Cas9ヌクレアーゼである。

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施態様では、Cas9ヌクレアーゼは、細菌源、特に、Acaryochloris marinica、Actinomyces naeslundii、Alcanivorax dieselolei、Bellielia baltica、Campsylobacter jejuni、Corynebacterium diphtheriae、Coriobacterium glomerans、Corynebacterium ulcerans、Desulfomonile tiedjei、Dickeya dadantii、Escherichia coli、Francisella tularensis、Lactobacillus kefirnofaciens、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 bingchengensis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、Cas9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Cas9ヌクレアーゼは、天然に存在するCa

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。

【 0 0 4 4 】

特定の実施態様では、C a s 9 変異体は、S p C a s 9 - H F 1 (Kleinstiver et al.; N ature. 2016 Jan 28;529(7587):490-5)、f C a s 9 (これは、触媒的に不活性なC a s 9 とF o k I 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C a s 9 ヌクレアーゼ . を含み得る。

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施態様では、C a s 9 ヌクレアーゼをコードする核酸及び / 又はC a s 9 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あり得る。 10

【 0 0 4 6 】

いくつかの他の実施態様では、C a s 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)。 20

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施態様では、C a s ヌクレアーゼは、D N A 又はR N A ガイドC a s ヌクレアーゼである。

【 0 0 4 8 】

本発明の範囲内では、「D N A 又はR N A ガイド」は、ガイドD N A 又はR N A の存在下で、C a s ヌクレアーゼが核酸 (この配列は、ガイドD N A 及びR N A 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、C a s ヌクレアーゼをコードする核酸の発現は、C a s ヌクレアーゼをコードする核酸の転写に起因するm R N A 発現の測定、及び / 又はC a s 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。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施態様では、C a s ヌクレアーゼ発現の測定は、前記C a s ヌクレアーゼに特異的に結合する抗体(anti- antibodies)を用いて、C a s 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。 30

【 0 0 5 0 】

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。

【 0 0 5 1 】

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 ~ 1 0 , 0 0 0 倍、好みしくは4倍 ~ 5 0 0 倍、より好みしくは8倍 ~ 2 5 0 倍、最も好みしくは1 0 倍 ~ 1 0 0 倍で変動し得る。

【 0 0 5 2 】

本発明の範囲内では、2倍 ~ 1 0 , 0 0 0 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。 40

【 0 0 5 3 】

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、R N A 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（TATAボックス）を含むことを理解する。

【0054】

適切な最小プロモーターは、当業者に公知である。

【0055】

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、-グロビンのプロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）のプロモーター、SV40プロモーターなどを含む群において選択され得る。

【0056】

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。

【0057】

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；靈長類、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。

【0058】

本発明の範囲内では、「ターゲット細胞」は、Casヌ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。

【0059】

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（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。

【0060】

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。

【0061】

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。

【0062】

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。

【0063】

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。

【0064】

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。

【0065】

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。

【0066】

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。

【0067】

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、メープルシロップ尿疾患（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-プロモ-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】

10

20

30

40

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A A R E核酸を含む。

【0081】

特定の実施態様では、2個のA A R E核酸又はあるいは少なくとも2個のA A R E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、A A R E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。

10

【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。

20

【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】

30

・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。

40

【0091】

特定の実施態様では、送達粒子は、カチオン性脂質を含むリポプレックス；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

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、特にフレー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ガイダ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

【0106】

他の投与様式は、肺製剤、座薬及び経皮適用を用いる。

【0107】

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、サッカリソナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。

【0108】

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。

【0109】

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。

10

【0110】

所望の転帰を観察するために、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。

【0111】

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。

【0112】

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。

20

【0113】

特定の実施態様では、有効量の活性剤は、約0.001mg～約3000mg/投与量単位、好ましくは約0.05mg～約100mg/投与量単位を含み得る。

【0114】

本発明の範囲内では、約0.001mg～約3000mg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

30

/投与量単位を含む。

【0115】

特定の実施態様では、活性剤は、被験体体重1kgあたり、1日に、約0.001mg/kg～約100mg/kg、約0.01mg/kg～約50mg/kg、好ましくは、約0.1mg/kg～約40mg/kg、好ましくは、約0.5mg/kg～約30mg/kg、約0.01mg/kg～約

40

50

1.0 mg/kg、約0.1 mg/kg～約1.0 mg/kg、より好ましくは約1 mg/kg～約2.5 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 1×10^5 ～約 1×10^{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 1×10^5 ～約 1×10^{15} コピーは、

【表2】

10

2x10⁵, 3x10⁵, 4x10⁵, 5x10⁵, 6x10⁵, 7x10⁵, 8x10⁵, 9x10⁵, 1x10⁶, 2x10⁶,
 3x10⁶, 4x10⁶, 5x10⁶, 6x10⁶, 7x10⁶, 8x10⁶, 9x10⁶, 1x10⁷, 2x10⁷, 3x10⁷, 4x10⁷, 5x10⁷, 6x10⁷,
 7x10⁷, 8x10⁷, 9x10⁷, 1x10⁸, 2x10⁸, 3x10⁸, 4x10⁸, 5x10⁸, 6x10⁸, 7x10⁸, 8x10⁸, 9x10⁸, 1x10⁹,
 2x10⁹, 3x10⁹, 4x10⁹, 5x10⁹, 6x10⁹, 7x10⁹, 8x10⁹, 9x10⁹, 1x10¹⁰, 2x10¹⁰, 3x10¹⁰, 4x10¹⁰,
 5x10¹⁰, 6x10¹⁰, 7x10¹⁰, 8x10¹⁰, 9x10¹⁰, 1x10¹¹, 2x10¹¹, 3x10¹¹, 4x10¹¹, 5x10¹¹, 6x10¹¹,
 7x10¹¹, 8x10¹¹, 9x10¹¹, 1x10¹², 2x10¹², 3x10¹², 4x10¹², 5x10¹², 6x10¹², 7x10¹², 8x10¹²,
 9x10¹², 1x10¹³, 2x10¹³, 3x10¹³, 4x10¹³, 5x10¹³, 6x10¹³, 7x10¹³, 8x10¹³, 9x10¹³, 1x10¹⁴,
 2x10¹⁴, 3x10¹⁴, 4x10¹⁴, 5x10¹⁴, 6x10¹⁴, 7x10¹⁴, 8x10¹⁴, 9x10¹⁴

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、脾臓、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、腫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; TPPA; ATM; SACS; BBS10; BBS1; BBS2;
 BBS12; CIITA; BSND; GP1BA; HSD3B2; ACAT1; GPR56; BTD; 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; RGPRIP1L; 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; MCC1; MCC2;
 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.

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。

【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】

10

20

30

40

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、無リポタンパク血症；色覚異常；腸性先端皮膚炎；急性幼児肝不全；アシル-C o A 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 4 A；ベルナール・スーリ工症候群、タイプ A 1；-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；ビ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льтランスフェラーゼ I A 欠損症；カルニチンパルミトイльт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；脳膜黄色腫症；シャルコー・マリー・トゥース病、タイプ 4 D；シャルコー・マリー・トゥース病、タイプ 5 / A r t s 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；シトルリン欠損症；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 S A P 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 I a；グリコシル化の先天性障害、タイプ I b；グリコシル化の先天性障害、タイプ I c；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；囊胞性線維症；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 V I I C；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 X I 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 I I a；グルタル酸血症、タイプ I I c；グリシン脳症；グリシン脳症；グリコーゲン貯蔵症、タイプ I a；グリコーゲン貯蔵症、タイプ I b；グリコーゲン貯蔵症、タイプ I I；グリコーゲン貯蔵症、タイプ I I I；グリコーゲン貯蔵症、タイプ I V / 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 V I I；G R A C I L E 症候群及び他の B C S 1 L 関連障害；ヘモクロマトーシス、タイプ 2 A；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；H M G - C o A 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；M T H F R 欠損によるホモシスチン尿症；ホモシスチン尿症、c b l E タイプ；H y d r o l e t h a l u s 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 / C O A C H 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 関連纖毛関連疾患；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 デヒドロゲナー欠損症；リシン尿性タンパク不耐症；メープルシロップ尿症、タイプ 1 a；メープルシロップ尿症、タイプ 1 b；メッケル症候群 1 / バルデー・ビードル症候群 13；中鎖アシル - C o A デヒドロゲナー欠損症；皮質下囊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 II / 白内障を伴う視神經萎縮 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 DNA 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 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 / GM 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ルターゼ欠損症；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・ヘン切斷症候群；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欠損症；多発性囊胞腎、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 E 1 - 欠損症；ピルビン酸デヒドロゲナー E 1 - 欠損症；6 - ピルボイル - テトラヒドロプロテリンシルターゼ欠損症；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；口バーツ症候群；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・オビッツ症候群；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；ティ・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（C R E）；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（バレー熱）；クロイツフェルト・ヤコブ病、伝染性海綿状（C J D）；クリプトスピリジウム症；サイクロスボーラ症；デング熱；ジフテリア；*E. Coli*感染症；東部ウマ脳炎（E E E）；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；D 6 8 エンテロウイルス感染症、（E V - D 6 8）；ジアルジア症；淋菌感染症（淋菌）；鼠径部肉芽腫；タイプB *H aemophilus Influenza*疾患（H i b 又はH - f l u）；ハンタウイルス肺症候群（H P S）；溶血性尿毒症症候群（H U S）；A型肝炎（H e p A）；B型肝炎（H e p B）；C型肝炎（H e p C）；D型肝炎（H e p D）；E型肝炎（H e p E）；ヘルペス；帯状ヘルペス、帯状V Z V（帯状疱疹）；ヒストプラスマ症；ヒト免疫不全ウイルス/A I D S（H I V / A I D S）；ヒトパピローマリウス（H P V）；インフルエンザ（F l u）；鉛中毒；レジオネラ症（レジオネラ病）；癰（ハンセン病）；レプトスピラ症；リストリア症；ライム病；*Lymphogranuloma venereum*感染症（L V G）；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（M E R S - C o V）；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（P I D）；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（ボリオ）；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；リケッチャ症（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）；S almonellosis gastroenteritis感染症；疥癬の蔓延；サバ中毒；重症急性呼吸器症候群（S A R S）；*Shigellosis gastroenteritis*感染症；天然痘；メチシリン耐性ブドウ球菌感染症（M R S A）；ブドウ球菌食中毒；パンコマイシン中間ブドウ球菌感染症（V I S A）；パンコマイシン耐性ブドウ球菌感染症（V R S A）；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（S T S S）；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（T B）；潜伏結核（L T B I）；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（i P S C）並びに異なる種由来の成体細胞を含むex vivo操作

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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A A R E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。

30

【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、サッカリソナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。

40

【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

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、
- 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；
- 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；
- 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ソ；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、ブレオマイシン、マイトイマイシン、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て、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、單一コピーの 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（2 9 3 T G F P 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タクションする。

【 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（RNA 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 G F P) を特異的にターゲティングするガイド RNA 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

10

20

30

40

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 タグのウエスタンプ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内で、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 G F P 細胞が C A S 9 と g R N A G F P 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 G F P 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 によって細菌スクレアーゼ 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トサイジン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 1 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vRNAで293T細胞をトランスクレッショニングし、次いで、2μg/mlプラスチコサイジン(Sigma-Aldrich(登録商標))で選択した。非トランスクレッショニング293T細胞は全て死亡した一方で、トランスクレッショニング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-pTRIP_blast_U6_AAVS1_2xAARE-Cas9-flag-RFPを含有していたことを示している。

【0191】

293-C9と称されるこの集団をエクスパンションし、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)。

【0193】

プ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-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。

【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-アクチンのレベルも測定した。-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。

【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

10

20

30

40

50

及び72時間の時点を参照のこと)。これは、プロモーター $2 \times A A R E - T k m$ が、EAA餓餓によって又は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-f1ag-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-f1ag-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-f1ag-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-f1ag-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Ca²⁺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 × 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 × 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 × 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 】

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。20

【 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、本明細書で使用され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

T R I B 3 遺伝子由来の A A R E 配列：配列番号：1

【表5】

cggtttgcaccccg

C H O P 遺伝子由来の A A R E 配列：配列番号：2

【表6】

aacattgcacatccc

A S N S 遺伝子由来の A A R E 配列：配列番号：3

【表7】

gaagtttcatcatgcc

A T F 3 遺伝子由来の A A R E 配列：配列番号：4

【表8】

agcggtgcacccccc

S N A T 2 遺伝子由来の A A R E 配列：配列番号：5

【表9】

gatattgcacagttt

チミジンキナーゼ最小プロモーター核酸：配列番号：6

10

20

30

40

50

【表 1 0】

cgagggtccacttcgcatattaaggtagcgcgtggcctgaacaccgagcgaccctgcagcgaccgcctaacagcgtcaaca
gcgtgccgca

2 × A A R E 核酸：配列番号：7

【表 1 1】

gattagtcgcgtttgcatcacccggaccggggattagctccggtttgcacccggaccggggattagctccggtttgcatc
acccggaccggggccggcgcgtctagcgattagctccggtttgcacccggaccggggattagctccggtttgcatca
ccggaccggggattagctccggtttgcacccggaccgggg

10

N L S - F L A G C A S 9 核酸：配列番号：8

【表 1 2】

atgggacctaagaaaaagaggaaggtagcctaagaaaaagaggaaggtagcctaagaaaaagaggaaggtagggggccgctgact
acaaggatgacgacgataaatcttagagacaagaataactctattggactggatatcgaaactccgttggctggccgtcata
accgacgagtataaggtagccaagcaagaaattcaaggtgtggtaatactgaccggcattcaatcaagaagaacctgatcgag
cactccttcgactccggtaaacccgtgaagctactcggtgaaggcgaccgcaaggcgagatacacccggcgaagaatc
ggatatgttatctgcaagagatcttagcaacgaaatggctaaggtagggacactccttcaccgcctgaaagagagacttctgg
ggaggaggataagaaacacgagaggcaccctatattcgaaatatcggtgatgaggtaggtggcttaccatgaaaagtatcctacaatct
accatctgaggaagaagctggtagcggacagcaccgataaagcagacactgaggctcatctatctggccctggctcatatgataaagtt
agaggacacttctgatcgaggcgaccctgaatccgataattccgatgtggataaactcttcaactggcagacatataacc
aactgtcgaggagaatcccataaacgcttctggatgccaaggctattctgtccgtcgctgtccaagtcacgcagactgg
agaatctgattgcccaactgccaggagaaaagaagaacggcgtttggaaacctcatgccctgagcctggccgtacaccaa
cttcaagtccaaatttgatctggccgaagatgctaaactccagctctcaaggacacctatgacgatgtggacaacctgctcgca
cagataggcgaccagtacgcccattctggctgctaagaatctccgacgccattctgctgagcgcacatactccggtaac
actgagatcaccaaaagcacctctgagcgccctccatgataaaacgctatgatgaacaccatcaagacactgctcaagccct
cgtgaggcaacagctgccagagaagtacaagagatattctcgaccagagcaagaatggatgcccatacatcgatggcg
agcatcacaggaagaatttacaagttcatcaaaccatctcgagaagatggcggactgtgatgaaagagactgctggtaagctgaaca
gggaggacctgctgaggaagcagaggacccattgataatggctccattccacatcagatacacctggagagactgcatgcaatct
ccgcaggcaggaggattctatccttcctgaaggataaccgggagaagatgacccctcaggatcccttattacgt

20

30

40

50

cggccctctggtagaggcaactcccgttcgcttggatgaccaggaaatctgaggagacaattactccttggaaacttcgaagagg
 tcgtggataagggcgcaagcgcccagtcatcgacggatgaccatcgtactttcgatagaacccgcacgagaaggctcgcc
 caaacattcactcctgtacgagtattcacccgtctataacgagctgactaaagtgaagtgacgtgaccgagggcatgaggaagcctg
 cttctgtccggagagcagaagaaggctatcggtatctgtctcaagactaatagaaaagggtgacagtgacactcaaggag
 gattacttaagaagatcgaaatcggtactcgtggaaatctcggtggaggaccgccttaatgcgcacccgtggacttaccatg
 atctgtactaagataatcaaagacaagattcctcgataatgaggagaacgaggacatcgtggaaatcggtctgactccctgactc
 tggtcgaggatagagatgtcgaaagagcgcctgaagacccatgcgtttgacgataaagtcatgaaacagctcaagcgg
 cggcgctacactgggtgggttagactctccaggaaactcataaacggcatccgcacaaacagagcggaaagaccatcctgga
 ttcctgaaatccgacggattcgctaacaggaacttcatgcaactgattcagtgactctgtacattaaagaggacatccagaag
 gcacaggtagcggtcaaggcgacagcgcacatcgccaaacctcgctggatcacccgcctaaagaaggaaatact
 cgacagactcaaggcggtggacactcgtaaagtgtatgggtcgccacaagccagagaatatcggttatcgaaatggcaaggga
 gaaccaaaccacccagaagggccagaagaactctcggaacggatgaaaagaatcgaaagaggaaattaaggagctggatct
 cagatactgaaaggacccctgtggagaatacagctccagaacgagaaactctacctgtactaccccgaaacggggac
 atgtacgttgcaccaggaaactcgacatcaaccggctgtccgattatgacgtggaccatattgtccacagtcttctcaaagatgact
 ccattgacaacaaggctgaccagatccgataagaatcgccgtaaatcgacttgcataatgtccatcagaagagggtgtcaagaagat
 gaagaattactggcgccgactcctcaacgcctaaactgtatcccgacggaaatgttgcataactcgactaaggcagaaaggagg
 tctgagcgactcgacaaggccggcttattaagaggcaactggcgaaacacgcctgacattaccaaacacgtggcacaatcctc
 gactcttagatgaacactaactgatcgatgagaacgataactgtgtggaaatgtgataactctgaaatggcaagctgggt
 ctgacttccgaaaggacttcaattctacaaatgtcgcaaaataaacaattaccatcatgctcgtcgatgcctatctcaatgtcg
 gcaccgcctgtcaagaataaccctaaactggatctgagttcggtacggactataaagtctacgtgtggagatgatgat
 caaagtctgagcaagagattggcaaaaggccaccgcctactgtcgaaacaaacggagaaacaggagaatctgtggataaaggcagg
 gactaacggcgaaatccggaagcgcccactgtcgaaacaaacggagaaatctgtggataaaggcagg
 tcgcaactgtcgccagggtgtccatgccacaactgtcgaaatctgtcgaaagaccgaaatctgtggatctcaagg
 agagcatcctgcctaaaggcgactctgactcgatgcgtcgactataaaggcttgcgttgcattacgtgtggatctcaagg
 ccctacagtggctattccgttctggcgatcgatcgacttgcgttgcattacgtgtggatctcaagg
 gaattacttattggagagatcccgacttgcgttgcattacgtgtggatctgcgttgcattacgtgtggatctcaagg
 tcatcatcaaactgcccactgtcgatcgacttgcgttgcattacgtgtggatctgcgttgcattacgtgtggatctcaagg
 ggaaacgagctggctgcctccaaatcgacttgcgttgcattacgtgtggatctgcgttgcattacgtgtggatctcaagg
 caatgagcagaagcaacttgcgttgcattacgtgtggatctgcgttgcattacgtgtggatctcaagg
 ttattctggcgatcgaaacctcgataaagtgtcgatcgacttgcgttgcattacgtgtggatctcaagg
 accaaagaatgtcgatcgacttgcgttgcattacgtgtggatctgcgttgcattacgtgtggatctcaagg
 cgactag

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：9

10

20

30

40

50

【表13】

ccagatccctacgcggacgcacgtggccggcatcaccggccacaggcggtgctggccatatcgccgacatcac
cgatgggaagatcggctgccacttcggctcatgagcgcttgcggatggcaggccccgtggccgggg
actgttggcgccatctccatgcaccattcctgcggcggtgctcaacggctcaacctactactggctgcttcaatg
caggagtgcataagggagagcgtcgaatggcacttcgtacaatctgctgtgcgcatagttaagccagccccgacac
ccgccaacacccgctacgcgcctgacgggttgctgcctccggcatccgtacagacaagctgtgaccgtccgggact
gcatgtgtcagaggtttccacgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaaggcctcgtgatacgcctatttataggttaatgtcat
gataataatggttcttagacgtcaggggactttcgaaaatgtgcggaaacccctattgtttatccatcaaata
tgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgttcataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacattccgtgc
cttattcccttttgcggcatttgcctccgtttgtcaccaggaaacgcgtgtgaaagtaaaagatgtcgaagatcagttgggt
cacgagtgggtacatcgaactggatctcaacagcgtaagatcctgagagtttcgcgggaagaacgtttccaatgtgagca
ctttaaagttctgtatggcggttattccgtattgacgccggcaagagcaactcggtgcgcatacactattctcagaat
gacttgggtgagtactcaccagtacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgcgcataaccatg
agtgataacactcgcccaacttacttgcacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcctttgcacaacatggggatca
tgtaactcgccctgatcggtggaaacggagctgaatgaagccataccaaacgcgcgggtgacaccacgatgcctgtagcaatg
gcaacaacgttgcgcaaactattaacttgcgaaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcg
gataaaaatggcaggaccacttgcgcgtggccctccggctgggttattgtctgatggataatctggagccggtagcgtgggtc
atcattgcagcactggggccagatggtaagccctccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaaggcaactatggatg
aaatagacagatcgctgagataggtgcctactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattg
aaacttcattttaaataaaaggatctaggtaagatcctttgataatctcatgaccaaaatccctaactgtagttcgtccactg
gcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttgcggatccttttgcgcgtatctgcgtctgcgtcaacaaaaaccacc
gctaccagcggtgggttgcggatcaagagactaccaactttccgaaggtaactggctcagcagacgcgagataccaa
tactgtcctctagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgttagcaccgcctacatcctgcgtctgc
atggctgcgtccagttggcgataagtcgtgttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcg
tgaacgggggggtcgacacagcccagcttgcggagcgaacgcacccatccgtactgagataccctacagcgt
gacgcattggaaaacgcctgttatctttagtgcctgcgggttgcgcaccctctgacttgcgtgatgc
ggttccaggggaaaacgcctgttatctttagtgcctgcgggttgcgcaccctctgacttgcgtgatgc
ggggcggagccatggaaaaacgcctgttatccgttgcgggttgcgcaccctctgacttgcgtgatgc
cggttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttagtgcgtgataccgcgcgcagccga
acgcgacgcgcgc

10

20

30

40

gagtcagtggcgaggaaagcggaaagagcgcggccaaatcgcaaaccgcctcccccgcggtggccgattcattaatgcagctgt
ggaatgtgtcgatgggtgtggaaagtcccaggctcccaggcagaagatgcacaagcatgcataatgcagca
accaggtgtggaaagtcccaggctcccaggcagaagatgcacaagcatgcataatgcagcaaccataggcc
ccctaactccgcctccgcctactccgcctccaggcttccgcgtacttccgcctccatggctgactaatttttatgcagagg
ccgaggccgcctccgcctactccgcctccaggcttccgcgtacttccgcctccatggctgactaatttttatgcagagg
agacaggcttgcgagatgtttgagaataccactttatccgcgtcaggagaggcagtgctaaaaagacgcggactcatgt
aaatactgttttagtgcgccagatctataatctcgcaacacttttaagccgtagataaacaggctg
ggcacacttcacatgagcggaaaatacatcgacacccgcgcgagctaaagtgcgaaacgcgcagaaggcgatggcgaagg
cttcatcgattgtatccagctacgatcacaaccgcgcgagctaaagtgcgaaacgcgcagaaggcgatggcgaagg
cgctgattgtccgcctactccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgt
aatagttccagtaagtattctggaggctgcatccatgacacaggcaacactgagcggaaaacctgtcaaaccccgcttaacatc
ctgaaacctcgacgctagccgcgttgcattacggcgcacaaccgcgtgcagtcggcccttgcattccgcgtactccgcgt
tggatcgcatgattaaccgtctgatgtggatctggcgccgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
agcgatgccgaacgtaccgacgatgttatacgatcgggttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
tcttgcattccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
aatagttgcattccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
cttgcattccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
cttgcattccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
ataacagttataatcataacatactgttttcttactccacacaggcatagatgtctgttgcattccgcgtactccgcgt
ttatccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
ggtttactgttttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
cttgcattccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
tcaatgttgcattccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgt
ccaattacactgttttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
ttatccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
agcagaactacacaccaggccagggttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgtactccgcgt
ggtagaagaggcaataaggagagaacaccagcttgcattccgcgtactccgcgttgcattccgcgt
tgttagagtggagggttgcagccgcctagcattcatcagtgcccgagagctgcattccgcgtactccgcgt
50

10

20

30

40

50

10

20

30

40

acgagaggcaccctataatcgaaaatctgtggatgagggtggcttaccatgaaaagtatccataacttaccatctgaggaagaag
ctgggtggacagcaccgataaaaggcagacacctgaggctcatctatcgccctggctcatatgataaagtttagaggacacttctgatc
gaggggcgcacgtaatccgataattccgatgtggataaaactcttcaacttgtgcagacatataaccactgttcgaggagaat
cccataaacgcctctgggtggatgccaaggcttctgcggctgtcccaagtcacgcagactggagaatctgattgcccaa
ctgccaggagaaaagaagaacggcctgttggAACCTCATGCCCTGAGCCTGGCCTGACACCTAACTCAAGTCCAATTG
tctggcgaagatgctaaactccagcttcccaaggacacctatgacgatgtggacaacctgctcgacagataggcgaccag
tacggcgcattcttctggctgctaagaatctccgacgccattctgctgagcgacatactccggtaacactgagatcaccaaaag
cacctctgagcgccatgataaaacgctatgtatgaaacaccatcaagacacctgactctgctaaaggccctgtgaggcaacagctg
ccagagaagtacaaagagatattctcgaccagagcaagaatggatatgccggatacatcgatggcggagcatcacaggaagaa
tttacaagttcatcaaaccatcccgagaagatggacggacttgaagagctgtgtgaagctgaacaggaggacctgtgag
gaagcagaggaccttgataatggccattccacatcagatacacctggagagctgcatgcaatcccgccaggcaggag
ttctatccttcgtgaaggataaccgggagaagatagaagatgcctgcgttccattacgtggccctgtggtagag
gcaactccgcctcgctggatgaccagggaaatctgaggagacaatitactccgtgaacttcgaagaggctgtggataagggcga
agcgcccaacttcattcatgaaacggatgaccaatttcgataagaacctgccaacgagaaggctgtccaaacattcactccgt
cgatatttcaccgtctataacgactgactaaagtgaagtacgtgaccggaggcatgaggaagcctgccttcgtccggagac
agaagaaggctatcgatctgtctcaagactaatagaaaggtgacagtgaagcagctcaaggaggattacttaagaagatcg
aatgcttgactcagtgaaatcttgcgtggaggaccgccttaatgccagcctggcacttaccatgatctgtgaagataatcaa
agacaaagatttcctcgataatgaggagaacgaggacatccgtggagatctgtgtggacttccatgtttcgaggatagagaga
tgatcgaaagagcgccctgaaagacctatgcccattctgtttgacgataaaagtcatgaaacagctcaagcggcggcgtacactgggt
ggtagactctccaggaaactcataaacggcatcccgacaaacagagcggaaagaccatctgtggatttcctgaaatccgacgg
attcgctaacacggaaacttcattcatgaaactgattcacgtactctgtacattaaagaggacatccagaaggcacaggtagcgg
aggcgacagcctgcacgacatgccaacccctcgatcaccggcataaagaaggaaactgcagacagtcaaggtcg
tggacgaaactcgtaaagtgtatggcggcacaagccagagaatatcgatcgaaatggcaaggagaaccaaaccaccaga
agggccagaagaactctcgaaacggatgaaaagaatcgaaagaggaaattaaggagctggatctcagataactgaaggagcac
cctgtggagaatacacagctccagaacgagaaactctacctgtactacccctccagaacggcgggacatgtacgttgc
tcgacatcaaccggctgcccattatgacgtggaccatattgtccacagtccctcaaaagatgactccattgacaacaaggct
gaccagatccgataagaatcgccgtaaactgtgtacatgttccatcagaagagggtgtcaagaagatgaaacttgc
ctccctcaacgccaactgatcacccagcggaaatgtgacatctgactaaggcagaagaggaggtctgagcgaactcgacaag
gcccgtttaagaggcaactggcgtaaacacgcccagattaccaaacaacgtggcacaatctcgactctaggatgaaactaa
gtacgtgagaacgataagctgtacggaaatgtgataactctgtacatgttgcggacttccgaaaggacttcc
aattctacaaagttcgcaataacaattaccatcatgctcacgtccatctcaatgtgttgcaccggccctgtatcaagaa
ataccctaaactggagtcgtgagttcggtacggactataaagtctacgtgtgaggaaagatgatgatgaaactgtgag
caagatgtgtgaggatgatgatgaaactgtgagcaagat

10

20

30

40

50

ガイドRNA AASV1：配列番号：10

【表14】

ggggcgggcggtgcgtatgtcgt

5 プライマー：配列番号：11

【表15】

aggccacttctgctaattgg

3' プライマー：配列番号：1 2

【表 1 6】

gataccgtcggcggtggtg

10

20

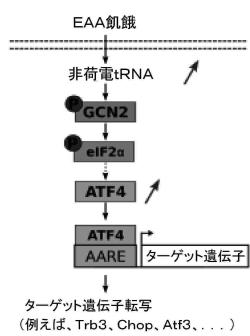
30

40

50

【図面】

【図 1】

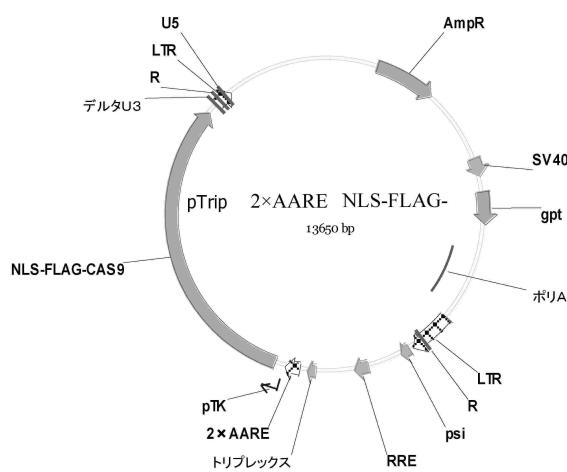


【図 2】

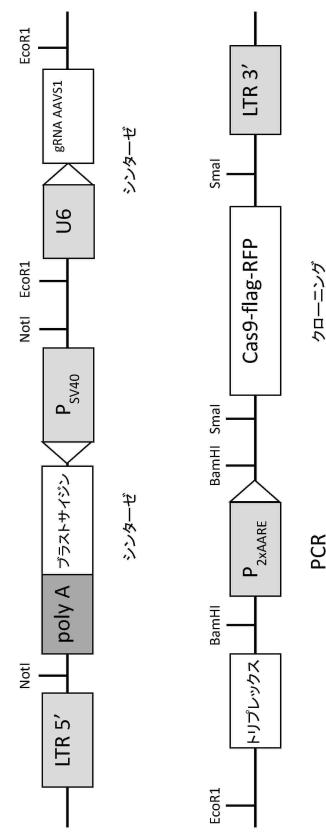


10

【図 3】



【図 4】



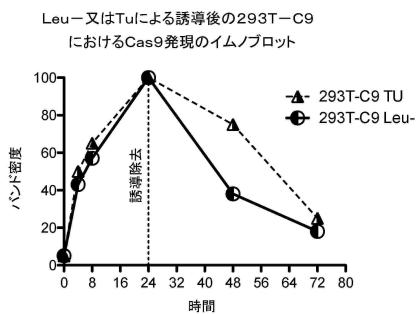
20

30

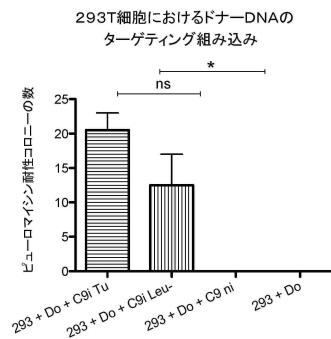
40

50

【図5】

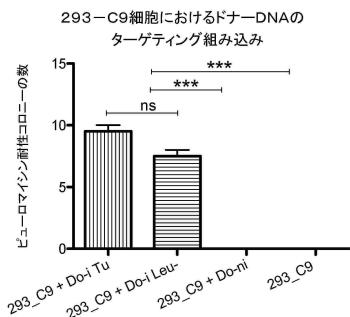


【図6】



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・ルシェルシュ・シャンティフィク
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
フランス国、75016 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、75006 パリ、リュ・ドゥ・レコール・ドゥ・メドウシーヌ 21

(73)特許権者 502124444

コミッサリア ア レネルジー アトミーク エ オ ゼネルジ ザルタナティヴ
フランス国 エフ-75015 パリ、バティマン ル ポナン、リュ ルブラン 25

(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、55

(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、75013 パリ、ブルヴァール・ドゥ・ロピタル 47、オピタル・ピティエ・サルペトリエール、バティマン・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7225; アンセルム・ユ975

(72)発明者 マル, ジャック

フランス国、75013 パリ、ブルヴァール・ドゥ・ロピタル 47、オピタル・ピティエ・サルペトリエール、バティマン・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7225; アンセルム・ユ975

(72)発明者 セルゲーラ, シエ

フランス国、92265 フォントネー - オー - ローズ、ルート・デュ・パノラマ 18、セエア・エマイエレセエエネ、アンセルム・ユエセ27

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2014/0322184 (U.S., A1)
国際公開第2015/089462 (WO, A1)
国際公開第2015/089465 (WO, A1)
SCIENCE SIGNALING, 2015年, VOL: 8, NR: 374 (RSS), PAGE(S): 1-10
NATURE CHEMICAL BIOLOGY, 2015年, Vol. 11, No. 3

, p. 198 - 200

NATURE BIOTECHNOLOGY, Vol. 33, No. 4, 2015年, p.
. 390 - 394

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

A61K

A61P

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamII)

Caplus / REGISTRY / MEDLINE / BIOSIS / EMBASE (ST
N)