

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】令和5年1月19日(2023.1.19)

【国際公開番号】WO2020/146290
 【公表番号】特表2022-516647(P2022-516647A)
 【公表日】令和4年3月1日(2022.3.1)
 【年通号数】公開公報(特許)2022-036
 【出願番号】特願2021-539465(P2021-539465)

【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 1 2 N 15/55(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 N 15/12(2006.01)

C 1 2 N 15/62(2006.01)

C 1 2 N 9/22(2006.01)

C 0 7 K 19/00(2006.01)

C 1 2 N 15/63(2006.01)

C 1 2 N 7/01(2006.01)

C 1 2 N 5/071(2010.01)

20

C 1 2 N 5/07(2010.01)

C 1 2 N 5/04(2006.01)

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0781(2010.01)

C 1 2 N 5/0784(2010.01)

C 1 2 N 5/0786(2010.01)

C 1 2 N 5/0787(2010.01)

C 1 2 N 5/0789(2010.01)

C 1 2 N 5/078(2010.01)

C 1 2 N 5/0775(2010.01)

30

C 1 2 N 5/077(2010.01)

C 1 2 N 15/85(2006.01)

A 6 1 P 7/06(2006.01)

A 6 1 K 48/00(2006.01)

A 6 1 K 38/46(2006.01)

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 Q 1/6851(2018.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/55 Z N A

40

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/62 Z

C 1 2 N 9/22

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 7/01

C 1 2 N 5/071

C 1 2 N 5/07

C 1 2 N 5/04

50

C 1 2 N 5 / 0 7 8 3
 C 1 2 N 5 / 0 7 8 1
 C 1 2 N 5 / 0 7 8 4
 C 1 2 N 5 / 0 7 8 6
 C 1 2 N 5 / 0 7 8 7
 C 1 2 N 5 / 0 7 8 9
 C 1 2 N 5 / 0 7 8
 C 1 2 N 5 / 0 7 7 5
 C 1 2 N 5 / 0 7 7
 C 1 2 N 1 5 / 8 5 Z
 A 6 1 P 7 / 0 6
 A 6 1 K 4 8 / 0 0
 A 6 1 K 3 8 / 4 6
 C 1 2 Q 1 / 6 8 6 Z
 C 1 2 Q 1 / 6 8 5 1 Z

10

【手続補正書】

【提出日】令和5年1月5日(2023.1.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

20

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1のベクターを複数の細胞に導入することを含む方法における使用のための、前記第1のベクターを含む組成物であって、前記第1のベクターが、エキソヌクレアーゼに融合したCas9ヌクレアーゼを含む融合タンパク質複合体をコードし；

前記ベクターを含む前記複数の細胞の生存率が、Cas9ヌクレアーゼをコードする第2のベクターを含む第2の複数の細胞の生存率の少なくとも1.5倍であり；

30

前記第2の複数の細胞が、前記第2のベクターをトランスフェクトしたK562細胞である、組成物。

【請求項2】

前記第1のベクターが、前記融合タンパク質複合体およびgRNAをコードする、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記エキソヌクレアーゼが、MRE11、EXO1、EXOIII、EXOVI、EXOT、DNA2、CtIP、TREX1、TREX2、Apollo、RecE、RecJ、T5、Lexo、RecBCDおよびMungbeanからなる群より選択される、請求項1に記載の組成物。

40

【請求項4】

ドナーポリヌクレオチドが前記複数の細胞に導入される、請求項2に記載の組成物。

【請求項5】

エキソヌクレアーゼに融合した前記Cas9により、遺伝子の異常遺伝子座に対して編集が行われる、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

前記ドナーポリヌクレオチドが、前記遺伝子の機能的遺伝子座をさらに含む組み込みカセットを含む、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

前記生存率が、レサズリンアッセイにより測定される、請求項1に記載の組成物。

50

【請求項 8】

前記エキソヌクレアーゼが Exo I である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記異常遺伝子座が H B B 遺伝子の異常遺伝子座である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記ドナーポリヌクレオチドが、前記 H B B 遺伝子の機能的遺伝子座をコードする、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記融合タンパク質複合体が、少なくとも 1 つの核局在化シグナル (N L S) をコードする、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 12】

前記融合タンパク質複合体をコードする前記第 1 のベクターが、配列番号 2 ~ 1 8 のいずれか 1 つと少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記第 1 のベクターが、エレクトロポレーションにより送達される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記ドナーポリヌクレオチドが、切断部位のすぐ 3 ' 末端に位置する変異プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) 配列を含み、前記変異 P A M 配列が 5 ' - N C G - 3 ' または 5 ' - N G C - 3 ' を含む、請求項 4 に記載の組成物。

20

【請求項 15】

前記融合タンパク質複合体が、前記変異 P A M 配列を切断することができない、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記ドナーポリヌクレオチドが一本鎖 D N A である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記ドナーポリヌクレオチドが二本鎖 D N A である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 18】

H D R を介して、前記エキソヌクレアーゼに融合した前記 C a s 9 により、前記編集が行われる、請求項 5 に記載の組成物。

30

【請求項 19】

前記複数の細胞が、被験体から得られた複数の初代細胞を含み、前記初代細胞が、T細胞、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、造血前駆細胞、造血幹細胞 (H S C)、赤血球、血液幹細胞、内胚葉幹細胞、内胚葉前駆細胞、内胚葉前駆体細胞、分化内胚葉細胞、間葉系幹細胞 (M S C)、間葉系前駆細胞、間葉系前駆体細胞、分化間葉系細胞、肝細胞前駆細胞、膵臓前駆細胞、肺前駆細胞、気管前駆細胞、骨細胞、軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞、間質細胞、線維芽細胞および真皮細胞を含む群より選択される、請求項 18 に記載の組成物。

40

【請求項 20】

前記複数の細胞が、前記編集が行われた後に、前記対象に再導入される、請求項 19 に記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0219

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0219】

本開示の好ましい実施形態が本明細書に示され記載されているが、このような実施形態はほんの一例として提供されていることは当業者には明らかである。本開示から逸脱せず

50

に、当業者は、多数の変形、変更および置換を想到する。本明細書に記載される実施形態の様々な代替が用いられ得ることを理解すべきである。以下の特許請求の範囲は本開示の範囲を規定し、これらの特許請求の範囲内の方法および構造ならびにそれらの均等物は、それによりカバーされることを意図する。

一実施形態において、例えば、以下の項目が提供される。

(項目1)

第1のベクターを複数の細胞に導入することを含む方法であって、前記第1のベクターが、エキソヌクレアーゼに融合したCas9ヌクレアーゼを含む融合タンパク質複合体をコードし；

前記ベクターを含む前記複数の細胞の生存率が、Cas9ヌクレアーゼをコードする第2のベクターを含む第2の複数の細胞の生存率の少なくとも1.5倍であり；

前記第2の複数の細胞が、前記第2のベクターをトランスフェクトしたK562細胞である、方法。

(項目2)

前記第1のベクターが、前記融合タンパク質複合体およびgRNAをコードする、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記エキソヌクレアーゼが、MRE11、EXO1、EXOIII、EXOVI、EXO7、DNA2、CtIP、TREX1、TREX2、Apollo、RecE、RecJ、T5、Lexo、RecBCDおよびMungbeanからなる群より選択される、項目1に記載の方法。

(項目4)

ドナーポリヌクレオチドが前記複数の細胞に導入される、項目2に記載の方法。

(項目5)

エキソヌクレアーゼに融合した前記Cas9により、遺伝子の異常遺伝子座に対して編集が行われる、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記ドナーポリヌクレオチドが、前記遺伝子の機能的遺伝子座をさらに含む組み込みカセットを含む、項目5に記載の方法。

(項目7)

前記生存率が、レサズリンアッセイにより測定される、項目1に記載の方法。

(項目8)

前記エキソヌクレアーゼがExoIである、項目3に記載の方法。

(項目9)

前記異常遺伝子座がHBB遺伝子の異常遺伝子座である、項目5に記載の方法。

(項目10)

前記ドナーポリヌクレオチドが、前記HBB遺伝子の機能的遺伝子座をコードする、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記融合タンパク質複合体が、少なくとも1つの核局在化シグナル(NLS)をコードする、項目1に記載の方法。

(項目12)

前記融合タンパク質複合体をコードする前記第1のベクターが、配列番号2~18のいずれかが1つと少なくとも80%の配列同一性を有する、項目1に記載の方法。

(項目13)

前記第1のベクターが、エレクトロポレーションにより送達される、項目1に記載の方法。

(項目14)

前記ドナーポリヌクレオチドが、切断部位のすぐ3'末端に位置する変異プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列を含み、前記変異PAM配列が5'-NCG-3'または5

10

20

30

40

50

' - N G C - 3 ' を含む、項目 4 に記載の方法。

(項目 1 5)

前記融合タンパク質複合体が、前記変異 P A M 配列を切断することができない、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記ドナーポリヌクレオチドが一本鎖 D N A である、項目 4 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記ドナーポリヌクレオチドが二本鎖 D N A である、項目 4 に記載の方法。

(項目 1 8)

第 1 の機能的断片と、C a s ヌクレアーゼを含む第 2 の機能的断片と、リンカーペプチドとを含むポリペプチドであって、 10

前記第 1 の機能的断片が前記リンカーペプチドの第 1 の末端にカップリングされ、前記第 2 の機能的断片が前記リンカーペプチドの第 2 の末端にカップリングされ；ならびに前記ポリペプチドおよびリボ核酸 (R N A) 分子を含む第 1 の複合体が第 1 の複数の細胞に投与される場合、前記第 1 の複数の細胞では、減少した毒性が、C a s 9 ヌクレアーゼおよび前記 R N A 分子を含む第 2 の複合体が第 2 の複数の細胞に投与される場合に前記第 2 の複数の細胞において観察される前記毒性と比較して観察される、ポリペプチド。

(項目 1 9)

前記第 1 の機能的断片がエキソヌクレアーゼを含み、前記エキソヌクレアーゼが、M R E 1 1、E X O 1、E X O I I I、E X O V I I、E X O T、D N A 2、C t I P、T R E X 1、T R E X 2、A p o 1 1 0、R e c E、R e c J、T 5、L e x o、R e c B C D および M u n g b e a n からなる群より選択される、項目 1 8 に記載のポリペプチド。 20

(項目 2 0)

前記 R N A 分子がガイド R N A 分子である、項目 1 9 に記載のポリペプチド。

(項目 2 1)

前記エキソヌクレアーゼがヒト E x o 1 酵素である、項目 1 9 に記載のポリペプチド。

(項目 2 2)

前記ヒト E x o 1 酵素の前記 N 末端が、前記 C a s ヌクレアーゼの前記 C 末端にカップリングした前記リンカーの前記 C 末端にカップリングされる、項目 2 1 に記載のポリペプチド。 30

(項目 2 3)

前記ヒト E x o 1 酵素が配列番号 1 を含む、項目 2 1 に記載のポリペプチド。

(項目 2 4)

前記ヒト E x o 1 酵素が、配列番号 1 の 8 0 % の配列同一性を有する断片を含む、項目 2 1 に記載のポリペプチド。

(項目 2 5)

前記ヒト E x o 1 酵素が、配列番号 1 の 9 0 % の配列同一性を有する断片を含む、項目 2 1 に記載のポリペプチド。

(項目 2 6)

前記ヒト E x o 1 酵素が、配列番号 1 の 9 5 % の配列同一性を有する断片を含む、項目 2 1 に記載のポリペプチド。 40

(項目 2 7)

前記第 2 の機能的断片が C a s 9 酵素を含む、項目 1 8 に記載のポリペプチド。

(項目 2 8)

前記 C a s 9 酵素が、N 末端核局在化配列 (N L S) および C 末端 N L S を含む、項目 2 7 に記載のポリペプチド。

(項目 2 9)

前記 C a s 9 酵素が N 末端核局在化配列 (N L S) を含む、項目 2 7 に記載のポリペプチド。

(項目 3 0)

前記 C a s 9 酵素が C 末端核局在化配列 (N L S) を含む、項目 2 7 に記載のポリペプチド。

(項目 3 1)

前記リンカーペプチドが、 F L 2 X、 S L A 2 X、 A P 5 X、 F L 1 X、 S L A 1 X からなる群より選択される、項目 1 8 ~ 3 0 のいずれかに記載のポリペプチド。

(項目 3 2)

前記リンカーペプチドが S L A 2 X である、項目 3 1 記載のポリペプチド。

(項目 3 3)

前記リンカーペプチドが 5 ~ 2 0 0 個のアミノ酸を含む、項目 3 1 のいずれかに記載のポリペプチド。

(項目 3 4)

前記減少した毒性が、レゾルフィン蓄積を測定することにより定量される、項目 1 8 に記載のポリペプチド。

(項目 3 5)

前記第 1 の複合体の投与後、前記第 1 の複数の細胞が、前記第 2 の複合体の投与後の前記第 2 の複数の細胞と比較して少なくとも 2 倍の数の生細胞を有し、生細胞の前記数が、レゾルフィンアッセイにより定量される、項目 3 4 に記載のポリペプチド。

(項目 3 6)

前記第 1 の複合体の投与後、細胞 H D R アッセイにより定量した場合に、前記第 1 の複数の細胞が、前記第 2 の複合体の投与後の前記第 2 の複数の細胞と比較して少なくとも 2 倍の量の H D R 編集細胞を有する、項目 3 4 に記載のポリペプチド。

(項目 3 7)

前記細胞 H D R アッセイが、 I H C、 q P C R またはディープシーケンシングを含む、項目 3 3 に記載のポリペプチド。

(項目 3 8)

項目 1 7 ~ 3 5 のいずれかに記載のポリペプチドおよび前記 R N A 分子をコードする、ポリヌクレオチド。

(項目 3 9)

前記リンカーペプチドの前記第 1 の末端が 3 ' 末端であり、前記リンカーペプチドの前記第 2 の末端が 5 ' 末端である、項目 3 8 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 4 0)

前記リンカーペプチドの前記第 1 の末端が 5 ' 末端であり、前記リンカーペプチドの前記第 2 の末端が 3 ' 末端である、項目 3 8 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 4 1)

前記 R N A 分子がガイド R N A (g R N A) である、項目 3 8 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 4 2)

相同組換え修復 (H D R) テンプレートをさらに含む、項目 3 8 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 4 3)

前記 g R N A が、表 2 に掲載されている配列から選択される、項目 3 8 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 4 4)

前記 H D R テンプレートが一本鎖 D N A である、項目 3 8 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 4 5)

前記 H D R テンプレートが二本鎖 D N A である、項目 3 8 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 4 6)

前記ポリヌクレオチドがリボソーム中に製剤化される、項目 3 8 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 4 7)

10

20

30

40

50

前記リボソームが、ポリエチレングリコール（PEG）、細胞透過性ペプチド、リガンド、アプタマー、抗体またはそれらの組み合わせを含む、項目46に記載のポリヌクレオチド。

（項目48）

項目38に記載のヌクレオチド配列を含む、ベクター。

（項目49）

プロモーターを含む、項目48に記載のベクター。

（項目50）

前記プロモーターがCMVまたはCAGプロモーターである、項目49に記載のベクター。

（項目51）

レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群より選択される、項目48～50のいずれかに記載のベクター。

（項目52）

アデノ随伴ウイルスベクターである、項目51に記載のベクター。

（項目53）

項目48～50のいずれかに記載のベクターを含む、ウイルス様粒子（VLP）。

（項目54）

適合医薬賦形剤中に製剤化された項目18～41のいずれかに記載のポリペプチドと、投与指示を含む挿入物と、試薬とを含む、キット。

（項目55）

適合医薬賦形剤中に製剤化された項目38に記載のポリヌクレオチドと、投与指示を含む挿入物と、試薬とを含む、キット。

（項目56）

適合医薬賦形剤中に製剤化された項目48～52のいずれかに記載のベクターと、投与指示を含む挿入物と、試薬とを含む、キット。

（項目57）

細胞においてDNAの相同組換えを誘導するための方法であって、前記DNAを項目18～35のいずれかに記載のポリペプチドと接触させることを含む、方法。

（項目58）

インビトロまたはエキスピボで細胞においてHDRを誘導するための方法であって、項目38に記載のポリヌクレオチドを細胞に送達することを含む、方法。

（項目59）

前記細胞が、ヒト細胞、非ヒト哺乳動物細胞、幹細胞、非哺乳動物細胞、無脊椎動物細胞、植物細胞または単一の真核生物である、項目57～58のいずれかに記載の方法。

（項目60）

第1の複数の細胞を項目18に記載のポリヌクレオチドと接触させ、第2の複数の細胞を、野生型Cas9酵素をコードする第2のポリヌクレオチドと接触させること；ならびに前記第1の複数の細胞および前記第2の複数の細胞において、目的の遺伝子座で部位特異的切断を誘導し、続いてHDRを誘導すること；ならびに

前記第1の複数の細胞において、前記第2の複数の細胞と比較して少なくとも30～90%多くの細胞を回収すること

を含む、方法。

（項目61）

前記第1の複数の細胞および前記第2の複数の細胞において産生されたレゾルフィンの量を測定することにより、細胞生存率を測定することをさらに含む、項目60に記載の方法

。

（項目62）

前記第1の複数の細胞が、レゾルフィンアッセイにより定量した場合に、前記第2の複数の

10

20

30

40

50

の細胞と比較して2～5倍の量の生細胞を有する、項目61に記載の方法。

(項目63)

前記第1の複数の細胞および前記第2の複数の細胞が、ヒト細胞、非ヒト哺乳動物細胞、幹細胞、非哺乳動物細胞、無脊椎動物細胞、植物細胞または単一の真核生物を含む、項目60～62のいずれかに記載の方法。

(項目64)

前記ヒト細胞が、T細胞、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、造血前駆細胞、造血幹細胞(HSC)、赤血球、血液幹細胞、内胚葉幹細胞、内胚葉前駆細胞、内胚葉前駆体細胞、分化内胚葉細胞、間葉系幹細胞(MSC)、間葉系前駆細胞、間葉系前駆体細胞または分化間葉系細胞である、項目63に記載の方法。

10

(項目65)

前記分化内胚葉細胞が、肝細胞前駆細胞、膵臓前駆細胞、肺前駆細胞または気管前駆細胞である、項目64に記載の方法。

(項目66)

前記分化間葉系細胞が、骨細胞、軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞、間質細胞、線維芽細胞または真皮細胞である、項目64に記載の方法。

(項目67)

被験体における単一遺伝子障害を処置するための方法であって、

前記被験体から得られた複数の初代細胞を培養すること；

20

項目4.2に記載のポリヌクレオチドを前記複数の初代細胞に投与すること(ここで、前記gRNAは、前記障害を引き起こす前記遺伝子の遺伝子座を認識するように構成され、前記HDRテンプレートは、前記遺伝子の機能配列を提供するように構成される)；および

前記遺伝子座で部位特異的切断を誘導し、続いてHDRを誘導すること(ここで、前記遺伝子の前記機能配列は前記遺伝子座に挿入される)

を含む、方法。

(項目68)

前記遺伝子の前記機能配列が前記遺伝子座に挿入された初代細胞を選択すること；および

前記選択した初代細胞を前記被験体に再導入すること

30

をさらに含む、項目67に記載の方法。

(項目69)

前記被験体が哺乳動物である、項目67または項目68のいずれかに記載の方法。

(項目70)

前記哺乳動物がヒトである、項目69に記載の方法。

(項目71)

前記複数の初代細胞が、T細胞、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、造血前駆細胞、造血幹細胞(HSC)、赤血球、血液幹細胞、内胚葉幹細胞、内胚葉前駆細胞、内胚葉前駆体細胞、分化内胚葉細胞、間葉系幹細胞(MSC)、間葉系前駆細胞、間葉系前駆体細胞、分化間葉系細胞、肝細胞前駆細胞、膵臓前駆細胞、肺前駆細胞、気管前駆細胞、骨細胞、軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞、間質細胞、線維芽細胞および真皮細胞を含む群より選択される、項目67に記載の方法。

40

(項目72)

前記単一遺伝子障害を引き起こす前記遺伝子が表3から選択される、項目67に記載の方法。

(項目73)

被験体における異常HBB遺伝子により引き起こされる鎌状赤血球貧血を処置するための方法であって、

前記被験体から得られた複数の初代細胞を培養すること；

50

項目 4 2 に記載のポリヌクレオチドを前記複数の初代細胞に投与すること（ここで、前記 g R N A は、前記障害を引き起こす前記 H B B 遺伝子の遺伝子座を認識するように構成され、前記 H D R テンプレートは、前記 H B B 遺伝子の機能配列を提供するように構成される）；および

前記遺伝子座で部位特異的切断を誘導し、続いて H D R を誘導すること（ここで、前記 H B B 遺伝子の前記機能配列は前記遺伝子座に挿入される）を含む、方法。

（項目 7 4）

前記 H B B 遺伝子の前記機能配列が前記遺伝子座に挿入された初代細胞を選択すること；および

前記選択した初代細胞を前記被験体に再導入すること
をさらに含む、項目 7 3 に記載の方法。

（項目 7 5）

前記被験体が哺乳動物である、項目 7 3 または項目 7 4 のいずれかに記載の方法。

（項目 7 6）

前記哺乳動物がヒトである、項目 7 5 に記載の方法。

（項目 7 7）

前記初代細胞が造血幹細胞である、項目 7 3 または項目 7 4 のいずれかに記載の方法。

（項目 7 8）

前記初代細胞が C D 3 4 + 造血幹細胞である、項目 7 3 に記載の方法。

（項目 7 9）

前記初代細胞が C D 3 4 + 造血幹細胞である、項目 7 4 に記載の方法。

（項目 8 0）

プラスミド P X 3 3 0 である、項目 4 8 に記載のベクター。

（項目 8 1）

前記細胞が C D 3 4 + 造血幹細胞である、項目 5 8 に記載の方法。

（項目 8 2）

被験体における異常 H B B 遺伝子により引き起こされる鎌状赤血球貧血を処置するための方法であって、

前記被験体から得られた複数の初代細胞を培養すること；

項目 2 2 に記載のポリヌクレオチドを前記複数の初代細胞に投与すること（ここで、前記 g R N A は、前記障害を引き起こす前記 H B B 遺伝子の遺伝子座を認識するように構成され、前記 H D R テンプレートは、前記 H B B 遺伝子の機能配列を提供するように構成される）；および

前記遺伝子座で部位特異的切断を誘導し、続いて H D R を誘導すること（ここで、前記 H B B 遺伝子の前記機能配列は前記遺伝子座に挿入される）を含む、方法。

（項目 8 3）

前記 H B B 遺伝子の前記機能配列が前記遺伝子座に挿入された初代細胞を選択すること；および

前記選択した初代細胞を前記被験体に再導入すること
をさらに含む、項目 8 2 に記載の方法。

（項目 8 4）

前記被験体が哺乳動物である、項目 8 2 または項目 8 3 のいずれかに記載の方法。

（項目 8 5）

前記哺乳動物がヒトである、項目 8 4 に記載の方法。

（項目 8 6）

前記初代細胞が C D 3 4 + 造血幹細胞である、項目 8 2 または項目 8 3 に記載の方法。

（項目 8 7）

第 1 の複数の細胞を、項目 1 8 に記載の前記ポリヌクレオチドおよび R N A 分子を含む第

10

20

30

40

50

1の複合体と接触させること；

前記第1の複数の細胞において部位特異的切断を誘導し、続いてHDRを誘導することを含む方法であって、

細胞HDRアッセイにより定量された、前記第1の複数の細胞のうちのHDRにより編集された細胞のパーセンテージが、第2の複数の細胞のうちの野生型Cas9酵素および前記RNA分子をコードするポリヌクレオチドを含む第2の複合体と接触された細胞のパーセンテージと比較して少なくとも2倍高い、方法。

(項目88)

前記細胞HDRアッセイがIHCを含む、項目84に記載の方法。

(項目89)

前記細胞HDRアッセイがqPCRを含む、項目84に記載の方法。

(項目90)

前記細胞HDRアッセイが核酸シーケンシングを含む、項目84に記載の方法。

10

20

30

40

50