

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-532784
(P2024-532784A)

(43)公表日 令和6年9月10日(2024.9.10)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 9/14 (2006.01)	C 1 2 N 9/14 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全73頁)

(21)出願番号	特願2024-508548(P2024-508548)	(71)出願人	521476126 エメンドバイオ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、デラウェア州 1 9 8 0 5、ウィルミントン、センター・ロー ド 1 0 1 3、スイート 4 0 3－ビー
(86)(22)出願日	令和4年8月12日(2022.8.12)	(74)代理人	110003708 弁理士法人鈴榮特許総合事務所
(85)翻訳文提出日	令和6年4月9日(2024.4.9)	(72)発明者	イザール、リオル イスラエル国、6 9 1 0 4 1 4 テルア ビブ、バルト・ストリート 8
(86)国際出願番号	PCT/US2022/074941	(72)発明者	マールバッハ・バール、ナダブ イスラエル国、7 6 4 6 6 レホボト、 ハケレム 9 / 1 4
(87)国際公開番号	WO2023/019269	(72)発明者	ロッカー、リアット イスラエル国、7 5 2 5 9 4 1 リシヨ
(87)国際公開日	令和5年2月16日(2023.2.16)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	63/232,723		
(32)優先日	令和3年8月13日(2021.8.13)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 新規なOMNI－115、124、127、144～149、159、218、237、
248、251～253及び259CRISPRヌクレアーゼ

(57)【要約】

この発明は、配列番号1～17からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する配列を含むCRISPRヌクレアーゼ、又は当該CRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子を含む、非天然組成物を提供する。

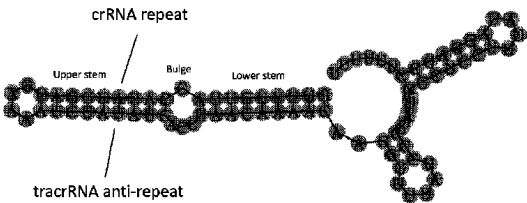


Fig. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 3、1 又は 2～17 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含む CRISPR ヌクレアーゼ、又は前記 CRISPR ヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子を含む、非天然組成物。

【請求項 2】

1 以上の RNA 分子、又は前記 1 以上の RNA 分子のいずれか 1 つをコードする DNA ポリヌクレオチドを更に含み、ここで、前記 1 以上の RNA 分子と前記 CRISPR ヌクレアーゼは天然では同時に存在せず、並びに、前記 1 以上の RNA 分子は前記 CRISPR ヌクレアーゼと複合体を形成するように構成され、及び／又は、前記 1 以上の RNA 分子は前記複合体を標的部

10

【請求項 3】

前記 CRISPR ヌクレアーゼは、配列番号 3 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、配列番号 82～97 からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記 CRISPR ヌクレアーゼは、配列番号 3 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 82～85 及び 96 からなる群から選択される配列を含む CRISPR RNA (crRNA) 分子である、請求項 3 に記載の組成物。

20

【請求項 5】

配列番号 86～93 及び 97 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含み、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 CRISPR ヌクレアーゼは、配列番号 3 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 82～97 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (sgRNA) 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 CRISPR ヌクレアーゼは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、配列番号 52～64 からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の組成物。

30

【請求項 8】

前記 CRISPR ヌクレアーゼは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 52～55 からなる群から選択される配列を含む CRISPR RNA (crRNA) 分子である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

配列番号 56～63 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含み、請求項 8 に記載の組成物。

40

【請求項 10】

前記 CRISPR ヌクレアーゼは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 52～64 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (sgRNA) 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記 CRISPR ヌクレアーゼは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、配列番号 65～81 からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 12】

50

前記 C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 65～68 及び 80 からなる群から選択される配列を含む C R I S P R RNA (c r RNA) 分子である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

配列番号 69～77 及び 81 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 C R I S P R RNA (t r a c r RNA) 分子を更に含む、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記 C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 65～81 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (s g RNA) 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記 C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号 4～9 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1つの RNA 分子は、配列番号 98～114 からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号 4～9 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 98～101 及び 114 からなる群から選択される配列を含む C R I S P R RNA (c r RNA) 分子である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

配列番号 102～111 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 C R I S P R RNA (t r a c r RNA) 分子を更に含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記 C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号 4～9 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 98～114 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (s g RNA) 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記 C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号 10 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1つの RNA 分子は、配列番号 115～127 からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記 C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号 10 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 115～118 からなる群から選択される配列を含む C R I S P R RNA (c r RNA) 分子である、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

配列番号 119～126 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 C R I S P R RNA (t r a c r RNA) 分子を更に含む、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記 C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号 10 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 115～127 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (s g RNA) 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 23】

前記 C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号 11 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1つの RNA 分子は、配列番号 128～141 からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記 CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 11 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 128 ～ 131 からなる群から選択される配列を含む CRISPR RNA (crRNA) 分子である、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

配列番号 132 ～ 140 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記 CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 11 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 128 ～ 141 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (sgRNA) 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

10

【請求項 27】

前記 CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 12 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、配列番号 142 ～ 155 からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記 CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 12 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 142 ～ 145 からなる群から選択される配列を含む CRISPR RNA (crRNA) 分子である、請求項 27 に記載の組成物。

20

【請求項 29】

配列番号 146 ～ 152 及び 155 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記 CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 12 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 142 ～ 155 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (sgRNA) 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

30

【請求項 31】

前記 CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 13 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、配列番号 156 ～ 167 及び GC UUUAAGC からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記 CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 13 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 156 ～ 159 からなる群から選択される配列を含む CRISPR RNA (crRNA) 分子である、請求項 31 に記載の組成物。

40

【請求項 33】

配列番号 160 ～ 166 及び GC UUUAAGC からなる群に示す配列を含むトランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

前記 CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 13 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 156 ～ 167 及び GC UUUAAGC からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (sgRNA) 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 35】

50

前記 C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 4 又は 1 5 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの R N A 分子は、配列番号 1 6 8 ～ 1 7 6 からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 4 又は 1 5 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの R N A 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 1 6 8 及び 1 6 9 からなる群から選択される配列を含む C R I S P R R N A (c r R N A) 分子である、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

配列番号 1 7 0 ～ 1 7 5 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 C R I S P R R N A (t r a c r R N A) 分子を更に含む、請求項 3 6 に記載の組成物。

10

【請求項 3 8】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 4 又は 1 5 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの R N A 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 1 6 8 ～ 1 7 6 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド R N A (s g R N A) 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 6 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの R N A 分子は、配列番号 1 7 7 ～ 1 8 5 からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の組成物。

20

【請求項 4 0】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 6 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの R N A 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 1 7 7 及び 1 7 8 からなる群から選択される配列を含む C R I S P R R N A (c r R N A) 分子である、請求項 3 9 に記載の組成物。

【請求項 4 1】

配列番号 1 7 9 ～ 1 8 4 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 C R I S P R R N A (t r a c r R N A) 分子を更に含む、請求項 4 0 に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 6 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの R N A 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 1 7 7 ～ 1 8 5 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド R N A (s g R N A) 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

30

【請求項 4 3】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 7 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの R N A 分子は、配列番号 1 8 6 ～ 2 0 2 からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 7 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの R N A 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 1 8 6 ～ 1 8 9 及び 2 0 1 からなる群から選択される配列を含む C R I S P R R N A (c r R N A) 分子である、請求項 4 3 に記載の組成物。

40

【請求項 4 5】

配列番号 1 9 0 ～ 1 9 8 及び 2 0 2 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 C R I S P R R N A (t r a c r R N A) 分子を更に含む、請求項 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 7 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの R N A 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 1 8 6 ～ 2 0 2 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド R N A (s g R N A) 分子である、請求項 2 に記載の組成物。

50

【請求項 47】

前記CRISPRヌクレアーゼは、表1の列5に示した位置のCRISPRヌクレアーゼのアミノ酸置換によって作成した不活性化RuvCドメインを有するニッカーゼである、請求項1～46のいずれか一項の組成物。

【請求項 48】

前記CRISPRヌクレアーゼは、表1の列6に示した位置のCRISPRヌクレアーゼのアミノ酸置換によって作成した不活性化HNHドメインを有するニッカーゼである、請求項1～46のいずれか一項の組成物。

【請求項 49】

前記CRISPRヌクレアーゼは、表1の列7に示した位置のCRISPRヌクレアーゼの置換によって作成した不活性化RuvCドメイン及び不活性化HNHドメインを有する触媒活性のないヌクレアーゼである、請求項1～46のいずれか一項の組成物。

【請求項 50】

前記CRISPRヌクレアーゼは、表3の列2～4のCRISPRヌクレアーゼについて示したプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列を利用する、請求項1～49のいずれか一項の組成物。

【請求項 51】

請求項2～50のいずれか一項の組成物を細胞に導入することを含む、無細胞系で又は細胞のゲノム内で、DNA標的部位のヌクレオチド配列を改変する方法。

【請求項 52】

前記CRISPRヌクレアーゼは、表3の列2～4に示したCRISPRヌクレアーゼのプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に隣接するDNA鎖を切断し、及び／若しくは前記PAM配列に相補的な配列に隣接するDNA鎖を切断する、請求項51に記載の方法。

【請求項 53】

前記CRISPRヌクレアーゼは、表1の列5に示した位置のCRISPRヌクレアーゼのアミノ酸置換によって作成した不活性化RuvCドメインを有するニッカーゼであり、前記PAM配列に相補的な配列に隣接するDNA鎖を切断する、請求項51に記載の方法。

【請求項 54】

前記CRISPRヌクレアーゼは、表1の列6に示した位置のCRISPRヌクレアーゼのアミノ酸置換によって作成した不活性化HNHドメインを有するニッカーゼであり、前記PAM配列に隣接するDNA鎖を切断する、請求項51に記載の方法。

【請求項 55】

前記細胞は真核細胞又は原核細胞である、請求項51～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

前記細胞は哺乳動物細胞である、請求項55に記載の方法。

【請求項 57】

前記細胞はヒト細胞である、請求項56に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、米国仮出願第63/232,723号(出願日:2021年8月13日)の優先権を主張し、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

この出願全体で、カッコ内のものを含め、さまざまな刊行物を参照する。この出願で言及する全ての刊行物の開示全体は、本発明で利用できる技術及び本発明が関係する技術を補足するために、参照によりこの出願に組み込まれる。

【0003】

配列表の参照

この出願は、MS-Windows（登録商標）と互換性を有するオペレーティングシステムを使用するIBM-PC機形式で2022年8月12日に作成され、この出願の一部として2022年8月12日に提出した、サイズが575KBのXMLファイルであって、ファイル名が「210812_91769-A-PCT_Sequence_Listing_AWG.xml」中のヌクレオチド配列を参照により組み込む。

【0004】

技術分野

本発明は、とりわけ、ゲノム編集のための組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0005】

細菌及び古細菌の適応免疫における、クラスター化され規則的に間隔が空いた短いパ lindローム反復（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat、CRISPR）系は、タンパク質組成とゲノム遺伝子座構造の極端な多様性を示す。CRISPR系は、研究及びゲノム工学の重要なツールとなった。それにもかかわらず、CRISPR系の詳細の多くは不明であり、CRISPRヌクレアーゼの適用は、配列特異性、発現又は送達によって制限される可能性がある。異なるCRISPRヌクレアーゼには、サイズ、PAMサイト、オンターゲット活性、特異性、切断パターン（例、平滑末端、付着末端）及び切断後のインデル形成の顕著なパターンなどの多様な特徴がある。さまざまな特性の組合せがさまざまな用途に役立つ可能性がある。例えば、一部のCRISPRヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座を標的とすることが可能であるが、別の群のCRISPRヌクレアーゼは、PAMサイトの制限のために不可能である。さらに、現在使用されている一部のCRISPRヌクレアーゼは前免疫（pre-immunity）を示し、in vivoでの適用性が制限される可能性がある。Charlesworth et al., Nature Medicine (2019)及びWagner et al., Nature Medicine (2019)を参照。したがって、新規なCRISPRヌクレアーゼの発見、実用化及び改良が重要である。

【発明の概要】

【0006】

この明細書は、ゲノム工学、エピゲノム工学、ゲノムターゲティング、細胞のゲノム編集及び／又はin vitro診断に利用できる組成物及び方法を開示する。

【0007】

開示した組成物は、ゲノムDNA配列の改変に利用してもよい。この明細書では、ゲノムDNAは、対象とする細胞又は細胞群に存在する、直鎖状及び／若しくは染色体DNA並びに／又はプラスミド若しくは他の染色体外DNAの配列を指す。いくつかの態様では、対象とする細胞は真核細胞である。いくつかの態様では、対象とする細胞は原核細胞である。いくつかの態様では、この方法は、ゲノムDNA配列の所定の標的部位において二本鎖切断（DSB）を引き起こし、ゲノムの標的部位においてDNA配列の変異、挿入及び／又は欠失をもたらす。

【0008】

したがって、いくつかの態様では、組成物は、クラスター化され規則的に間隔が空いた短いパ lindローム反復（CRISPR）ヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼはCRISPR関連タンパク質である。

【0009】

OMNI CRISPRヌクレアーゼ

本発明は、表1に示す「OMNI」ヌクレアーゼと呼ぶCRISPRヌクレアーゼを提供する。

【0010】

この発明は、(i) 配列番号1～17からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するCRISPRヌクレアーゼを含む組成物、又は、配列番号18～51からなる群から選択される核酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有

10

20

30

40

50

するCRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子、及び、(ii) DNAターゲティングRNA分子、又は、標的DNAの配列に相補的なヌクレオチド配列を含むDNAターゲティングRNA分子をコードするDNAポリヌクレオチドを、細胞に導入することを含む、哺乳動物細胞のゲノム中の標的部位でヌクレオチド配列を改変する方法を提供する。

【0011】

この発明は、

a) 直接の反復配列と連結した、標的配列とハイブリダイズできる、ガイド配列部分を含む1つ以上のRNA分子、又は、前記1つ以上のRNA分子をコードする1つ以上のヌクレオチド配列；及び

10

b) 配列番号1～17からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCRISPRヌクレアーゼ、又は、前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子；

を含むCRISPR関連系を含む非天然組成物も提供し、

ここで、前記1つ以上のRNA分子は前記標的配列にハイブリダイズし、前記標的配列は、プロト Spacer 隣接モチーフ (PAM) の相補配列の3'末端に隣接し、前記1つ以上のRNA分子は前記CRISPRヌクレアーゼと複合体を形成する。

【0012】

この発明は、

a) 配列番号1～17からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する配列を含むCRISPRヌクレアーゼ、又は、前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子；並びに

20

b) i) 前記CRISPRヌクレアーゼと相互作用／結合できるヌクレアーゼ結合RNAのヌクレオチド配列；及び

ii) 標的DNA配列中の配列に相補的な配列を含むDNAターゲティングRNAのヌクレオチド配列、

の少なくとも1つを含む、1つ以上のRNA分子、又は、前記1つ以上のRNA分子をコードする1つ以上のDNAポリヌクレオチド、

を含む非天然組成物も提供し、

前記CRISPRヌクレアーゼは、前記1つ以上のRNA分子と複合体を形成して、前記標的DNA配列とハイブリダイズできる複合体を形成できる。

30

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】図1A～図1Dは、sgRNA__127、sgRNA__237及びsgRNA__259からのシングルガイドRNA (sgRNA) (crRNA-tracrRNA) 分子の予測される二次構造を示す。図1Aは、OMNI-127のcrRNA-tracrRNAデュプレックスを、sgRNAのcrRNA部分及びtracrRNA部分とともに示す。

【図1B】図1Bは、OMNI-237用のsgRNAのV1の例を示す。

【図1C】図1Cは、OMNI-114用のsgRNAのV2の例を示す。

40

【図1D】図1Dは、OMNI-259用のsgRNAのV1の例を示す (表2)。

【図1E】図1Eは、OMNI-127用のsgRNAのV1の例を示す (表2)。

【図2】図2～18は、OMNIヌクレアーゼのin vitroのTXTL PAM枯渇の結果を示す。PAMロゴは欠損部位の割合を模式的に表したものである (上パネル)。TXTL反応のNGS後に、PAMプラスミドライブラリーからの特定のPAM配列 (下のパネル、右) の枯渇率 (下のパネル、左) を計算した。各OMNIについての計算は、PAMライブラリーの8塩基対の配列に沿った4Nウィンドウに基づく。試験を行ったOMNIに必要とされるPAMと、この反応条件でのヌクレアーゼ活性のレベルは、枯渇率から推測される。OMNI-115についてのin vitroのPAM枯渇結果を図2～18に示す。

【図3】図3は、OMNI-124についての結果である。

50

【図 4】図 4 は、OMNI-127 についての結果である。

【図 5】図 5 は、OMNI-144 についての結果である。

【図 6】図 6 は、OMNI-145 についての結果である。

【図 7】図 7 は、OMNI-146 についての結果である。

【図 8】図 8 は、OMNI-147 についての結果である。

【図 9】図 9 は、OMNI-148 についての結果である。

【図 10】図 10 は、OMNI-149 についての結果である。

【図 11】図 11 は、OMNI-159 についての結果である。

【図 12】図 12 は、OMNI-218 についての結果である。

【図 13】図 13 は、OMNI-237 についての結果である。

【図 14】図 14 は、OMNI-248 についての結果である。

【図 15】図 15 は、OMNI-251 についての結果である。

【図 16】図 16 は、OMNI-252 についての結果である。

【図 17】図 17 は、OMNI-253 についての結果である。

【図 18】図 18 は、OMNI-259 についての結果である。

【図 19 A】図 19 A～19 C に、U2OS 細胞における RNP 複合体の一部としての OMNI-127 の活性とスペーサーの最適化を示す。OMNI-127 ヌクレアーゼを過剰発現させて、精製した。精製されたタンパク質を合成した sgRNA と複合化して RNP を形成させた。図 19 A では、in vitro アッセイでは、ELANE 標的化 g135 ガイド（表 6 に列挙）を有する漸減量の RNP（4、2、1 及び 0.5 pmol）を、ELANE DNA 標的テンプレート 40 ng と共にインキュベートした。活性は、線状のテンプレートを切断する RNP の能力によって確認した。

【図 19 B】図 19 B～19 C では、in vivo アッセイでは、ELANE 標的化 g135 及び g136 ガイドのさまざまなスペーサー長（20～24 ヌクレオチド）の RNP を U2OS 細胞にエレクトロポレーションし、インデル形成に基づき、次世代シーケンシング（NGS）で編集レベルを測定した。

【図 19 C】図 19 C は、U2OS 細胞における RNP 複合体の一部としての OMNI-127 の活性アッセイ結果を示す：ELANE g134、g135 及び g136（スペーサー長 22 bp、表 6）を有する RNP を U2OS 細胞株にエレクトロポレーションし、編集レベル（インデル）を NGS で測定した。

【発明を実施するための形態】

【0014】

詳細な説明

本発明のいくつかの側面では、開示した組成物は、クラスター化され規則的に間隔が空いた短いパンドローム反復（CRISPR）ヌクレアーゼ及び／又はそれをコードする配列を含む核酸分子を含む。

【0015】

表 1 は、新規の CRISPR ヌクレアーゼ、及び、ヌクレアーゼをニッカーゼ又は触媒活性のないヌクレアーゼに変換する各ヌクレアーゼ内の 1 か所以上の置換の位置を示す。例えば、本発明の CRISPR ヌクレアーゼの触媒部位は、ヌクレアーゼがニッカーゼ活性を有し、一本鎖 DNA を切断できるように改変してもよい。あるいは、本発明の CRISPR ヌクレアーゼの触媒部位は、ヌクレアーゼがヌクレアーゼ活性を有さない、すなわち触媒活性のないヌクレアーゼとなるように改変してもよい。明細書全体で、CRISPR ヌクレアーゼについて言及しているが、これらのヌクレアーゼは、ニッカーゼ活性を有するように（つまり、二本鎖 DNA を切断するのではなく一本鎖を切断するヌクレアーゼ）、又はヌクレアーゼ活性を有さないように（つまり、触媒活性のないヌクレアーゼ）改変してもよい。

【0016】

表 2 は、crRNA、tracrRNA 及びシングルガイド RNA（sgRNA）配列、並びに、各 CRISPR ヌクレアーゼと互換性のある crRNA、tracrRNA 及

10

20

30

40

50

び s g R N A 配列の一部を示す。したがって、c r R N A : t r a c r R N A 複合体の一部として表 2 に示す O M N I ヌクレアーゼに結合し標的化できる c r R N A 分子は、表 2 に示す c r R N A 配列を含んでいてもよい。同様に、c r R N A : t r a c r R N A 複合体の一部として表 2 に示す O M N I ヌクレアーゼに結合し標的化できる t r a c r R N A 分子は、表 2 に示す t r a c r R N A 配列を含んでいてもよい。また、表 2 に示す O M N I ヌクレアーゼに結合し標的化できるシングルガイド R N A 分子は、表 2 に示す配列を含んでいてもよい。

【0017】

例えば、O M N I - 1 1 5 ヌクレアーゼ（配列番号 1）の c r R N A 分子は、配列番号 5 2 ~ 5 5 で示す配列を含んでいてもよく；O M N I - 1 1 5 ヌクレアーゼの t r a c r R N A 分子は、配列番号 5 6 ~ 6 3 のいずれか 1 つに示す配列を含んでいてもよく；そして、O M N I - 1 1 5 ヌクレアーゼの s g R N A 分子は、配列番号 5 2 ~ 6 4 のいずれか 1 つに示す配列を含んでいてもよい。各 O M N I ヌクレアーゼの他の c r R N A 分子、t r a c r R N A 分子又は s g R N A 分子は、表 2 に示した配列から同じ方法で誘導できる。

10

【0018】

これらのヌクレアーゼのいずれか 1 つは、ガイド R N A 分子を介して所望の D N A 標的配列を標的とすることができる。ヌクレアーゼーガイド複合体は、また、複合体に結合した分子を標的部位に運ぶ。したがって、この開示は、C R I S P R ヌクレアーゼ及び D N A 改変ドメイン（例、デアミナーゼ、ヌクレアーゼ、ニッカーゼ、リコンビナーゼ、メチルトランスフェラーゼ、メチラーゼ、アセチラーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、転写活性化因子又は転写抑制因子ドメイン）を含む融合タンパク質、並びに疾患に関連するゲノム（例、ヒト対象のゲノム）中の変異を修正し、又はゲノム（例、ヒトゲノム）中に変異を生成して、遺伝子の発現を減少させるか防止する融合タンパク質の使用も予定している。

20

【0019】

いくつかの態様では、本願の C R I S P R ヌクレアーゼは、酵素活性を有するタンパク質と融合してもよい。いくつかの態様では、酵素活性は標的 D N A を改変する。いくつかの態様では、酵素活性は、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、D N A 修復活性、D N A 損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスボザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性又はグリコシラーゼ活性である。場合によって、酵素活性はヌクレアーゼ活性である。場合によって、ヌクレアーゼ活性は、標的 D N A を二本鎖切断する。場合によって、酵素活性は、標的 D N A に関連する標的ポリペプチドを改変する。場合によって、酵素活性は、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、S U M O 化活性、脱 S U M O 化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性又は脱ミリストイル化活性である。場合によって、標的ポリペプチドがヒストンで、酵素活性がメチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性又は脱ユビキチン化活性である。

30

40

【0020】

したがって、C R I S P R ヌクレアーゼ、ニッカーゼ又は触媒活性のないヌクレアーゼのいずれか 1 つは、デアミナーゼ、逆転写酵素（例、プライム編集における使用は Anzalone et al. (2019) を参照）、D N A のメチル化状態を改変する酵素（例、メチルトランスフェラーゼ）又はヒストンの修飾因子（例、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ）などの塩基エディターを含むがこれらには限定されない、別の D N A 調節酵素又は D N A 改変酵素と（例えば、直接又はリンカーを介して）融合してもよい。実際に、本願の O

50

M N I - 5 0 ヌクレアーゼ、ニッカーゼ、不活性ヌクレアーゼは、DNA 改変酵素又はそのエフェクタードメインと融合してもよい。DNA 調節因子の例には、デアミナーゼ、ヌクレアーゼ、ニッカーゼ、リコンビナーゼ、メチルトランスフェラーゼ、メチラーゼ、アセチラーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、逆転写酵素、ヘリカーゼ、インテグラーゼ、リガーゼ、トランスポザーゼ、デメチラーゼ、ホスファターゼ、転写活性化因子又は転写抑制因子が含まれるが、これらには限定されない。いくつかの態様では、本願の C R I S P R ヌクレアーゼは、酵素活性を有するタンパク質と融合する。いくつかの態様では、酵素活性は、標的 DNA 分子を改変する本願の C R I S P R ヌクレアーゼ又はその融合タンパク質は、疾患に関連する遺伝子中の 1 以上の変異を修正若しくは生成するために、又は遺伝子の発現を増加、修正、減少若しくは防止するために使用してもよい。

10

【0021】

非天然組成物は、配列番号 1 ～ 1 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含む C R I S P R ヌクレアーゼ、又は前記 C R I S P R ヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子を含む。

【0022】

いくつかの態様では、組成物は、1 以上の RNA 分子、又は当該 1 以上の RNA 分子のいずれか 1 つをコードする DNA ポリヌクレオチドを更に含み、ここで、前記 1 以上の RNA 分子と前記 C R I S P R ヌクレアーゼは天然では同時に存在せず、並びに、前記 1 以上の RNA 分子は、前記 C R I S P R ヌクレアーゼと複合体を形成するように構成され、及び／又は、前記複合体を標的部位に向けるように構成されている。

20

【0023】

いくつかの態様では、C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、配列番号 5 2 ～ 6 4 からなる群から選択される配列を含む。

【0024】

いくつかの態様では、C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 5 2 ～ 5 5 からなる群から選択される配列を含む C R I S P R RNA (c r RNA) 分子である。

【0025】

いくつかの態様では、組成物は、配列番号 5 6 ～ 6 3 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 C R I S P R RNA (t r a c r RNA) 分子を更に含む。

30

【0026】

いくつかの態様では、C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 5 2 ～ 6 4 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (s g RNA) 分子である。

【0027】

いくつかの態様では、C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、配列番号 6 5 ～ 8 1 からなる群から選択される配列を含む。

40

【0028】

いくつかの態様では、C R I S P R ヌクレアーゼは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 6 5 ～ 6 8 及び 8 0 からなる群から選択される配列を含む C R I S P R RNA (c r RNA) 分子である。

【0029】

いくつかの態様では、組成物は、配列番号 6 9 ～ 7 7 及び 8 1 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 C R I S P R RNA (t r a c r RNA) 分子を更に含む。

【0030】

50

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号2に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号65～81からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイドRNA (sgRNA) 分子である。

【0031】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号3に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、配列番号82～97からなる群から選択される配列を含む。

【0032】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号3に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号82～85及び96からなる群から選択される配列を含むCRISPR RNA (crRNA) 分子である。

【0033】

いくつかの態様では、組成物は、配列番号86～93及び97からなる群に示す配列を含むトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む。

【0034】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号3に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号82～97からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイドRNA (sgRNA) 分子である。

【0035】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号4～9に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、配列番号98～114からなる群から選択される配列を含む。

【0036】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号4～9に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号98～101及び114からなる群から選択される配列を含むCRISPR RNA (crRNA) 分子である。

【0037】

いくつかの態様では、組成物は、配列番号102～111からなる群に示す配列を含むトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む。

【0038】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号4～9に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号98～114からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイドRNA (sgRNA) 分子である。

【0039】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号10に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、配列番号115～127からなる群から選択される配列を含む。

【0040】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号10に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号115～118からなる群から選択される配列を含むCRISPR RNA (crRNA) 分子である。

【0041】

いくつかの態様では、組成物は、配列番号119～126からなる群に示す配列を含むトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む。

【0042】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号10に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号115～127からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイドRNA (sgRNA) 分子である。

【0043】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号11に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、配列番号128～141からなる群から選択される配列を含む。

【0044】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号11に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号128～131からなる群から選択される配列を含むCRISPR RNA (crRNA) 分子である。

【0045】

いくつかの態様では、組成物は、配列番号132～140からなる群に示す配列を含むトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む。

【0046】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号11に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号128～141からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイドRNA (sgRNA) 分子である。

【0047】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号12に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、配列番号142～155からなる群から選択される配列を含む。

【0048】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号12に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号142～145からなる群から選択される配列を含むCRISPR RNA (crRNA) 分子である。

【0049】

いくつかの態様では、組成物は、配列番号146～152及び155からなる群に示す配列を含むトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む。

【0050】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号12に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号142～155からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイドRNA (sgRNA) 分子である。

【0051】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号13に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、配列番号156～167及びGCUUUAAGCからなる群から選択される配列を含む。

【0052】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号13に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号156～159からなる群から選択される配列を含むCRISPR RNA (crRNA) 分子である。

【0053】

10

20

30

40

50

いくつかの態様では、組成物は、配列番号 160～166 及び GCUUUAAGC からなる群に示す配列を含むトランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む。

【0054】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 13 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 156～167 及び GCUUUAAGC からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (sgRNA) 分子である。

【0055】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 14 又は 15 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、配列番号 168～176 からなる群から選択される配列を含む。

10

【0056】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 14 又は 15 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 168 及び 169 からなる群から選択される配列を含む CRISPR RNA (crRNA) 分子である。

【0057】

いくつかの態様では、組成物は、配列番号 170～175 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む。

20

【0058】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 14 又は 15 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 168～176 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (sgRNA) 分子である。

【0059】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 16 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、配列番号 177～185 からなる群から選択される配列を含む。

【0060】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 16 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 177 及び 178 からなる群から選択される配列を含む CRISPR RNA (crRNA) 分子である。

30

【0061】

いくつかの態様では、組成物は、配列番号 179～184 からなる群に示す配列を含むトランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む。

【0062】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 16 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 177～185 からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイド RNA (sgRNA) 分子である。

40

【0063】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 17 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、配列番号 186～202 からなる群から選択される配列を含む。

【0064】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号 17 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 1 つの RNA 分子は、ガイド配列部分及び配列番号 186～189 及び 201 からなる群から選択される配列

50

を含むCRISPR RNA (crRNA) 分子である。

【0065】

いくつかの態様では、組成物は、配列番号190～198及び202からなる群に示す配列を含むトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) 分子を更に含む。

【0066】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号17に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、少なくとも1つのRNA分子は、ガイド配列部分及び配列番号186～202からなる群から選択される配列を含む単鎖ガイドRNA (sgRNA) 分子である。

【0067】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、表1の列5に示した位置のCRISPRヌクレアーゼのアミノ酸置換によって作成した不活性化RuvCドメインを有するニッカーゼである。

【0068】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、表1の列6に示した位置のCRISPRヌクレアーゼのアミノ酸置換によって作成した不活性化HNHドメインを有するニッカーゼである。

【0069】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、表1の列7に示した位置のCRISPRヌクレアーゼの置換によって作成した不活性化RuvCドメイン及び不活性化HNHドメインを有する触媒活性のないヌクレアーゼである。

【0070】

例えば、OMNI-127のアミノ酸配列（配列番号3）の9位のアスパラギン酸残基（D）を別のアミノ酸（例、アラニン（A））に置換することによってそのRuvCドメインを不活性化し、OMNI-127ヌクレアーゼのニッカーゼを作り出せる。他のアミノ酸への置換は、表1中に別段の記載がない限り、列5～7に示したアミノ酸位置のそれぞれについて許容される。他のニッカーゼ又は触媒活性のないヌクレアーゼも、表1から同様にして作り出せる。

【0071】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、表3の列2～4のCRISPRヌクレアーゼについて示したプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列を利用する。

【0072】

この発明は、上記組成物のいずれか1つを細胞に導入することを含む、無細胞系で又は細胞のゲノム内で、DNA標的部位のヌクレオチド配列を改変する方法も提供する。いくつかの態様では、組成物は、CRISPRヌクレアーゼ及びcrRNA：tracrRNA複合体又はsgRNA分子を含む。

【0073】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、表3の列2～4に示したCRISPRヌクレアーゼのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列に隣接するDNA鎖を切断し、前記PAM配列に相補的な配列に隣接するDNA鎖を切断する。例えば、適切な標的化sgRNA又はcrRNA：tracrRNA複合体を有するOMNI-115ヌクレアーゼは、配列NNRYTT又はNNRTTTに隣接する鎖で、及び配列NNRYTT又はNNRTTTに相補的な配列に隣接するDNA鎖で、DNAを切断できる。いくつかの態様では、DNA鎖は細胞の核の内部にある。

【0074】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、表1の列5に示した位置のCRISPRヌクレアーゼのアミノ酸置換によって作成した不活性化RuvCドメインを有するニッカーゼであり、PAM配列に相補的な配列に隣接するDNA鎖を切断する。

【0075】

いくつかの態様では、CRISPRヌクレアーゼは、表1の列6に示した位置のCRISPR

10

20

30

40

50

S P Rヌクレアーゼのアミノ酸置換によって作成した不活性化N H Nドメインを有するニックアーゼであり、P A M配列に隣接するD N A鎖を切断する。

【0076】

いくつかの態様では、C R I S P Rヌクレアーゼは、表1の列7に示した位置のC R I S P Rヌクレアーゼの置換によって作成した不活性化R u v Cドメイン及び不活性化H N Hドメインを有する触媒活性のないヌクレアーゼであり、P A M配列に隣接するD N A鎖を切断する。

【0077】

いくつかの態様では、細胞は真核細胞又は原核細胞である。

【0078】

いくつかの態様では、細胞は哺乳動物の細胞である。

【0079】

いくつかの態様では、細胞はヒトの細胞である。

【0080】

いくつかの態様では、C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号1～17のいずれかに示す配列のC R I S P Rヌクレアーゼと、少なくとも100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%又は82%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある態様では、C R I S P Rヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号18～51からなる群から選択される核酸配列と少なくとも95%の同一性を有する。

【0081】

本発明のいくつかの側面では、開示された組成物は、C R I S P Rヌクレアーゼ又はC R I S P Rヌクレアーゼ バリエントをコードするヌクレオチド配列を含むD N A構築物又はベクター系を含む。いくつかの態様では、C R I S P Rヌクレアーゼ又はC R I S P Rヌクレアーゼ バリエントをコードするヌクレオチド配列は、対象とする細胞内で作動可能なプロモーターに作動可能に連結している。いくつかの態様では、目的の細胞は真核細胞である。いくつかの態様では、目的の細胞は哺乳動物の細胞である。いくつかの態様では、改変されたC R I S P Rヌクレアーゼをコードする核酸配列は、特定の生物の細胞で使用するためにコドン最適化されている。いくつかの態様では、ヌクレアーゼをコードする核酸配列は大腸菌にコドン最適化されている。いくつかの態様では、ヌクレアーゼをコードする核酸配列は真核細胞にコドン最適化されている。いくつかの態様では、ヌクレアーゼをコードする核酸配列は哺乳動物細胞にコドン最適化されている。

【0082】

いくつかの態様では、組成物は、配列番号1～17のいずれかの配列との同一性が少なくとも100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%であるC R I S P R酵素をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した異種プロモーターを含む組換え核酸を含む。それぞれの実現可能性は個別の態様である。

【0083】

組成物の態様では、C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号1に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%又は97%の同一性を有するか、C R I S P Rヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号18及び35からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

【0084】

組成物の態様では、C R I S P Rヌクレアーゼは、配列番号2に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%又は97%の同一性を有するか、C R I S P Rヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号19及び36からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

10

20

30

40

50

【0085】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号3に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号20及び37からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

【0086】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号4に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号21及び38からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

10

【0087】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号5に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号22及び39からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

【0088】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号6に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号23及び40からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

20

【0089】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号7に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号24及び41からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

30

【0090】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号8に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号25及び42からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

【0091】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号9に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号26及び43からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

40

【0092】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号10に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号27及び44からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

【0093】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号11に示すアミノ酸配列に

50

対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号28及び45からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

【0094】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号12に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号29及び46からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

10

【0095】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号13に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号30及び47からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

【0096】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号14に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号31及び48からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

20

【0097】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号15に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号32及び49からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

【0098】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号16に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号33及び50からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

30

【0099】

組成物の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、配列番号17に示すアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の同一性を有するか、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列は、配列番号34及び51からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも75%、80%、85、90%、95%又は97%の配列同一性を有する。

40

【0100】

いくつかの態様によれば、配列番号1～17からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%の同一性を有する配列を含むCRISPRヌクレアーゼ、又は前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子を含む、改変された又は非天然の組成物を提供する。それぞれの実現可能性は個別の態様である。ある態様では、CRISPRヌクレアーゼは改変されているか、天然に存在しない。CRISPRヌクレアーゼは組換えられていてもよい。このようなCRISPRヌクレアーゼは、複数のソースから遺伝物質を集め、実験室の方法（分子クローニング）を使用して、他の方法では生物に見られない配列を作出される。

50

【0101】

ある態様では、この発明のCRISPRヌクレアーゼは、1つ以上のRNA分子と複合体を形成した場合に、SpCas9ヌクレアーゼと比較して、標的部位に対する特異性が増大する。

【0102】

ある態様では、この発明のCRISPRヌクレアーゼと1つ以上のRNA分子の複合体は、SpCas9ヌクレアーゼと比較して、標的部位のオンターゲット編集活性を少なくとも維持し、オフターゲット活性を低下させる。

【0103】

ある態様では、CRISPRヌクレアーゼは、DNAターゲティングRNA分子（gRNA分子）と相互作用できるRNA結合部位、及び部位特異的酵素活性を示す活性部位を更に含む。

10

【0104】

ある態様では、組成物は、DNAターゲティングRNA分子、又はDNAターゲティングRNA分子をコードするDNAポリヌクレオチドを更に含み、前記DNAターゲティングRNAは、ガイド配列部分、すなわち、標的領域内の配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、前記DNAターゲティングRNA分子と前記CRISPRヌクレアーゼは、天然では同時に見いだされない。

【0105】

ある態様では、DNAターゲティングRNA分子は、CRISPRヌクレアーゼと複合体を形成できるヌクレオチド配列を更に含む。

20

【0106】

この発明は、

a) 直接の反復配列と連結した、標的配列とハイブリダイズできる、ガイド配列部分を含む1つ以上のRNA分子、又は、前記1つ以上のRNA分子をコードする1つ以上のヌクレオチド配列；及び

b) 配列番号1～17からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むCRISPRヌクレアーゼ、又は、前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子；

を含むCRISPR関連系を含む非天然組成物も提供し、

30

ここで、前記1つ以上のRNA分子は前記標的配列にハイブリダイズし、前記標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の3'であり、前記1つ以上のRNA分子は前記CRISPRヌクレアーゼと複合体を形成する。

【0107】

ある態様では、組成物は、CRISPRヌクレアーゼと複合体を形成できるヌクレオチド配列を含むRNA分子（例、tracrRNA分子）、又はCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成できるRNA分子をコードする配列を含むDNAポリヌクレオチドを更に含む。

【0108】

ある態様では、組成物は、相同組換え修復（HDR）のためのドナーテンプレートを更に含む。

40

【0109】

ある態様では、組成物は細胞のゲノムの標的領域を編集できる。

【0110】

いくつかの態様によれば、

(a) RNA結合部位；及び

部位特異的酵素活性を示す活性部位

を含む、CRISPRヌクレアーゼ又は前記CRISPRヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、

ここで、前記CRISPRヌクレアーゼは、配列番号1～17のいずれかと少なくとも

50

100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%の同一性を有する；並びに、

(b) i) 標的DNA配列に相補的なヌクレオチド配列を含むDNAターゲティングRNA配列；及び

ii) 前記CRISPRヌクレアーゼのRNA結合部位と相互作用できるタンパク質結合RNA配列

を含む、1つ以上のRNA分子又は前記1つ以上のRNA分子をコードするDNAポリヌクレオチド、

を含む非天然組成物が提供され、

ここで、前記DNAターゲティングRNA配列と前記CRISPRヌクレアーゼは、天然では同時に見いだされない。それぞれの実現可能性は個別の態様である。

【0111】

いくつかの態様では、DNAターゲティングRNA配列及びタンパク質結合RNA配列を含むシングルRNA分子が提供され、前記RNA分子はCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成でき、DNA標的化モジュールとして機能できる。いくつかの態様では、RNA分子の長さは、最大で1000塩基、900塩基、800塩基、700塩基、600塩基、500塩基、400塩基、300塩基、200塩基、100塩基、50塩基である。それぞれの実現可能性は個別の態様である。いくつかの態様では、DNAターゲティングRNA配列を含む第1のRNA分子及びタンパク質結合RNA配列を含む第2のRNA分子は、塩基対合によって相互作用するか、あるいは互いに融合してCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成し、DNA標的化モジュールとして機能する1つ以上のRNA分子を形成する。

【0112】

この発明は、

a) 配列番号1～17からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する配列を含むCRISPRヌクレアーゼ、又は、前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子；並びに

b) i) 前記CRISPRヌクレアーゼと相互作用／結合できるヌクレアーゼ結合RNAのヌクレオチド配列；及び

ii) 標的DNA配列中の配列に相補的な配列を含むDNAターゲティングRNAのヌクレオチド配列、

の少なくとも1つを含む、1つ以上のRNA分子、又は、前記1つ以上のRNA分子をコードする1つ以上のDNAポリヌクレオチド、

を含む非天然組成物も提供し、

ここで、前記CRISPRヌクレアーゼは、前記1つ以上のRNA分子と複合体を形成して、前記標的DNA配列とハイブリダイズできる複合体を形成できる。

【0113】

ある態様では、CRISPRヌクレアーゼ及び1つ以上のRNA分子は、標的DNA配列に結合して標的DNA配列を切断できるCRISPR複合体を形成する。

【0114】

ある態様では、CRISPRヌクレアーゼと1つ以上のRNA分子の少なくとも1つは、天然では同時に見いだされない。

【0115】

ある態様では：

a) CRISPRヌクレアーゼは、RNA結合部位及び部位特異的酵素活性を示す活性部位を含み；

b) DNAターゲティングRNAのヌクレオチド配列は、標的DNA配列に相補的なヌクレオチド配列を含み；かつ

c) ヌクレアーゼ結合RNAのヌクレオチド配列は、前記CRISPRヌクレアーゼのRNA結合部位と相互作用する配列を含む。

【0116】

ある態様では、ヌクレアーゼ結合RNAのヌクレオチド配列及びDNAターゲティングRNAのヌクレオチド配列は、シングルガイドRNA分子（sgRNA）上にあり、前記sgRNA分子は、CRISPRヌクレアーゼと複合体を形成して、DNA標的化モジュールとして機能できる。

【0117】

ある態様では、ヌクレアーゼ結合RNAのヌクレオチド配列は第1のRNA分子上に、DNAターゲティングRNAのヌクレオチド配列は第2のRNA分子上にあり、前記第1及び第2のRNA配列は、塩基対合によって相互作用するか、又は、互いに融合してRNA複合体を形成するか、若しくはCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成してDNA標的化モジュールとして機能するsgRNAを形成する。

10

【0118】

ある態様では、sgRNAの長さは、最大で1000塩基、900塩基、800塩基、700塩基、600塩基、500塩基、400塩基、300塩基、200塩基、100塩基、50塩基である。

【0119】

ある態様では、組成物は、相同組換え修復（HDR）のためのドナーテンプレートを更を含む。

【0120】

ある態様では、CRISPRヌクレアーゼは天然に存在しない。

20

【0121】

ある態様では、CRISPRヌクレアーゼは改変されており、非天然のアミノ酸又は合成アミノ酸を含む。

【0122】

ある態様では、CRISPRヌクレアーゼは改変されており、核局在化配列（NLS）、細胞透過性ペプチド配列及び／又は親和性タグの1種以上を含む。

【0123】

ある態様では、CRISPRヌクレアーゼは、真核細胞の核で検出可能な量のCRISPRヌクレアーゼを含むCRISPR複合体の蓄積を駆動するのに十分な強度の1つ以上の核局在化配列を含む。

30

【0124】

この発明は、本発明の組成物を細胞に導入することを含む、無細胞系で又は細胞のゲノム内で、標的部位のヌクレオチド配列を改変する方法も提供する。

【0125】

ある態様では、細胞は真核細胞である。

【0126】

別の態様では、細胞は原核細胞である。

【0127】

いくつかの態様では、1つ以上のRNA分子は、RNAヌクレアーゼと複合体を形成できるヌクレオチド分子を含むRNA配列（tracrRNA）、又はCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成できるヌクレオチド配列を含むRNA分子をコードするDNAポリヌクレオチドを更を含む。

40

【0128】

ある態様では、CRISPRヌクレアーゼは、アミノ末端若しくはその近傍に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のNLS、カルボキシル末端若しくはその近傍に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のNLS、若しくは、アミノ末端若しくはその近傍の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のNLS、及び、カルボキシル末端若しくはその近傍の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のNLSの組合せを含む。ある態様では、1～4のNLSがCRISPRヌクレアーゼと融合している。ある態様では、NLSは、CRISPRヌクレアーゼのオープンリーディングフレー

50

ム（ORF）の内部にある。

【0129】

発現タンパク質のアミノ末端若しくはその近傍、カルボキシル末端若しくはその近傍、又はORF内においてNLSを融合する方法は、当技術分野において広く知られている。一例として、NLSをCRISPRヌクレアーゼのアミノ末端に融合させるために、NLSの核酸配列を、NLS融合CRISPRヌクレアーゼをコードする核酸のCRISPRヌクレアーゼの開始コドンの直後に配置する。また、NLSをCRISPRヌクレアーゼのカルボキシル末端に融合させるために、NLSの核酸配列を、CRISPRヌクレアーゼの最後のアミノ酸をコードするコドンの後、かつ、停止コドンの前に配置する。

【0130】

この発明では、CRISPRヌクレアーゼのORFに沿った位置での、NLS、細胞透過性ペプチド配列及び／又は親和性タグの組合せが予定されている。

【0131】

本発明のCRISPRヌクレアーゼのアミノ酸配列及び核酸配列は、CRISPRヌクレアーゼの連続するアミノ酸又は核酸配列を中断するように挿入されたNLS及び／又はTAGを含んでいてもよい。

【0132】

ある態様では、1つ以上のNLSがタンデムリピートになっている。

【0133】

ある態様では、NLSの最も近いアミノ酸が、N末端又はC末端からポリペプチド鎖に沿って約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50又はそれ以上のアミノ酸内にある場合、1つ以上のNLSは、N末端又はC末端に近接していると見なされる。

【0134】

検討したように、CRISPRヌクレアーゼは、核局在化配列（NLS）、細胞透過性ペプチド配列及び／又は親和性タグの1種以上を含むように改変されてもよい。

【0135】

ある態様では、CRISPRヌクレアーゼは、1つ以上のRNA分子と複合体を形成した場合、その野生型と比較して、標的部位に対する特異性が増加する。

【0136】

ある態様では、CRISPRヌクレアーゼと1つ以上のRNA分子の複合体は、CRISPRヌクレアーゼの野生型と比較して、標的部位のオンターゲット編集活性を少なくとも維持し、オフターゲット活性を低下させる。

【0137】

ある態様では、組成物は、CRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含むヌクレオチド分子に作動可能に連結した異種プロモーターを含む組換え核酸分子を更に含む。

【0138】

ある態様では、CRISPRヌクレアーゼ又は前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子は天然には存在しないか、改変されている。

【0139】

この発明は、本発明のCRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子を含むベクター系を含む、非天然又は改変された組成物も提供する。

【0140】

この発明は、対象のゲノムの標的部位においてヌクレオチド配列を改変することを含む、ゲノムの変異に関連する疾患に罹患している対象の治療のための、本発明の組成物の使用も提供する。

【0141】

この発明は、(i) 配列番号1～17からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するCRISPRヌクレアーゼを含む組成物、又は、配列番号18～51からなる群から選択される核酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有

10

20

30

40

50

するC R I S P Rヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子、及び、(ii) D N A ターゲティングR N A分子、又は、標的D N Aの配列に相補的なヌクレオチド配列を含む、D N AターゲティングR N A分子をコードするD N Aポリヌクレオチドを、細胞に導入することを含む、哺乳動物細胞のゲノム中の標的部位でヌクレオチド配列を改変する方法を提供する。

【0142】

いくつかの態様では、この方法はex vivoで行われる。いくつかの態様では、この方法はin vivoで行われる。いくつかの態様では、この方法のいくつかの工程はex vivoで行われ、いくつかの工程はin vivoで行われる。いくつかの態様では、哺乳動物細胞はヒト細胞である。

【0143】

ある態様では、この方法は、(iii) t r a c r R N A配列を含むR N A分子、又はt r a c r R N A配列を含むR N A分子をコードするD N Aポリヌクレオチドを、細胞に導入することを更に含む。

【0144】

ある態様では、D N AターゲティングR N A分子はc r R N A反復配列を含む。

【0145】

ある態様では、t r a c r R N A配列を含むR N A分子は、D N AターゲティングR N A分子に結合できる。

【0146】

ある態様では、D N AターゲティングR N A分子とt r a c r R N A配列を含むR N A分子は相互作用してR N A複合体を形成し、R N A複合体はC R I S P Rヌクレアーゼと活性な複合体を形成できる。

【0147】

ある態様では、D N AターゲティングR N A分子とヌクレアーゼ結合R N A配列を含むR N A分子は、C R I S P Rヌクレアーゼと活性複合体を形成するのに適したシングルガイドR N A分子の形で融合している。

【0148】

ある態様では、ガイド配列部分は、プロトスペーサー配列に相補的な配列を含む。

【0149】

ある態様では、C R I S P Rヌクレアーゼは、D N AターゲティングR N A分子と複合体を形成し、プロトスペーサー隣接モチーフ（P A M）の3'又は5'を二本鎖切断する。

【0150】

本願の方法のいずれかの態様では、この方法は、対象のゲノムの標的部位においてヌクレオチド配列を改変することを含む、ゲノムの変異に関連する疾患に罹患している対象を治療するためのものである。

【0151】

ある態様では、この方法は、最初に、ゲノムの変異に関連する疾患に罹患している対象を選択し、対象から細胞を得ることを含む。

【0152】

この発明は、本願の方法で得た改変細胞も提供する。ある態様では、これらの改変細胞は、子孫細胞を生み出すことができる。ある態様では、これらの改変細胞は、移植後に子孫細胞を生み出すことができる。

【0153】

この発明は、これらの改変細胞及び薬学的に許容される担体を含む組成物も提供する。また、細胞を薬学的に許容される担体と混合することを含む、これを調製するin vitro又はex vivoの方法も提供する。

【0154】

D N AターゲティングR N A分子

R N A分子の「ガイド配列部分」は、特定の標的D N A配列とハイブリダイズできるヌ

10

20

30

40

50

クレオチド配列を指し、例えば、ガイド配列部分は、その長さに沿って標的とされるDNA配列に部分的又は完全に相補的である。いくつかの態様では、ガイド配列部分の長さは、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49若しくは50ヌクレオチド、又は、約17～50、17～49、17～48、17～47、17～46、17～45、17～44、17～43、17～42、17～41、17～40、17～39、17～38、17～37、17～36、17～35、17～34、17～33、17～31、17～30、17～29、17～28、17～27、17～26、17～25、17～24、17～22、17～21、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～22、18～20、20～21、21～22若しくは17～20ヌクレオチドである。ガイド配列部分の全長は、その長さに沿って標的とされるDNA配列に完全に相補的である。ガイド配列部分は、CRISPR複合体のDNAターゲティング部分として機能するガイド配列部分を有するCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成できるRNA分子の一部分であってもよい。ガイド配列部分を有するDNA分子がCRISPR分子と同時に存在する場合、RNA分子はCRISPRヌクレアーゼを特定の標的DNA配列にターゲティングできる。それぞれの実現可能性は個別の態様である。RNA分子は、所望の配列を標的とするように特別に設計できる。したがって、「ガイド配列部分」を含む分子は、ターゲティング分子の一種である。この出願全体で、用語「ガイド分子」、「RNAガイド分子」、「ガイドRNA分子」及び「gRNA分子」は、ガイド配列部分を含む分子と同義であり、用語「スパーサー」は「ガイド配列部分」と同義である。

10

20

【0155】

この発明の複数の態様では、CRISPRヌクレアーゼは、ヌクレオチド数が17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30のガイド配列部分を含むRNA分子と共に使用する場合、切断活性が最大である。

【0156】

シングルガイドRNA (sgRNA) 分子を使用して、CRISPRヌクレアーゼを所望の標的部位に向けることができる。シングルガイドRNAは、ガイド配列部分と足場部分を含む。足場部分は、CRISPRヌクレアーゼと相互作用し、ガイド配列部分と共に、CRISPRヌクレアーゼを活性化して所望の標的部位に向ける。足場部分は、例えば、サイズが小さくなるように更に設計されてもよい。

30

【0157】

本発明のいくつかの側面では、開示した方法は、明細書に記載した組成物を、細胞に導入することを含む、無細胞系で又は細胞のゲノム中の標的部位で、ヌクレオチド配列を改変する方法を含む。

【0158】

いくつかの態様では、細胞は真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞又は植物細胞である。

【0159】

本発明のいくつかの側面では、開示された方法は、対象のゲノムの標的部位においてヌクレオチド配列を改変することを含む、ゲノムの変異に関連する疾患に罹患している対象の治療のための本願の組成物の使用を含む。

40

【0160】

本発明のいくつかの側面では、開示された方法は、変異障害に関連するアレルを本願の組成物の標的とすることを含む、変異障害を有する対象を治療する方法を含む。

【0161】

いくつかの態様では、変異障害は、腫瘍形成、加齢黄斑変性、統合失調症、神経障害、神経変性疾患、運動障害、脆弱X症候群、セクレターゼ関連障害、プリオン関連障害、ALS、依存症、自閉症、アルツハイマー病、好中球減少症、炎症関連障害、パーキンソン病、血液及び凝固の疾患及び障害、βサラセミア、鎌状赤血球貧血、細胞調節不全、腫瘍

50

に関連する疾患及び障害、炎症及び免疫に関連する疾患及び障害、代謝、肝臓、高コレステロール血症、腎臓及びタンパク質の疾患及び障害、筋肉及び骨格の疾患及び障害、皮膚の疾患及び障害、神経の疾患及び障害、肺の疾患及び障害、角膜の疾患及び障害、網膜の疾患及び障害、並びに、眼の疾患及び障害のいずれかから選択される疾患又は障害に関連する。

【0162】

疾患及び治療

本発明のある態様は、遺伝子編集、処置又は治療方法の一形態として、ヌクレアーゼを、疾患又は障害に関連する特定の遺伝子座にターゲティングする。例えば、遺伝子の編集又はノックアウトを誘導するために、特別に設計したガイドRNA分子を使用して、明細書に開示した新規なヌクレアーゼを、遺伝子の病原性変異アレルに特異的にターゲティングしてもよい。ヌクレアーゼのPAM要件を最初に考慮してガイドRNA分子を設計することが好ましく、このことは、明細書で示すように、遺伝子編集が行われる系にも依存する。例えば、OMNI-115ヌクレアーゼを標的部位に向けるように設計されたガイドRNA分子は、OMNI-115 PAM配列（例、「NNRYTT」又ハ「NNRTTT」）二隣接するDNA二本鎖領域のDNA鎖に相補的なスペーサー領域を含むように設計される。ガイドRNA分子は、好ましくは、ヌクレアーゼの特異的活性を増大させ、オフターゲット効果を減少させるために、十分かつ好ましくは最適な長さのスペーサー領域（すなわち、標的アレルと相補的なガイドRNA分子の領域）を含むように更に設計される。

10

20

【0163】

限定するものではない例として、ガイドRNA分子は、ヌクレアーゼによるDNA損傷時に非相同末端結合（NHEJ）経路が誘導されて、フレームシフト変異の導入による変異アレルのサイレンシングがもたらされるように、ヌクレアーゼを変異アレルの特定の領域、例えば、開始コドンの近傍、を標的とするように設計してもよい。ガイドRNA分子を設計するこのアプローチは、ドミナントネガティブ変異の作用を変化させ、それによって対象を治療するのに特に有用である。別の非限定的な例として、ガイドRNA分子は、ヌクレアーゼによるDNA損傷時に相同性指向修復（HDR）経路が誘導されて、変異アレルのテンプレートを介した修正がもたらされるように、変異したアレルの特定の病原性変異を標的とするように設計してもよい。ガイドRNA分子を設計するこのアプローチは、変異アレルのハプロ不全作用を変化させ、それによって対象を治療するのに特に有用である。

30

【0164】

疾患又は障害を治療するために改変の標的としてもよい遺伝子の限定するものではない例を以下に示す。変異障害を誘発する疾患関連遺伝子と変異が文献に記載されている。そのような変異は、DNA損傷を引き起こすことによってDNA修復経路を誘導してアレルを改変し、それによって変異障害を治療するCRISPR組成物を、疾患関連遺伝子のアレルを標的とするDNAターゲティングRNA分子を設計するために使用できる。

【0165】

ELANE遺伝子の変異は、好中球減少症に関連している。したがって、ELANEを標的とする本発明の態様は、好中球減少症に罹患した対象の治療方法で、無制限に使用してもよい。

40

【0166】

CXCR4は、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）感染における共受容体である。したがって、CXCR4を標的とする本発明の態様は、HIV-1に罹患した対象を治療する方法、又はHIV-1感染に対する耐性を対象に付与する方法において、無制限に使用してもよい。

【0167】

プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）の破壊は、腫瘍細胞のCAR-T細胞による死滅を促進し、PD-1ががん治療の標的となる可能性がある。したがって、PD-1

50

を標的とする本発明の態様は、がん罹患した対象の治療方法で、無制限に使用してもよい。ある態様では、治療は、PD-1欠損となるように本発明に従って改変されたT細胞によるCAR-T細胞療法である。

【0168】

また、BCL11Aはヘモグロビン産生抑制に関与する遺伝子である。BCL11Aを阻害することによって、グロビン産生を増加させ、サラセミアや鎌状赤血球貧血などの疾患を治療してもよい。例えば、国際公開第2017/077394号、米国特許出願公開第2011/0182867号；Humbert et al. Sci. Transl. Med. (2019)及びCanver et al. Nature (2015)を参照。したがって、BCL11Aのエンハンサーを標的とする本発明の態様は、βサラセミア又は鎌状赤血球貧血に罹患した対象の治療方法で、無制限に使用してもよい。

10

【0169】

本発明は、以下の表A又は表Bに列挙した疾患又は障害の研究、改変又は治療において、疾患関連遺伝子を標的とするために使用してもよい。実際、遺伝子座を有する疾患関連遺伝子は、本明細書に開示のヌクレアーゼを使用して、適切な疾患関連遺伝子、例えば米国特許出願公開第2018/0282762号及び欧州特許第3079726号（B1）に列挙されているものを標的とすることによって、研究、改変又は治療してもよい。

【0170】

20

30

40

50

【表 A】

表A 疾患、障害とその関連遺伝子

疾患／障害	遺伝子
腫瘍形成	PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; ノッチ1; ノッチ2; ノッチ3; ノッチ4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR α ; PPAR γ ; WT1 (Wilms腫瘍); FGF受容体のファミリー (5種: 1, 2, 3, 4, 5); CDKN2a; APC; RB (網膜芽細胞腫); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR (アンドロゲン受容体); TSG101; IGF; IGF受容体; Igf1 (4種); gf2 (3種); Igf1受容体; Igf2受容体; Bax; Bcl2; カスパーゼファミリー (9種: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12); Kras; Apc
加齢黄斑変性	Abcr; Ccl2; Cc2; cp (セルロプラスミン); Timp3; カテプシンD; Vldlr; Ccr2
統合失調症	ニューレグリン1 (Nrg1); Erb4 (ニューレグリンの受容体); コンプレキシン1 (Cp1x1); Tph1トリプトファンヒドロキシラーゼ; Tph2トリプトファンヒドロキシラーゼ2; ニューレキシン1; GSK3; GSK3a; GSK3b
神経障害、神経変性障害及び運動障害	5-HTT (S1c6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA; DTNBP1; Dao (Dao1)
トリヌクレオチドリピート障害	HTT (ハンチントン病); SBMA/SMAX1/AR (ケネディー病); FXN/X25 (フリードライヒ病); ATX3 (マチャド-ジョセフ病); ATXN1 及び ATXN2 (脊髄小脳失調症); DMPK (筋緊張性ジストロフィー); アトロフィン-1 及び Atn1 (DRPLA); CBP (Creb-BP - グローバルな不安定性); VLDLR (アルツハイマー); Atxn7; Atxn10
脆弱X症候群	FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5
セクレターゼ関連障害	APH-1 (α 及び β); プレセニリン (Psen1); ニカストリン (Ncstn); PEN-2
その他	Nos1; Parp1; Nat1; Nat2
プリオン関連障害	Prp
ALS	SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c)
依存症	Prkce (アルコール); Drd2; Drd4; ABAT (アルコール); GRIA2; Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1 (アルコール)
自閉症	Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A; ニューレキシン1; 脆弱X (FMR2 (AFF2); FXR1; FXR2; Mglur5)
アルツハイマー病	E1; CHIP; UCH; UBB; Tau; LRP; PICALM; クラステリン; PS1; SORL1; CR1; Vldlr; Uba1; Uba3; CHIP28 (Aqp1, アクアポリン1); Uchl1; Uchl3; APP
炎症	IL-10; IL-1 (IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17 (IL-17a (CTLA8); IL-17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); IL-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa; NOD2/IBDのCARD15; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b); CTLA4; Cx3cl1
パーキンソン病	x-シヌクレイン; DJ-1; LRRK2; パーキン; PINK1

10

20

30

40

【 0 1 7 1 】

【表 B - 1】

表B 疾患、障害とその関連遺伝子

疾患カテゴリー	疾患とその関連遺伝子
血液及び凝固の疾患及び障害	貧血 (CDAN1, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5C3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT); 裸リンパ球症候群 (TAPBP, TPSN, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5, RFXAP, RFX5); 出血性障害 (Bleeding disorders) (TBXA2R, P2RX1, P2X1); 因子H及び因子H様1 (HF1, CFH, HUS); 因子V及び因子VIII (MCFD2); 因子VI欠乏症 (F7); 因子X欠乏症 (F10); 因子XI欠乏症 (F11); 因子XII欠乏症 (F12, HAF); 因子XIII欠乏症 (F13A1, F13A); 因子XIII欠乏症 (F13B); ファンconi貧血 (FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FADC, FAD, FANCE, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596); 血球貪食性リンパ組織球症 (PRF1, HPLH2, UNC13D, MUNC13-4, HPLH3, HLH3, FHL3); 血友病A (F8, F8C, HEMA); 血友病B (F9, HEMB); 出血性障害 (Hemorrhagic disorders) (PI, ATT, F5); 白血球の欠乏及び障害 (ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2BA, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4); 鎌状赤血球貧血 (HBB); サラセミア (HBA2, HBB, HBD, LCRB, HBA1)
細胞の調節不全並びに腫瘍学の疾患及び障害	B細胞非ホジキンリンパ腫 (BCL7A, BCL7); 白血病 (TAL1, TCL5, SCL, TAL2, FLT3, NBS1, NBS, ZNFN1A1, IK1, LYF1, HOXD4, HOX4B, BCR, CML, PHL, ALL, ARNT, KRAS2, RASK2, GMPS, AF10, ARHGEF12, LARG, KIAA0382, CALM, CLTH, CEBPA, CEBP, CHIC2, BTL, FLT3, KIT, PBT, LPP, NPM1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN, RUNX1, CBFA2, AML1, WHSC1L1, NSD3, FLT3, AF1Q, NPM1, NUMA1, ZNF145, PLZF, PML, MYL, STAT5B, AF10, CALM, CLTH, ARL11, ARLTS1, P2RX7, P2X7, BCR, CML, PHL, ALL, GRAF, NF1, VRNF, WSS, NFNS, PTPN11, PTP2C, SHP2, NS1, BCL2, CCND1, PRAD1, BCL1, TCRA, GATA1, GF1, ERYF1, NFE1, ABL1, NQO1, DIA4, NMOR1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN)
炎症並びに免疫関連の疾患及び障害	AIDS (KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1); 自己免疫性リンパ増殖症候群 (TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A); 複合型免疫不全 (IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4); HIV-1 (CCL5, SCYA5, D17S136E, TCP228); HIV感受性又は感染 (IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, CMKBR5, CCKR5 (CCR5)); 免疫不全 (CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AIID, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TACI); 炎症 (IL-10, IL-1 (IL-1a, IL-1b), IL-13, IL-17 (IL-17a (CTLA8), IL-17b, IL-17c, IL-17d, IL-17f), IL-23, Cx3cr1, ptpn22, TNFa, NOD2/CARD15 for IBD, IL-6, IL-12 (IL-12a, IL-12b), CTLA4, Cx3cl1); 重症複合型免疫不全 (SCIDs) (JAK3, JAKL, DCLRE1C, ARTEMIS, SCIDA, RAG1, RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA, IL7R, CD3D, T3D, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4)

10

20

30

40

【0172】

【表 B - 2】

表B 疾患、障害とその関連遺伝子(続き)

疾患カテゴリー	疾患とその関連遺伝子
代謝、肝臓、腎臓及びタンパク質の疾患及び障害	アミロイド神経障害(TTR, PALB);アミロイドーシス(APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB);硬変(KRT18, KRT8, CIRH1A, NAIC, TEX292, KIAA1988);嚢胞性線維症(CFTR, ABCC7, CF, MRP7);グリコーゲン貯蔵病(SLC2A2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL, GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PFKM);肝腺腫, 142330(TCF1, HNF1A, MODY3);肝不全、早期発症かつ神経障害(SCOD1, SCO1);肝リパーゼ欠損症(LIPC)、肝芽腫、がん及び癌腫(CTNNB1, PDGFRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, AXIN, CTNNB1, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5;髄質嚢胞性腎疾患(UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2);フェニルケトン尿症(PAH, PKU1, QDPR, DHP, PTS);多発性嚢胞腎肝疾患(FCYT, PKHD1, ARPKD, PKD1, PKD2, PKD4, PKDTS, PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63)
筋肉／骨格の疾患及び障害	ベッカー型筋ジストロフィー(DMD, BMD, MYF6), デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD, BMD);エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー(LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A, HGPS, LGMD1B, LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A);顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHMD1A, FSHD1A);筋ジストロフィー(FKRP, MDC1C, LGMD2I, LAMA2, LAMM, LARGE, KIAA0609, MDC1D, FCMD, TTID, MYOT, CAPN3, CANP3, DYSF, LGMD2B, SGCG, LGMD2C, DMDA1, SCG3, SGCA, ADL, DAG2, LGMD2D, DMDA2, SGCB, LGMD2E, SGCD, SGD, LGMD2F, CMD1L, TCAP, LGMD2G, CMD1N, TRIM32, HT2A, LGMD2H, FKRP, MDC1C, LGMD2I, TTN, CMD1G, TMD, LGMD2J, POMT1, CAV3, LGMD1C, SEPN1, SELN, RSMD1, PLEC1, PLTN, EBS1);大理石骨病(LRP5, BMND1, LRP7, LR3, OPPG, VBCH2, CLCN7, CLC7, OPTA2, OSTM1, GL, TCIRG1, TIRC7, OC116, OPTB1);筋萎縮症(VAPB, VAPC, ALS8, SMN1, SMA1, SMA2, SMA3, SMA4, BSCL2, SPG17, GARS, SMAD1, CMT2D, HEXB, IGHMBP2, SMUBP2, CATF1, SMARD1)
皮膚科の疾患及び障害	白皮症(TYR, OCA2, TYRP1, SLC45A2, LYST);外胚葉形成不全症(EDAR, EDARADD, WNT10A);エーラス・ダンロス症候群(COL5A1, COL5A2, COL1A1, COL1A2, COL3A1, TNXB, ADAMTS2, PLOD1, FKBP14);魚鱗癬関連障害(FLG, STS, TGM1, ALOXE3/ALOX12B, KRT1, KRT10, ABCA12, KRT2, GJB2, TGM1, ABCA12, CYP4F22, ALOXE3, CERS3, NSHDL, EBP, MBTPS2, GJB2, SPINK5, AGHD5, PHYH, PEX7, ALDH3A2, ERCC2, ERCC3, GFT2H5, GBA);色素失調症(IKBKG, NEMO);結節性硬化症(TSC1, TSC2);早期老化症候群(POLR3A, PYCR1, LMNA, POLD1, WRN, DMPK)

10

20

30

【0173】

40

50

【表 B - 3】

表B 疾患、障害とその関連遺伝子(続き)

疾患カテゴリー	疾患とその関連遺伝子
神経学的及び神経細胞の疾患及び障害	ALS(SOD1, ALS2, STEX, FUS, TARDBP, VEGF(VEGF-a, VEGF-b, VEGF-c)); アルツハイマー病(APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLAUI, URK, ACE, DCP1, ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3); 自閉症(Mecp2, BZRAP1, MDGA2, Sema5A, ニューレキシン1, GLO1, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, NLGN3, NLGN4, KIAA1260, AUTSX2); 脆弱X症候群(FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5); ハンチントン病及びハンチントン病様障害(HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17); パーキンソン病(NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, DJ1, PARK7, LRRK2, PARK8, PINK1, PARK6, UCHL1, PARK5, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, PRKN, PARK2, PDJ, DBH, NDUFV2); レット症候群(MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, x-シヌクレイン, DJ-1); 統合失調症(ニューレグリン1(Nrg1), Erb4(ニューレグリンの受容体), コンプレキシン1(Cplx1), Tph1トリプトファンヒドロキシラーゼ, Tph2, トリプトファンヒドロキシラーゼ2, ニューレキシン1, GSK3, GSK3a, GSK3b, 5-HTT(Slc6a4), COMT, DRD(Drd1a), SLC6A3, DAOA, DTNBP1, Dao(Dao1)); セクレターゼ関連障害(APH-1(α 及び β), プレセニリン(Psen1), ニカストリン(Ncstn), PEN-2, Nos1, Parp1, Natl, Nat2); トリヌクレオチドリピート障害(HTT(ハンチントン病), SBMA/SMAX1/AR(ケネディー病), FXN/X25(フリードライヒ病), ATX3(マチャド-ジョセフ病), ATXN1及びATXN2(脊髄小脳失調症), DMPK(筋緊張性ジストロフィー), アトロフィン-1及びAtn1(DRPLA), CBP(Creb-BP - グローバルな不安定性), VLDLR(アルツハイマー), Atxn7, Atxn10)
眼の疾患及び障害	加齢黄斑変性(Abcr, Ccl2, Cc2, cp(セルロプラスミン), Timp3, カテプシンD, Vldlr, Ccr2); 白内障(CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, CRYAA, CRYA1, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BFSP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, HSF4, CTM, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1); 角膜薄濁及びジストロフィー(APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, M1S1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD); 先天性扁平角膜(KERA, CNA2); 緑内障(MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A); レーバー先天性黒内障(CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRIP1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3); 黄斑ジストロフィー(ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2)

10

20

30

40

【0174】

別段の定義がある場合を除き、この明細書で使用する全ての技術用語及び／又は学術用語は、本発明に係る当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様又は同等の方法及び材料が本発明の態様の実施又は試験に使用できるが、代表的な方法及び／又は材料を以下に記載する。矛盾する場合は、定義を含む明細書が優先される。また、材料、方法及び実施例は単に説明のためのもので、必ずしも限定することを意図したものではない。

【0175】

考察において特に言及しない限り、本発明の態様の特徴の状態又は関連性を変更する「

50

実質的に」及び「約」などの形容詞は、状態又は関連性が、意図された用途の態様の動作に許容可能な範囲内に定義されることを意味すると理解される。特に示さない限り、明細書及び特許請求の範囲における「又は」という用語は、排他的な「又は」ではなく包括的な「又は」と見なされ、結合する項目の少なくとも1つ及び任意の組合せを示す。

【0176】

本明細書における用語「1つ (a、an)」は、列挙された構成要素の「1つ以上」を指すことを理解されたい。特に断りのない限り、単数形の使用が複数形を含むことは、当業者には明らかである。したがって、用語「1つ (a、an)」及び「少なくとも1つ」は、この出願では同じ意味である。

【0177】

この教示をより理解し、かつ、決して教示の範囲を限定しないために、特に断りのない限り、量、割合又は比率を示す全ての数字、及び明細書や特許請求の範囲で使用する他の数値は、全ての場合において、用語「約」で修飾されると理解すべきである。したがって、反する指示がない限り、明細書及び特許請求の範囲に記載の数値は、得ようとする所望の特性に応じて変化する可能性がある近似値である。少なくとも、各数値は、報告された有効桁数を考慮し、通常の丸め手法を適用して解釈する必要がある。

【0178】

この明細書で数値範囲を記載する場合、本発明は、別段の説明をする場合を除き、上限と下限との間の各整数（上限及び下限を含む）を意図するものと理解される。

【0179】

この明細書及び特許請求の範囲において、動詞「含有する」、「含む」及び「有する」並びにそれらの活用形のそれぞれは、動詞の目的語が必ずしも動詞の主語の成分、要素又は部分の完全なリストではないことを示すために使用される。本明細書の他の用語は、当該技術分野において周知の意味であることを意味する。

【0180】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」及び「オリゴヌクレオチド」は、同じ意味である。それらは、任意の長さの、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又はそれらの類似体のいずれかであるヌクレオチドのポリマーの形態を指す。ポリヌクレオチドの三次元構造はいずれであってもよく、既知又は未知の機能を発揮してもよい。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子又は遺伝子断片のコード領域又は非コード領域、連鎖解析で確定した遺伝子座、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、低分子干渉RNA (siRNA)、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、単離したDNAの配列、単離したRNAの配列、核酸プローブ及びプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化したヌクレオチドやその類似体などの1つ以上の修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーのアセンブリの前又は後で行われてもよい。ヌクレオチド配列は、非ヌクレオチド要素で中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、重合後に標識成分との結合などで更に修飾してもよい。

【0181】

用語「ヌクレオチド類似体」又は「修飾ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの窒素含有塩基（例．シトシン (C)、チミン (T) 若しくはウラシル (U)、アデニン (A) 又はグアニン (G)）の中若しくは上に、ヌクレオシドの糖部分（例．リボース、デオキシリボース、修飾リボース、修飾デオキシリボース、6員糖類縁体又は開環糖類縁体）の中若しくは上に、又はリン酸部分に、1つ以上のさまざまな化学修飾（例．置換）を含むヌクレオチドを指す。本明細書に記載のRNA配列のそれぞれは、1つ以上のヌクレオチド類似体を含んでいてもよい。

【0182】

この明細書では、以下のヌクレオチド識別子が、ヌクレオチド塩基を表すために使用さ

10

20

30

40

50

れる：
【 0 1 8 3 】
【 表 C 】

ヌクレオチドの 識別子	意味する塩基			
A	A			
C		C		
G			G	
T				T
W	A			T
S		C	G	
M	A	C		
K			G	T
R	A		G	
Y		C		T
B		C	G	T
D	A		G	T
H	A	C		T
V	A	C	G	
N	A	C	G	T

10

20

【 0 1 8 4 】

この明細書では、用語「ターゲティング配列」又は「ターゲティング分子」は、特定の標的配列にハイブリダイズできるヌクレオチド配列又はヌクレオチド配列を含む分子を指し、例えば、ターゲティング配列は、その長さに沿って、ターゲティングされる配列に少なくとも部分的に相補的である。ターゲティング配列又はターゲティング分子は、C R I S P R複合体のターゲティング部分として機能するターゲティング配列を有するC R I S P Rヌクレアーゼが複合体を形成できるターゲティングR N A分子の一部であってもよい。ターゲティング配列を有する分子がC R I S P R分子と同時に存在する場合、R N A分子は、C R I S P Rヌクレアーゼを特定の標的配列にターゲティングできる。それぞれの実現可能性は個別の態様である。ターゲティングR N A分子は、所望の配列を標的とするように特別に設計できる。

30

【 0 1 8 5 】

この明細書では、用語「標的」は、ターゲティング配列又はターゲティング分子の、標的ヌクレオチド配列を有する核酸との優先的なハイブリダイゼーションを指す。用語「標的」は、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の優先的なターゲティングが存在するが、オンターゲットハイブリダイゼーションに加えて意図しないオフターゲットハイブリダイゼーションも生じ得るような、可変のハイブリダイゼーションを包含することが理解される。R N A分子が配列を標的とする場合、ヌクレアーゼ活性により、R N A分子とC R I S P Rヌクレアーゼ分子の複合体が配列を標的にすることが理解される。

40

【 0 1 8 6 】

複数の細胞に存在するD N A配列を標的とする場合、ターゲティングは、R N A分子のガイド配列部分と1つ以上の細胞における配列のハイブリダイゼーションを包含し、R N A分子と複数の細胞中の全てではない細胞における標的配列のハイブリダイゼーションも包含することが理解される。したがって、R N A分子が複数の細胞内の配列を標的とする

50

場合、RNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体は、1つ以上の細胞内で標的配列とハイブリダイズすると理解され、全てではない細胞で標的配列とハイブリダイズしてもよいことも理解される。したがって、RNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体は、1つ以上の細胞の標的配列とハイブリダイゼーションして、二本鎖切断を導入し、かつ、全てではない細胞の標的配列とハイブリダイゼーションして、二本鎖切断を導入してもよいことが理解される。この明細書では、用語「改変細胞」は、標的配列とのハイブリダイゼーション、すなわちオンターゲットハイブリダイゼーションの結果として、RNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体によって二本鎖切断された細胞を指す。

【0187】

この明細書では、用語「野生型」は、当業者が理解する技術用語で、バリエーション又は変種とは区別される、自然界に存在する生物、株、遺伝子又は特性の代表的な形態を意味する。したがって、この明細書では、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列が野生型の配列を指す場合、バリエーションは、例えば置換、欠失、挿入を含む、その配列のバリエーションを指す。この発明の複数の態様では、改変されたCRISPRヌクレアーゼは、表1に示すいずれかのCRISPRヌクレアーゼと比較して、少なくとも1つのアミノ酸修飾（例、置換、削除及び／又は挿入）を含むCRISPRヌクレアーゼのバリエーションである。

【0188】

用語「非天然」、「天然に存在しない」又は「人工」は、同じ意味で使用され、人間による改変を示す。核酸分子又はポリペプチドで使用する場合、この用語は、核酸分子又はポリペプチドが、自然界で自然に関連付けられており、かつ、自然界で見いだされる少なくとも1つの成分を少なくとも実質的に含まないことを意味してもよい。

【0189】

この明細書では、用語「アミノ酸」は、天然及び／又は非天然若しくは合成アミノ酸を含み、グリシン及びD又はIの光学異性体、並びにアミノ酸類似体及びペプチド模倣物が含まれる。

【0190】

この明細書では、「ゲノムDNA」は、対象とする細胞又は細胞群に存在する、直鎖状及び／若しくは染色体DNA並びに／又はプラスミド若しくは他の染色体外DNAの配列を指す。いくつかの態様では、対象とする細胞は真核細胞である。いくつかの態様では、対象とする細胞は原核細胞である。いくつかの態様では、この方法は、ゲノムDNA配列の所定の標的部位において二本鎖切断（DSB）を引き起こし、ゲノムの標的部位においてDNA配列の変異、挿入及び／又は欠失をもたらす。

【0191】

「真核」細胞は、真菌細胞（酵母など）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞及びヒト細胞を含むが、これらに限定されるものではない。

【0192】

この明細書では、用語「ヌクレアーゼ」は、核酸のヌクレオチドサブユニット間のホスホジエステル結合を切断できる酵素を指す。ヌクレアーゼは、天然の供給源から単離又は誘導されてもよい。天然の供給源は、任意の生物であってもよい。あるいは、ヌクレアーゼは、ホスホジエステル結合切断活性を有する修飾タンパク質又は合成タンパク質であってもよい。

【0193】

この明細書では、用語「PAM」は、標的DNA配列の近傍に位置し、CRISPRヌクレアーゼが認識する標的DNAのヌクレオチド配列を指す。PAM配列は、ヌクレアーゼによって異なってもよい。

【0194】

この明細書では、用語「変異障害」又は「変異疾患」は、変異によって生じる遺伝子の機能障害に関連する障害又は疾患を指す。変異障害として現れる機能不全遺伝子は、そのアレルの少なくとも1つに変異を含み、「疾患関連遺伝子」と呼ばれる。変異は、疾患関連遺伝子の任意の部分、例えば、調節部分、コード部分又は非コード部分に存在してもよ

10

20

30

40

50

い。変異は、置換、挿入又は欠失といった変異であってもよい。疾患関連遺伝子の変異は、劣性、ドミナントネガティブ、機能獲得、機能喪失又は遺伝子産物のハプロ不全につながる変異など、任意の変異メカニズムに従って、障害又は疾患として現れてもよい。

【0195】

当業者は、この発明の態様が、例えばプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）に隣接する対象とする標的ゲノムDNA配列と結合するCRISPRヌクレアーゼなどのヌクレアーゼと複合体を形成できるRNA分子を開示することを理解する。ヌクレアーゼは、その後、標的DNAの切断を介して、プロトスペーサー内に二本鎖切断を生成する。

【0196】

この発明の複数の態様では、CRISPRヌクレアーゼ及びターゲティング分子は、標的DNA配列に結合して標的DNA配列を切断するCRISPR複合体を形成する。CRISPRヌクレアーゼは、更なる別のtracrRNA分子なしで、CRISPRヌクレアーゼ及びRNA分子を含むCRISPR複合体を形成してもよい。あるいは、CRISPRヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ、RNA分子及びtracrRNA分子の間でCRISPR複合体を形成してもよい。

10

【0197】

用語「タンパク質結合配列」又は「ヌクレアーゼ結合配列」は、CRISPRヌクレアーゼと結合してCRISPR複合体を形成できる配列を指す。当業者は、CRISPRヌクレアーゼと結合してCRISPR複合体を形成できるtracrRNAが、タンパク質又はヌクレアーゼ結合配列を含むことを理解する。

20

【0198】

CRISPRヌクレアーゼの「RNA結合部分」は、RNA分子に結合してCRISPR複合体を形成してもよいCRISPRヌクレアーゼの部分、例えば、tracrRNA分子のヌクレアーゼ結合配列を指す。CRISPRヌクレアーゼの「活性部分」は、例えばDNAターゲティングRNA分子と複合体を形成する場合に、DNA分子を二本鎖切断するCRISPRヌクレアーゼの部分の部分を指す。

【0199】

RNA分子は、塩基対形成によってtracrRNAにハイブリダイズし、CRISPR複合体の形成を促進するように、tracrRNA分子と十分に相補的な配列を含んでもよい（例えば、米国特許第8,906,616号）。この発明の複数の態様では、RNA分子は、tracrメイト配列を更に含んでもよい。

30

【0200】

この発明の複数の態様では、ターゲティング分子は、tracrRNA分子の配列を更に含んでもよい。そのような態様は、シングルガイドRNA（sgRNA）を形成する、RNA分子のガイド部分（gRNA又はcrRNA）とトランス活性化crRNA（tracrRNA）の合成融合体として設計されてもよい（Jinek et al., Science (2012) 参照）。この発明の複数の態様は、別個のtracrRNA分子及びガイド配列部分を含む別個のRNA分子を利用してCRISPR複合体を形成してもよい。そのような態様では、tracrRNA分子は、塩基対形成によりRNA分子とハイブリダイズしてもよく、明細書に記載した本発明の特定の応用において有利であってもよい。

40

【0201】

この発明の複数の態様において、RNA分子は、RNA分子の構造を更に特定する可能性がある「ネクサス」領域及び／又は「ヘアピン」領域を含んでもよい（Briner et al., Molecular Cell (2014) 参照）。

【0202】

この明細書では、用語「直接反復配列」は、ヌクレオチド配列の特定のアミノ酸配列の2つ以上の反復を指す。

【0203】

この明細書では、CRISPRヌクレアーゼと「相互作用する」又は「結合する」ことができるRNA配列又は分子は、CRISPRヌクレアーゼとCRISPR複合体を形成

50

するRNA配列又は分子の能力を指す。

【0204】

この明細書では、用語「作動可能に連結された」は、意図した方法で機能することを可能にする2つの配列又は分子の関係（すなわち、融合、ハイブリダイゼーション）を指す。この発明の複数の態様では、RNA分子がプロモーターに作動可能に連結している場合、RNA分子及びプロモーターが意図した方法で機能できる。

【0205】

この明細書では、用語「異種プロモーター」は、天然では、発現される分子と、又は、促進される経路において、同時に見いだされないプロモーターを指す。

【0206】

この明細書では、分子の配列間のX%の塩基又はアミノ酸が同じで、同じ相対位置にある場合、配列又は分子は、それぞれの配列又は分子に対してX%の「配列同一性」を有する。例えば、第2のヌクレオチド配列との配列同一性が少なくとも95%の第1のヌクレオチド配列は、他の配列と同一の相対位置で少なくとも95%の塩基を有する。

【0207】

核局在化配列

用語「核局在化配列」及び「NLS」は、関連付けられたタンパク質の、細胞質から核膜バリアを通過する輸送を指示するアミノ酸配列／ペプチドを示し、同じ意味で使用される。用語「NLS」は、特定のペプチドの核局在化配列だけではなく、細胞質ポリペプチドの核膜バリアを通過する移行を指示できるその誘導体も包含することを意図している。NLSは、ポリペプチドのN末端、C末端又はN末端とC末端の両者に付着した場合、ポリペプチドの核移行を指示できる。さらに、ポリペプチドのアミノ酸配列中にランダムに位置するアミノ酸の側鎖にN末端又はC末端で連結したNLSを有するポリペプチドが移行する。通常、NLSはタンパク質表面に露出した正に帯電したリジン又はアルギニンの1つ以上の短い配列で構成されるが、他のタイプのNLSも知られている。NLSの非限定的な例には、SV40ウイルスラージT抗原、ヌクレオプラスミン、c-myc、hRNPA1 M9 NLS、インポーチンα由来のIBBドメイン、筋腫Tタンパク質、ヒトp53、マウスc-abl IV、インフルエンザウイルスNS1、肝炎ウイルスδ抗原、マウスMx1タンパク質、ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ及びステロイドホルモン受容体(ヒト)グルココルチコイド由来のNLS配列が含まれる。

【0208】

送達

本願のCRISPRヌクレアーゼ又はCRISPR組成物は、タンパク質、DNA分子、RNA分子、リボヌクレオタンパク質(RNP)、核酸ベクター又はそれらの組合せとして送達されてもよい。いくつかの態様では、RNA分子は化学修飾を含む。適切な化学修飾の限定的なものではない例には、2'-O-メチル(M)、2'-O-メチル-3'-ホスホリチオエート(MS)又は2'-O-メチル-3'-チオPACE(MSP)、シュードウリジン及び1-メチルシュードウリジンがある。それぞれの実現可能性はこの発明の個別の態様である。

【0209】

本願のCRISPRヌクレアーゼ及び／又はそれをコードするポリヌクレオチド、並びに、場合によっては、追加のタンパク質(例、ZFP、TALEN、転写因子、制限酵素)及び／又はガイドRNAなどのヌクレオチド分子は、適切な手段で標的細胞に送達されてもよい。標的細胞は、単離されているか否か、培養中であるか、in vitro、ex vivo、in vivo又はin plantaであるかといった任意の環境における、真核細胞又は原核細胞などの任意の細胞であってもよい。

【0210】

いくつかの態様では、送達される組成物は、ヌクレアーゼのmRNA及びガイドRNAを含む。いくつかの態様では、送達される組成物は、ヌクレアーゼのmRNA、ガイドRNA及びドナーテンプレートを含む。いくつかの態様では、送達される組成物は、CRI

10

20

30

40

50

S P Rヌクレアーゼ及びガイドRNAを含む。いくつかの態様では、送達される組成物は、C R I S P Rヌクレアーゼ、ガイドRNA、及び例えば相同性修復による遺伝子編集用のドナーテンプレートを含む。いくつかの態様では、送達される組成物は、ヌクレアーゼのmRNA、DNAターゲティングRNA及びtracrRNAを含む。いくつかの態様では、送達される組成物は、ヌクレアーゼのmRNA、DNAターゲティングRNA、tracrRNA及びドナーテンプレートを含む。いくつかの態様では、送達される組成物は、C R I S P Rヌクレアーゼ、DNAターゲティングRNA及びtracrRNAを含む。いくつかの態様では、送達される組成物は、C R I S P Rヌクレアーゼ、DNAターゲティングRNA、tracrRNA、及び、例えば相同性修復による遺伝子編集用のドナーテンプレートを含む。

10

【0211】

RNA組成物は、適切なウイルスベクター系を使用して送達できる。従来のウイルス及び非ウイルスベースの遺伝子導入法を使用して、核酸及び／又はC R I S P Rヌクレアーゼを、細胞（例．哺乳動物細胞、植物細胞など）及び標的組織に導入できる。そのような方法はまた、in vitroでコードされた核酸及び／又はC R I S P Rヌクレアーゼタンパク質を細胞に投与するために使用できる。ある態様では、核酸及び／又はC R I S P Rヌクレアーゼは、in vivo又はex vivoでの遺伝子治療のために投与される。非ウイルスベクター送達系は、裸の核酸、及びリポソーム又はポロキサマーといった送達ビヒクルと複合体を形成した核酸を含む。遺伝子治療の手順の総説については、Anderson, Science (1992); Nabel and Felgner, TIBTECH (1993); Mitani and Caskey, TIBTECH (1993); Dillon, TIBTECH (1993); Miller, Nature (1992); Van Brunt, Biotechnology (1988); Vigne et al., Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer and Perricaudet, British Medical Bulletin (1995); Haddada et al., Current Topics in Microbiology and Immunology (1995)及びYu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994)を参照。

20

【0212】

核酸及び／又はタンパク質の非ウイルス送達法には、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティックス、パーティクルガン加速、ピロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン若しくは脂質：核酸コンジュゲート、人工ビリオン、及び薬剤による核酸の取込み促進が含まれ、又は、バクテリア若しくはウイルス（例．アグロバクテリウム (Agrobacterium)、リゾビウム (Rhizobium) sp. NGR234、シノリゾボイウム メリロティ (Sinorhizobium meliloti)、メソリゾビウム ロティ (Mesorhizobium loti)、タバコモザイクウイルス、ジャガイモウイルスX、カリフラワーモザイクウイルス、キャッサババインモザイクウイルス)によって植物細胞に送達できる。例えばChung et al. Trends Plant Sci. (2006)を参照。例えば、Sonitron 2000システム (Rich-Mar)を使用したソノポレーションも、核酸の送達に使用できる。タンパク質及び／又は核酸のカチオン性脂質媒介送達も、in vivo又はin vitro送達方法として予定されている。Zuris et al., Nat. Biotechnol. (2015)、Coelho et al., N. Engl. J. Med. (2013); Judge et al., Mol. Ther. (2006)及びBasha et al., Mol. Ther. (2011)を参照。

30

40

【0213】

トランスポゾンベースの系（例．組換えSleeping Beautyトランスポゾン系又は組換えPiggyBacトランスポゾン系）といった非ウイルスベクターも、標的細胞に送達して、標的細胞で組成物の分子のポリヌクレオチド配列又は組成物の分子をコードするポリヌクレオチド配列の転移に利用してもよい。

【0214】

別の代表的な核酸送達系には、Amixa（登録商標）Biosystems (Cologne, Germany)、Maxcyte, Inc. (Rockville, Md.)、BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, Mass.) 及びCopernicus Therapeutics Inc.（例えば、米国特許第6,008,336号を参照）が提供するものが含まれる。リポフェクチンは、例えば、米国特許

50

第5,049,386号、米国特許第4,946,787号及び米国特許第4,897,355号に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている（例、Transfectam（登録商標）、Lipofectin（登録商標）及びLipofectamine（登録商標）RNAiMAX）。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適したカチオン性及び中性脂質は、国際公開第91/17424号及び同第91/16024号に開示のものが含まれる。細胞（ex vivo投与）又は標的組織（in vivo投与）への送達が可能である。

【0215】

免疫脂質複合体などの標的リボソームを含む脂質：核酸複合体の調製は、当業者に広く知られている（例えば、Crystal, Science (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. (1994); Gao and Huang, Gene Therapy (1995); Ahmad and Allen, Cancer Res., (1992); 米国特許第4,186,183号；同第4,217,344号；同第4,235,871号；同第4,261,975号；同第4,485,054号；同第4,501,728号；同第4,774,085号；同第4,837,028号及び同第4,946,787号を参照）。

【0216】

別の送達方法には、EnGeneIC送達ビヒクル（EDV）中に送達される核酸のパッケージングを使用することが含まれる。EDVは、抗体の一方のアームが標的組織に対して特異性を有し、もう一方のアームがEDVに対して特異性を有する二重特異性抗体を使用して、標的組織に特異的に送達する。抗体はEDVを標的細胞の表面に運び、次いで、EDVはエンドサイトーシスによって細胞内に運ばれる。細胞に入ると、内容物が放出される（MacDiamid et al., Nature Biotechnology (2009)参照）。

【0217】

核酸を送達するためのRNA又はDNAウイルスに基づく系の使用は、高度に進化した方法を利用して、ウイルスを体内の特定の細胞に標的化し、ウイルスのペイロードを核に輸送する。ウイルスベクターは、患者に直接投与でき（in vivo）、又は、in vitroで細胞を処理するために使用することもでき、改変細胞を患者に投与する（ex vivo）。核酸を送達するためのRNA又はDNAウイルスに基づく系には、遺伝子導入のための組換えレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス及び単純ヘルペスウイルスのベクターが含まれるが、これらに限定されるものではない。しかし、本願のRNA組成物の送達にはRNAウイルスが好ましい。また、さまざまな細胞及び標的組織において、高い形質導入効率が観察されている。本発明の核酸は、非組込みレンチウイルスによって送達してもよい。必要に応じて、レンチウイルスによるRNA送達が利用される。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼのmRNA、ガイドRNAを含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼのmRNA、ガイドRNA及びドナーテンプレートを含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼタンパク質、ガイドRNAを含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼタンパク質、ガイドRNA、及び／又は、例えば相同性修復による遺伝子編集用のドナーテンプレートを含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼのmRNA、DNAターゲティングRNA及びtracrRNAを含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼのmRNA、DNAターゲティングRNA、tracrRNA及びドナーテンプレートを含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼタンパク質、DNAターゲティングRNA、tracrRNAを含む。場合によっては、レンチウイルスはヌクレアーゼタンパク質、DNAターゲティングRNA、tracrRNA及び例えば相同性修復による遺伝子編集用のドナーテンプレートを含む。

【0218】

これまでに説明したように、本願の組成物は、非組込みレンチウイルス粒子法（例、LentiFlash（登録商標）系）を使用して標的細胞に送達できる。そのような方法は、標的細胞へのRNAの送達で標的細胞の内部で本願組成物のアセンブリをもたらすように、mRNA又は他のRNAを標的細胞に送達するために使用してもよい。国際公開第2013/014537号、同第2014/016690号、同第2016/185125号、同第2017/194902

号、同第2017/194903号も参照。

【0219】

レトロウイルスのトロピズム (tropism) は、外来エンベロープタンパク質を組み込むことによって変更でき、標的細胞の潜在的な標的を拡大する。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入又は感染できるレトロウイルスベクターであり、通常、高いウイルсила価を生み出す。レトロウイルス遺伝子導入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大6~10kbの外來配列をパッケージングできるシス作用性の長い末端反復配列で構成されている。最小限のシス作用LTRが、ベクターの複製とパッケージングに十分で、その後、治療用遺伝子を標的細胞に組み込んで、恒久的な導入遺伝子の発現を提供するために使用される。広く使用されているレトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 及びそれらの組合せに基づくものが含まれる (例えば、Buchscher Panganiban, J. Virol. (1992); Johann et al., J. Virol. (1992); Sommerfelt et al., Virol. (1990); Wilson et al., J. Virol. (1989); Miller et al., J. Virol. (1991); 国際公開第94/26877号を参照)。

10

【0220】

臨床試験において、現在、少なくとも6種のウイルスベクター法が遺伝子導入に利用でき、ヘルパー細胞株に挿入された遺伝子による欠陥ベクターの補完を含む方法を利用して、形質導入剤を生成する。

20

【0221】

pLASN及びMFG-Sは、臨床試験で使用されているレトロウイルスベクターの例である (Dunbar et al., Blood (1995); Kohn et al., Nat. Med. (1995); Malach et al., PNAS (1997))。PA317/pLASNは、遺伝子治療で使用された最初の治療用ベクターである (Blaese et al., Science (1995))。MFG-Sパッケージ化ベクターでは、50%以上の形質導入効率が観察されている (Ellem et al., Immunol Immunother. (1997); Dranoff et al., Hum. Gene Ther. (1997))。

【0222】

パッケージングされる細胞は、宿主細胞に感染できるウイルス粒子を形成するために使用される。そのような細胞には、アデノウイルスAAVをパッケージする293細胞、及びレトロウイルスをパッケージするpsi.2細胞又はPA317細胞が含まれる。遺伝子治療で使用するウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージングするプロデューサー細胞株によって得られる。ベクターは、通常、パッケージングとその後の宿主への組み込み (該当する場合) に必要な最小限のウイルス配列、発現されるタンパク質をコードする発現カセットに置き換えられる他のウイルス配列を含む。不足しているウイルス機能は、パッケージング細胞株によってトランスで供給される。例えば、遺伝子治療で使用するAAVベクターは、通常、パッケージングと宿主ゲノムへの組み込みに必要なAAVゲノムの末端逆方向反復 (ITR) 配列のみを保有する。ウイルスDNAは、他のAAV遺伝子、つまりrepとcapをコードするヘルパープラスミドを含む細胞株にパッケージ化されているが、ITR配列は欠いている。細胞株は、ヘルパーとしてアデノウイルスにも感染している。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製とヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ITR配列が欠如しているので大量にパッケージ化されていない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスがAAVより感受性である熱処理によって低減できる。さらに、AAVは、バキュロウイルス系を使用して臨床で使用する規模で生成できる (米国特許第7,479,554号参照)。

30

40

【0223】

多くの遺伝子治療において、遺伝子治療ベクターが特定の組織に高い特異性で送達されることが望ましい。したがって、ウイルスベクターは、ウイルスの外表面上にウイルス外被タンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現させることによって、目的の細胞

50

に対して特異性を有するように改変できる。リガンドは、対象とする細胞に存在することが知られている受容体に対する親和性を有するように選択される。例えば、Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995)は、モロニー Maus 白血病ウイルスが、gp70 に融合したヒトヘレグリンを発現するように改変でき、組換えウイルスは、ヒト上皮成長因子受容体を発現する特定のヒト乳癌細胞に感染することを報告した。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、ウイルスが細胞表面受容体のリガンドを含む融合タンパク質を発現する、他のウイルス-標的細胞のペアに拡張できる。例えば、繊維状ファージは、実質的に任意の細胞受容体に対して特異的な結合親和性を有する抗体断片（例、FAB 又は Fv）を提示するように改変できる。この説明は主にウイルスベクターに適用されるが、同じ原則が非ウイルスベクターにも適用できる。そのようなベクターは、特定の標的細胞による取込みを促進する取込み配列を含むように改変できる。

10

【0224】

遺伝子治療ベクターは、通常、以下に説明する全身投与（例、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下又は頭蓋内注入）又は局所適用により、個々の患者に投与することで *in vivo* 送達できる。あるいは、ベクターは、個々の患者から移植した細胞（例、リンパ球、骨髄吸引液、生検組織）やユニバーサルドナーの造血幹細胞といった細胞に *ex vivo* 送達でき、次いで、通常、ベクターを組み込んだ細胞の選択後に患者に再移植される。いくつかの態様では、mRNA の *in vivo* 及び *ex vivo* 送達、並びに RNP の送達を利用してもよい。

【0225】

診断、研究又は遺伝子治療（例、宿主生物へのトランスフェクト細胞の再注入による）のための *ex vivo* 細胞トランスフェクションは、当業者に広く知られている。好ましい態様では、細胞は、対象生物から単離され、RNA 組成物がトランスフェクトされ、対象生物（例、患者）に再注入される。*ex vivo* トランスフェクションに適したさまざまな細胞は、当業者に周知である（例えば、Freshney, "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique and Specialized Applications" (6th edition, 2010) と、その患者から細胞を単離し培養する方法についての考察で引用されている参考文献を参照）。

20

【0226】

適切な細胞には、真核及び原核細胞及び／又は細胞株が含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような細胞又はそのような細胞から生成される細胞株の非限定的な例には、COS、CHO（例、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHO-K1SV）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NSO、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293（例、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）及び perC6 細胞、任意の植物細胞（分化又は未分化）、並びにツマジロクサヨトウ（*Spodoptera fugiperda*）（Sf）といった昆虫細胞、又は、サッカロミセス（*Saccharomyces*）、ピキア（*Pichia*）及びシゾサッカロミセス（*chizosaccharomyces*）といった真菌細胞が含まれる。ある態様では、細胞株は CHO-K1、MDCK 又は HEK293 細胞株である。さらに、初代細胞を単離し、ヌクレアーゼ（例、ZFN 又は TALEN）又はヌクレアーゼ系（例、CRISPR）で処理した後に、治療対象に再導入するために、*ex vivo* で使用してもよい。適切な初代細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）、及び CD4+T 細胞又は CD8+T 細胞などであるがこれらには限定されない血球のサブセットが含まれる。適切な細胞には、例えば、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞（CD34+）、神経幹細胞及び間葉系幹細胞などの幹細胞も含まれる。

30

40

【0227】

ある態様では、幹細胞を、細胞のトランスフェクション及び遺伝子治療の *ex vivo* 手順で使用する。幹細胞を使用する利点は、*in vitro* で他の細胞型に分化できること、又は骨髄に生着する哺乳動物（細胞のドナーなど）に導入できることである。GM-CSF、IFN γ 、TNF α などのサイトカインを使用して、*in vitro* で CD34+ 細胞を臨床的に重要な免疫細胞型に分化させる方法が知られている（限定するものではない例として

50

、Inaba et al., J. Exp. Med. (1992)を参照)。

【0228】

幹細胞は、公知の方法で形質導入及び分化のために単離される。例えば、幹細胞は、CD4+及びCD8+(T細胞)、CD45+(汎B細胞)、GR-1(顆粒球)並びにIad(分化した抗原提示細胞)などの不要な細胞に結合する抗体で骨髓細胞をパニングすることで、骨髓細胞から単離される(限定するものではない例として、Inaba et al., J. Exp. Med. (1992)を参照)。いくつかの態様では、改変した幹細胞も使用できる。

【0229】

特に、本願のCRISPRヌクレアーゼは、有糸分裂後の細胞又は活発に分裂していない細胞(例、停止細胞)のゲノム編集に適している可能性がある。本発明のCRISPRヌクレアーゼを使用して編集してもよい有糸分裂後の細胞の例には、筋細胞、心筋細胞、肝細胞、骨細胞及びニューロンが含まれるが、これらには限定されない。

【0230】

治療用RNA組成物を含有するベクター(例、レトロウイルス、リポソーム等)は、in vivoでの細胞の形質導入のために生物に直接投与することもできる。あるいは、裸のRNA又はmRNAを投与できる。投与は、血液又は組織細胞との最終的な接触で分子を導入するために通常使用される、注射、注入、局所適用及びエレクトロポレーションが含まれるが、これらには限定されない経路による。そのような核酸を投与する適切な方法が利用可能で、かつ、当業者に周知であって、特定の組成物を投与する複数の経路が使用できるが、多くの場合、特定の経路が、他の経路よりも迅速かつ効果的な反応が得られる。

【0231】

導入遺伝子の免疫細胞(例、T細胞)への導入に適したベクターには、非組込みレンチウイルスベクターが含まれる。例えば米国特許出願公開第2009/0117617号を参照。

【0232】

薬学的に許容される担体は、投与される組成物により、及び、組成物を投与するために用いる方法により、部分的に決まる。したがって、利用可能な医薬組成物の適切な製剤は多種多様であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989を参照されたい。

【0233】

相同組換えによるDNA修復

用語「相同組換え修復」又は「HDR」は、例えば、DNAの二本鎖及び一本鎖切断の修復中の、細胞内のDNA損傷を修復するメカニズムを指す。HDRは、ヌクレオチド配列の相同性を必要とし、「核酸テンプレート」(この明細書では同じ意味で使用される核酸テンプレート又はドナーテンプレート)を使用して、二本鎖又は一本鎖の切断が生じた配列(例、DNA標的配列)を修復する。これは、例えば、核酸テンプレートからDNA標的配列への遺伝情報の伝達をもたらす。核酸テンプレート配列がDNA標的配列と異なり、核酸テンプレートポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの一部又は全部がDNA標的配列に組み込まれる場合、HDRは、DNA標的配列(例、挿入、削除、変異)の変更に繋がる可能性がある。いくつかの態様では、核酸テンプレートポリヌクレオチドの全体若しくは一部分、又は核酸テンプレートのコピーが、DNA標的配列の部位に組み込まれる。

【0234】

用語「核酸テンプレート」及び「ドナー」は、ゲノムに挿入又はコピーされるヌクレオチド配列を指す。核酸鋳型は、標的核酸に付加される、標的核酸の変化を鋳型とする、又は標的配列の改変に使用してもよい、例えば1つ以上のヌクレオチドの配列を含む。核酸テンプレート配列の長さは、任意、例えば2~10,000ヌクレオチド(又はその間若しくはそれらを超える任意の整数)、好ましくは約100~1,000ヌクレオチド(又はその間の任意の整数)、より好ましくは約200~500ヌクレオチドである。核酸テンプレートは、一本鎖核酸、二本鎖核酸であってもよい。いくつかの態様では、核酸テンプレートは、例えば目標位置の、標的核酸の野生型配列に対応する、例えば1つ以上のヌ

クレオチドの配列を含む。いくつかの態様では、核酸テンプレートは、例えば目標位置の、標的核酸の野生型配列に対応する、例えば1つ以上のリボヌクレオチドの配列を含む。いくつかの態様では、核酸テンプレートは修飾リボヌクレオチドを含む。

【0235】

例えば、変異遺伝子の修正又は野生型遺伝子の発現増加のための、外因性配列（「ドナー配列」、「ドナーテンプレート」又は「ドナー」ともいう）の挿入も実行できる。ドナー配列は、通常、それが配置されるゲノム配列と同一ではないということは容易に明らかである。ドナー配列は、対象とする位置で効率的なHDRを可能にするために、2つの相同領域が隣接する非相同配列を含むことができる。さらに、ドナー配列は、細胞クロマチン中の対象領域と相同ではない配列を含むベクター分子を含むことができる。ドナー分子は、細胞クロマチンと相同な不連続な領域を含むことができる。例えば、対象領域には通常存在しない配列を標的挿入するために、前記配列はドナー核酸分子中に存在でき、対象領域の配列と相同な領域に隣接できる。

【0236】

ドナーポリヌクレオチドは、一本鎖及び／又は二本鎖のDNA又はRNAであってもよく、線状又は環状の形態で細胞に導入してもよい。例えば、米国特許出願公開第2010/0047805号；同第2011/0281361号；同第2011/0207221号及び同第2019/0330620号を参照。線形の形態で導入する場合、ドナー配列の末端は、当業者知られている方法で（例えば、エキソヌクレアーゼによる分解から）保護できる。例えば、1つ以上のジデオキシヌクレオチド残基を線状分子の3'末端に付加し、及び／又は自己相補的オリゴヌクレオチドを一方の末端又は両末端に連結する。例えば、Chang and Wilson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987); Nehls et al., Science (1996)を参照。外因性のポリヌクレオチドを分解から保護する他の方法には、末端アミノ基の付加、及び修飾ヌクレオチド間結合（例、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、及びO-メチルリボース又はデオキシリボース残基）の使用が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0237】

したがって、修復にドナー鋳型を使用する本発明の態様は、線状又は環状の形態で細胞に導入できる一本鎖及び／又は二本鎖のドナーテンプレートである、DNA又はRNAを使用してもよい。本発明の態様において、遺伝子編集組成物は、(1)修復前に遺伝子を二本鎖切断するガイド配列を含むRNA分子、及び、(2)修復のためのドナーRNAテンプレートを含み、ガイド配列を含むRNA分子は第1のRNA分子で、ドナーRNAテンプレートは第2のRNA分子である。いくつかの態様では、ガイドRNA分子及びテンプレートRNA分子は、1つの分子の一部としてつながっている。

【0238】

ドナー配列は、オリゴヌクレオチドであってもよく、遺伝子修正又は内在性配列の標的化による改変に使用してもよい。オリゴヌクレオチドは、ベクターにより細胞に導入してもよく、細胞にエレクトロポレーションしてもよく、又は当該技術分野において知られている他の方法で導入してもよい。オリゴヌクレオチドは、内因性遺伝子（例、βグロビンの鎌状変異）の変異配列の「修正」のために使用でき、又は、内因性遺伝子座に所望の目的で配列を挿入するために使用してもよい。

【0239】

ポリヌクレオチドは、例えば、複製起点、プロモーター及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクター分子の一部として細胞に導入できる。さらに、ドナーポリヌクレオチドは、裸の核酸として、リボソーム、ポロキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として導入でき、又は組換えウイルス（例、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス及びインテグラーゼ欠損レンチウイルス（IDLV））によって送達できる。

【0240】

ドナーは、一般に、その発現が組込み部位の内因性プロモーター、すなわちドナーが挿

入される内因性遺伝子の発現を駆動するプロモーターによって駆動されるように挿入される。しかし、ドナーがプロモーター及び／又はエンハンサー、例えば構成的プロモーター又は誘導性若しくは組織特異的プロモーターを含んでもよいことは明らかである。

【0241】

ドナー分子は、内因性遺伝子の全て若しくは一部が発現するように、又は全く発現しないように、内因性遺伝子に挿入されてもよい。例えば、本願の導入遺伝子は、例えば導入遺伝子との融合物として、内因性配列の一部（導入遺伝子のN末端及び／又はC末端）が発現されるか、又は全く発現されないように、内因性遺伝子座に挿入されてもよい。他の態様では、導入遺伝子（例．内因性遺伝子などの追加のコード配列の有無によらない）は、セーフハーバー遺伝子座（例．CCR5遺伝子、CXCR4遺伝子、PPP1R12c（AAVS1としても知られている）遺伝子、アルブミン遺伝子又はRosa遺伝子）など、任意の内因性遺伝子座に組み込まれる。例えば、米国特許第7,951,925号及び同第8,110,379号；米国特許出願公開第2008/0159996号；同第20100/0218264号；同第2010/0291048号；同第2012/0017290号；同第2011/0265198号；同第2013/0137104号；同第2013/0122591号；同第2013/0177983号及び同第2013/0177960号、並びに米国仮出願第61/823,689号を参照）。

10

【0242】

内因性の配列（内因性又は導入遺伝子の一部）を導入遺伝子と共に発現させる場合、内因性配列は全長配列（野生型又は変異体）であっても部分配列であってもよい。好ましくは、内因性配列は機能的である。これらの全長又は部分配列の機能の非限定的な例には、導入遺伝子（例：治療遺伝子）によって発現され、及び／又は担体として作用するポリペプチドの半減期の増加が含まれる。

20

【0243】

さらに、発現に必須ではないものの、外因性の配列は、転写又は翻訳調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、内部リボソーム侵入部位、2Aペプチドをコードする配列及び／又はポリアデニル化シグナルも含んでいてもよい。

【0244】

ある態様では、ドナー分子は、タンパク質をコードする遺伝子（例．細胞若しくは個体で欠けているタンパク質をコードするコード配列、又はタンパク質をコードする遺伝子の別のバージョン）、調節配列及び／又はマイクロRNA若しくはsiRNAといった構造核酸をコードする配列からなる群から選択される配列を含む。

30

【0245】

これまでに説明した態様は互いに適用可能であることが意図されている。例えば、本発明のRNA分子又は組成物は、本発明の方法で利用してもよいことが理解される。

【0246】

この明細書では、全ての見出しは単に整理のためであって、いかなる方法でも開示を制限することを意図するものではない。個々の項の内容は、全ての項に等しく適用できる。

【0247】

本発明の追加の目的、利点及び新規な特徴は、限定を意図しない以下の実施例を検討することで、当業者に明らかになる。さらに、これまでに説明し、また、特許請求の範囲に記載する本発明のさまざまな態様及び側面のそれぞれは、以下の実施例で実験的に裏付けられている。

40

【0248】

明確にするために、別々の態様として説明する本発明の特徴は、一つの態様で組み合わせ提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔にするために、一つの態様として説明する本発明のさまざまな特徴は、別個に、適切なサブコンビネーションとして、又は本発明の他の態様で適切に提供されてもよい。態様がそれらの要素がなくては機能しない場合を除き、さまざまな態様として記述した特定の特徴は、それらの態様の本質的な特徴であると考えべきではない。

【0249】

50

一般に、この明細書で使用する命名法及びこの発明で利用する実験の手順には、分子、生化学、微生物学及び組換えDNA技術が含まれる。そのような技術は文献に十分に記載されている。例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A laboratory Manual" (1989); Ausubel, R. M. (Ed.), "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (Eds.), "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 米国特許第4,666,828号; 同第4,683,202号; 同第4,801,531号; 同第5,192,659号及び同第5,272,057号に示された方法; Cellis, J. E. (Ed.), "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III (1994); Freshney, "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" Third Edition, Wiley-Liss, N. Y. (1994); Coligan J. E. (Ed.), "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III (1994); Stites et al. (Eds.), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (Eds.), "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); Clokie and Kropinski (Eds.), "Bacteriophage Methods and Protocols", Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions (2009)を参照、これらは全て参照により組み込まれる。

10

20

他の一般的な参考資料は、この明細書全体で提供している。

【0250】

本発明の完全な理解を容易くするために、以下に実施例を提供する。以下の実施例は、本発明を製造し、実施する代表的な様式を説明するものである。しかし、この発明の範囲は、これらの実施例に開示された特定の態様に限定されるものではなく、これらは例示のみを目的とするものである。

【実施例】

【0251】

実験の詳細

30

本発明のより完全な理解を容易にするために、以下に実施例を示す。以下の実施例は、本発明を生み出し、実施する例示的な様式を説明するものである。しかし、本発明の範囲は、これらの実施例に開示された特定の態様に限定されるものではなく、これらは例示のみを目的とする。

【0252】

CRISPR反復 (crRNA)、トランス活性化RNA (tracrRNA)、ヌクレアーゼのポリペプチド (OMNI) 及びプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列を、環境サンプルの配列のさまざまなメタゲノムのデータベースから予測した。

【0253】

OMNIヌクレアーゼポリペプチドの構築

40

新規なヌクレアーゼポリペプチド (OMNI) を構築するために、いくつかのOMNIのオープンリーディングフレームを、ヒト細胞系での発現のためにコドン最適化した。ORFを、細菌発現プラスミドpET9a及び哺乳動物発現プラスミドpMOMNIにクローニングした (表4)。

【0254】

sgRNAの予測及び構築

各OMNIについて、それぞれの細菌ゲノムでCRISPR反復配列及びトランス活性化crRNAを検出することにより、シングルガイドRNA (sgRNA) を予測した。in silicoにおいて、ネイティブで未成熟のcrRNA及びtracrRNA配列をテトラープ「gaaa」と接続し、RNA二次構造予測ツールを使用して、デュプレックス

50

の二次構造要素を予測した。

【0255】

全デュプレックスRNA要素（crRNA-tracrRNAキメラ）の予測した二次構造を、sgRNAの設計のための可能なtracrRNA配列の特定に使用した。考えられるsgRNA足場を、上部ステムの異なる位置でデュプレックスを短縮することで構築した（全てのOMNIのsgRNA設計を表2に示す）。さらに、転写及び構造による制約を克服し、ヒト細胞でのsgRNA足場の可塑性を評価するために、場合によって、考えられるsgRNAのヌクレオチド配列に小さな変更を加えた（図1、表2）。最後に、各OMNIについて、最大で3バージョンの設計可能な足場を合成し、下流に22ヌクレオチドの万能で独特なスペーサー配列（T2、配列番号268）を接続し、哺乳動物発現用のU6プロモーターと組み合わせた誘導性T7プロモーターの下で、細菌発現プラスミドにクローニングした（pShuttleGuide、表4）。

T2 - GGAAGAGCAGAGCCTTGGTCTC（配列番号268）

【0256】

TXTLによるin vitro枯渇アッセイ

in vitroでのPAM配列の枯渇をMaxwell et al, Methods, 2018に示された方法で追跡した。簡潔に述べると、OMNIヌクレアーゼを発現する線形DNAとT7プロモーター下のsgRNAを、T7ポリメラーゼを発現する線形構築物と共に無細胞転写翻訳in vitro系（TXTLミックス、Arbor Bioscience）に加えた。TXTLミックスでのRNAの発現とタンパク質翻訳により、RNP複合体が形成される。線状のDNAを使用したため、Chi6 DNA配列をTXTL反応ミックスに加えて、RecBCDのエキソヌクレアーゼ活性を阻害し、直鎖状DNAを分解から保護した。sgRNAスペーサーは、PAM配列の8Nランダム化セットに隣接する標的となるプロトスペーサー（pbPOST2ライブラリー、表4）を含むプラスミドのライブラリーを標的とするように設計されている。切断されたライブラリーと非標的gRNAを発現する対照ライブラリーの両者に、必要なアダプターとインデックスを追加するために、PCRを使用して、ライブラリーからのPAM配列の枯渇を、ハイスループットシーケンシングによって測定した。ディープシーケンシングの後、OMNIヌクレアーゼによる機能的DNAの切断を示す、対照での出現と比較した、同じPAM配列を有する枯渇配列の割合により、in vitroでの活性を確認した（図2～18、表3）。

【0257】

ヒト細胞での内因性のゲノム標的に対する活性

OMNIのヒト細胞におけるゲノムの特定の位置の編集を促進する能力もアッセイした。この目的のために、各OMNIごとに、対応するOMNI-P2A-mCherry発現ベクター（表4）を、ヒトゲノムの特定の位置を標的とするように設計されたsgRNAと共に、HeLa細胞にトランスフェクトした（pShuttleガイド表4、スペーサー配列表5）。72時間後に、細胞を回収した。得られた細胞の半分を、マーカーとしてmCherry蛍光を使用するFACSによるトランスフェクション効率の定量に使用した。得られた細胞の残りの半分を溶解し、そのゲノムDNAを使用して、対応する推定ゲノム標的をPCR増幅した。アンプリコンを次世代配列決定（NGS）し、得られた配列を使用して、各標的部位における編集率を計算した。切断部位の周囲での短い挿入又は欠失（インデル）は、ヌクレアーゼによるDNA切断後のDNA末端の修復の典型的な結果である。したがって、編集率の計算は、各アンプリコン内の配列を含有するインデルの割合から推定した。

【0258】

それぞれが異なるゲノム上の位置を標的とするように設計された少なくとも6つのsgRNAのパネルを使用して、各OMNIのゲノム活性を評価した。これらの実験の結果を表5にまとめる。この表（列6、「インデル率」）から理解できるように、いくつかのOMNIは、試験を行った大部分又は一部の標的部位における編集レベルが高く、意味があった。

【0259】

RNP複合体の一部としてのOMNI-127の別の結果

OMNI-127タンパク質の精製

pET28a中のOMNI-127構築物をBL-21細胞（NEB）中で発現させた。細胞をAIM+0.4%グリセロール中で増殖させ、37℃で23時間かけて発現させた。細胞を化学的に溶解し、透明な溶解物をNi-NTA樹脂で精製した。Ni-NTA溶出画分をCEX（SO3フラクトゲル）樹脂で精製し、続いてSuperdex（登録商標）200 Increase 10/300 GL, AKTA Pure（GE Healthcare Life Sciences）によりSEC精製した。OMNI-127タンパク質を有する画分をプールし、25mg/mlに濃縮し、液体窒素中で急速冷凍し、-80℃で保存した。

10

【0260】

in vitroでのOMNI-127RNPの切断活性

3'末端及び5'末端に3つの2'-O-メチル3'-ホスホロチオエート（Agilent）を有するOMNI-127のsgRNAを合成した。

【0261】

ELANEg135ガイドを用い、in vitroでOMNI-127RNPの活性を分析した（表6、図2A）。簡潔に説明すると、OMNI-127ヌクレアーゼ10pmolと合成したガイド20pmolを混合した。室温で10分間インキュベートした後、RNP複合体を4、2、1、0.5pmolに段階希釈し、抽出したゲノムDNAからELANEg135標的を増幅することで調製した線状DNAテンプレート40ngと反応させた。OMNI-127は、ELANEテンプレートを完全に切断し、高い切断活性が示された（図19A）。

20

【0262】

U2OS細胞におけるRNPの編集活性によるOMNI-127のガイド最適化

哺乳動物細胞でスペーサー長を最適化した。さまざまなスペーサー長（20～24ヌクレオチド、表6）の合成ガイド120μM及びCas9エレクトロポレーションエンハンサー（IDT）100μMと、ヌクレアーゼ100μMを混合して、RNPを組み立てた。室温で10分間インキュベートした後、RNP複合体を予め洗浄したU2OS細胞200,000個と混合し、Lonza SE Cell Line 4D-Nucleofector™ X KitとDN100を使用して、製造業者のプロトコルに従ってエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの72時間後、細胞を溶解し、ゲノムDNAを抽出した。対応するゲノム標的をPCRで増幅した。アンプリコンを次世代配列決定（NGS）し、得られた配列を使用して、編集率を計算した。図19B及び表7から理解できるように、OMNI-127は、全てのスペーサー長で編集レベルが高かった。

30

【0263】

ヒト細胞におけるRNP複合体の一部としてのOMNI-127編集活性

RNP複合体の一部としてのOMNI-127タンパク質の活性がU2OS細胞で観察され（表7、図19C）、同等の活性がHSC-MLP2細胞でも観察された（表8）。HSC実験では、合成ガイド（表6）120μM及びCas9エレクトロポレーションエンハンサー（IDT）100μMと、ヌクレアーゼ100μMを混合して、RNPを組み立てた。室温で10分間インキュベートした後、RNP複合体を予め洗浄したHSC-MLP2細胞250,000個と混合し、Lonza P3 Cell Line 4D-Nucleofector™ X KitとCA137を使用して、製造業者のプロトコルに従ってエレクトロポレーションした。72時間後に細胞を溶解し、ゲノムDNA標的をPCRで増幅した。アンプリコンをNGSし、得られた配列を使用して、編集率を計算した。OMNI-127を、ELANE-g135及びg136のガイドを用いて試験した。OMNI-127は、2つのELANEガイド（g135、g136）で編集を示した。

40

【0264】

50

【表 1 - 1】

表1 - OMNI CRISPRヌクレアーゼの配列

OMNI 名称	OMNI アミノ酸 配列の配 列番号	OMNI を コードす る DNA 配列の配 列番号	ヒ細胞で 発現する ためにコ ン最適化し た DNA 配 列の配列 番号	不活化 RuvCドメ インを有する ニックアーゼ	不活化 HNHドメ インを有するニッ クアーゼ	不活化 RuvC 及び HNHド メインを有する触媒活性の ないヌクレアーゼ
OMNI- 115	1	18	35	(D9 又は E532 又は H755 又は D758)	(D611 又は H612 又は N635)	(D9 又は E532 又は H755 又は D758)及び(D611 又 は H612 又は N635)
OMNI- 124	2	19	36	(D8 又は E502 又は H737 又は D740)	(D589 又は H590 又は N613)	(D8 又は E502 又は H737 又は D740)及び(D589 又 は H590 又は N613)
OMNI- 127	3	20	37	(D9 又は E480 又は H704 又は D707)	(D562 又は H563 又は N586)	(D9 又は E480 又は H704 又は D707)及び(D562 又 は H563 又は N586)
OMNI- 144	4	21	38	(D11 又は E533 又は H768 又は D771)	(D618 又は H619 又は N642)	(D11 又は E533 又は H768 又は D771)及び (D618 又は H619 又は N642)
OMNI- 145	5	22	39	(D11 又は E531 又は H766 又は D769)	(D616 又は H617 又は N640)	(D11 又は E531 又は H766 又は D769)及び (D616 又は H617 又は N640)
OMNI- 146	6	23	40	(D11 又は E533 又は H768 又は D771)	(D618 又は H619 又は N642)	(D11 又は E533 又は H768 又は D771)及び (D618 又は H619 又は N642)
OMNI- 147	7	24	41	(D11 又は E531 又は H766 又は D769)	(D616 又は H617 又は N640)	(D11 又は E531 又は H766 又は D769)及び (D616 又は H617 又は N640)
OMNI- 148	8	25	42	(D11 又は E533 又は H765 又は D768)	(D618 又は H619 又は N642)	(D11 又は E533 又は H765 又は D768)及び (D618 又は H619 又は N642)
OMNI- 149	9	26	43	(D11 又は E531 又は H766 又は D769)	(D616 又は H617 又は N640)	(D11 又は E531 又は H766 又は D769)及び (D616 又は H617 又は N640)
OMNI- 159	10	27	44	(D8 又は E508 又は H727 又は D730)	(D589 又は H590 又は N613)	(D8 又は E508 又は H727 又は D730)及び(D589 又 は H590 又は N613)

10

20

30

40

【 0 2 6 5 】

【表 1 - 2】

OMNI 名称	OMNI アミノ酸配列の配列番号	OMNI をコードする DNA 配列の配列番号	ヒト細胞で発現するためにコード最適化した DNA 配列の配列番号	不活化 RuvC ドメインを有するニッカーゼ	不活化 HNH ドメインを有するニッカーゼ	不活化 RuvC 及び HNH ドメインを有する触媒活性のないヌクレアーゼ
OMNI-218	11	28	45	(D10 又は E597 又は H856 又は D859)	(E683 又は H684 又は N707)	(D10 又は E597 又は H856 又は D859)及び (E683 又は H684 又は N707)
OMNI-237	12	29	46	(D14 又は E778 又は H990 又は D993)	(D858 又は H859 又は N882)	(D14 又は E778 又は H990 又は D993)及び (D858 又は H859 又は N882)
OMNI-248	13	30	47	(D9 又は E809 又は H1033 又は D1036)	(D892 又は H893 又は N916)	(D9 又は E809 又は H1033 又は D1036)及び (D892 又は H893 又は N916)
OMNI-251	14	31	48	(D11 又は E846 又は H1094 又は D1097)	(D939 又は H940 又は N963)	(D11 又は E846 又は H1094 又は D1097)及び (D939 又は H940 又は N963)
OMNI-252	15	32	49	(D11 又は E845 又は H1093 又は D1096)	(D938 又は H939 又は N962)	(D11 又は E845 又は H1093 又は D1096)及び (D938 又は H939 又は N962)
OMNI-253	16	33	50	(D11 又は E846 又は H1094 又は D1097)	(D939 又は H940 又は N963)	(D11 又は E846 又は H1094 又は D1097)及び (D939 又は H940 又は N963)
OMNI-259	17	34	51	(D9 又は E779 又は H989 又は D992)	(D857 又は H858 又は N881)	(D9 又は E779 又は H989 又は D992)及び (D857 又は H858 又は N881)

表1 OMNIヌクレアーゼの配列 表1に、OMNI 名称、対応するヌクレアーゼタンパク質配列、その DNA 配列、ヒトに最適化したその DNA 配列、不活性化 RUV Cドメインを有するニッカーゼを得るために置換する位置、不活性化 HNH ドメインを有するニッカーゼを得るために置換する位置、並びに、不活性化RUV C及びH NHドメインを有する触媒活性のないヌクレアーゼを得るために置換する位置を示す。他のアミノ酸への置換は、不活性化するための、HNH ドメインにおけるアスパラギン酸(D)からグルタミン酸(E)へ、又はグルタミン酸(E)からアスパラギン酸(D)への置換を除き、列5～7に示したアミノ酸位置のそれぞれで許容される。

【 0 2 6 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表2 - OMNIガイドRNA及び足場RNAの配列

		sgRNA 115 を伴う OMNI-115	sgRNA 124 を伴う OMNI-124
crRNA:tracrRNA テンプレートの レックス V1	crRNA (リポーター)	GUUAUAGUUGCCUUUC (配列番号 52)	GUUUUAGUACCUGGAGAAA (配列番号 65)
	crRNA 1 の一部	GUUAUAGUUGCCUUU (配列番号 53)	GUUUUAGUACCUGGA (配列番号 66)
	crRNA 2 の一部	GUUAUAGUUGCC (配列番号 54)	GUUUUAGUACCU (配列番号 67)
	crRNA 3 の一部	GUUAUAGUUG (配列番号 55)	GUUUUAGUAC (配列番号 68)
	tracrRNA (アンチリポーター)	GAAAGGUAACUAUAAU (配列番号 56)	UUUCUUCAGACCUACUAAAAU (配列番号 69)
	tracrRNA 1 の一部	AAAGGUAACUAUAAU (配列番号 57)	UUCAGACCUACUAAAAU (配列番号 70)
	tracrRNA 2 の一部	GGUAACUAUAAU (配列番号 58)	AGACCUACUAAAAU (配列番号 71)
	tracrRNA 3 の一部	UAACUAUAAU (配列番号 59)	ACCUACUAAAAU (配列番号 72)
tracrRNA 配列	tracrRNA 部分 1	AAUCGAGAAUUUCGAGU (配列番号 60)	AAGGAUUUUAUCCGAAAGA (配列番号 73)
	tracrRNA 部分 1-その一部	記載なし	GGAUUUUAUCC (配列番号 74)
	tracrRNA 部分 2	AGGGCUCUAACUUUCGAGUUAUCCCUAAUUUC (配列番号 61)	AUUUUUGUAAAUGAAGAAAAU AAGGC (配列番号 75)
	tracrRNA 部分 3	AAGCAACUGUUUCAUACAGUUGCUUUUUU (配列番号 62)	GAGAAAGGAUGCUGACGGGCAUCCUUUUUU (配列番号 76)
	tracrRNA 部分 3-ホリ T	AAGCAACUGUUUCAUACAGUUGC (配列番号 63)	GAGAAAGGAUGCUGACGGGCAUCC (配列番号 77)
sgRNA パー ジョン	sgRNA V1	GTTATAGTTGCCTTTCgaaaGAAAGGTAACATAATAATCGAGAATTTCGAGTAGGGCTCTAACTTTCGAGTTATCCCTTATTTCAAGCAACTGTTTCATACAGTTGCTTTTTT (配列番号 64)	GTTTTAGTACCTGGAGAAAgaaaTTTCTTCAGACCTACTAAAATAAGGATTTATTCCGAAAGAATTTTGTAATGAAGAAAAATAAGGCAGAGAAAGGATGCTGACGGGCA TCCTTTTTT (配列番号 78)
	sgRNA V2	記載なし	GTTTAAGTACCTGGAGAAAgaaaTTTCTTCAGACCTACTTAAATAAGGATTTATTCCGAAAGAATTATGTAAATGAAGAAAAATAAGGCAGAGAAAGGATGCTGACGGGCA TCCTTTTTT (配列番号 79)
	sgRNA V2 crRNA (リポーター)	記載なし	GUUUAAGUACCUGGAGAAA (配列番号 80)
	sgRNA V2 crRNA (アンチリポーター)	記載なし	UUUCUUCAGACCUACUTAAAU (配列番号 81)

10

20

30

40

【 0 2 6 7 】

【表 2 - 2】

表2(続き) - OMNIガイドRNA及び足場RNAの配列

		sgRNA 127 を伴う OMNI-127	sgRNA 1449 を伴う OMNI-144、145、146、147、148 及び 149
crRNA:tracrRNA デュプレックス V1	crRNA (リポート)	GUUUUGUUACCAUAUGGAU (配列番号 82)	GUUUUAGCUCAAUGUUGG (配列番号 98)
	crRNA 1 の一部	GUUUUGUUACCAUAU (配列番号 83)	GUUUUAGCUCAAUGU (配列番号 99)
	crRNA 2 の一部	GUUUUGUUACCA (配列番号 84)	GUUUUAGCUCAA (配列番号 100)
	crRNA 3 の一部	GUUUUGUUAC (配列番号 85)	GUUUUAGCUC (配列番号 101)
	tracrRNA (アンチリポート)	AUCUAUAUGACCUAACAAAAC (配列番号 86)	CCAACAUGUUCUAAGAU (配列番号 102)
	tracrRNA 1 の一部	AUAUGACCUAACAAAAC (配列番号 87)	ACAUGUUCUAAGAU (配列番号 103)
	tracrRNA 2 の一部	UGACCUAACAAAAC (配列番号 88)	UGUUCUAAGAU (配列番号 104)
	tracrRNA 3 の一部	ACCUAACAAAAC (配列番号 89)	GUUCUAAGAU (配列番号 105)
tracrRNA 配列	tracrRNA 部分 1	AAGGGUUUAUCCCGGAUUC (配列番号 90)	AAGGCAUUAUGGCC (配列番号 106)
	tracrRNA 部分 1-その一部	GGGUUUUAUCCC (配列番号 91)	GGCAUUAUGGCC (配列番号 107)
	tracrRNA 部分 2	GGCUCCUUUAUAGGAGCCUUU (配列番号 92)	GUGGGGUUAUAGCAGUAACCGACA (配列番号 108)
	tracrRNA 部分 2-ホリT	GGCUCCUUUAUAGGAGCC (配列番号 93)	記載なし
	tracrRNA 部分 3	記載なし	AGCAAUCUGCUCU (配列番号 109)
	tracrRNA 部分 4	記載なし	GAAAGGCUGUAUGAAGAUCUUCUUUAUACAGCCUUUUUU (配列番号 110)
	tracrRNA 部分 4-ホリT	記載なし	GAAAGGCUGUAUGAAGAUCUUCUUUAUACAGCC (配列番号 111)
sgRNA パーシジョン	sgRNA V1	GTTTTGTTACCATATGGATgaaaATCTATATGACCTAACAAAACAAAGGGTTTATCCCGGATTCGGCTCTTTATAGGAGCCTTTTTT (配列番号 94)	GTTTTAGCTCAATGTTGGgaaaCCAACATGTTCTAAGATAAGGCATATGGCCGTGGGGTATAGCAGTAACCGACAAGCAATCTGCTCCTGAAAGGCTGTATGAAGATCTTCTTATACAGCCTTTTTT (配列番号 112)
	sgRNA V2	GTTTAGTTACCATATGGATgaaaATCTATATGACCTAACTAAACAAAGGGTTTATCCCGGATTCGGCTCTTTATAGGAGCCTTTTTT (配列番号 95)	GTCTTAGCTCAATGTTGGgaaaCCAACATGTTCTAAGATAAGGCATATGGCCGTGGGGTATAGCAGTAACCGACAAGCAATCTGCTCCTGAAAGGCTGTATGAAGATCTTCTTATACAGCCTTTTTT (配列番号 113)
	sgRNA V2 crRNA (リポート)	GUUUAGUUACCAUAUGGAU (配列番号 96)	GUCUUAGCUCAAUGUUGG (配列番号 114)
	sgRNA V2 crRNA (アンチリポート)	AUCUAUAUGACCUAACTAAAC (配列番号 97)	記載なし

【 0 2 6 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

表2(続き) — OMNIガイドRNA及び足場RNAの配列

		sgRNA 159 を伴う OMNI-159	sgRNA 218 を伴う OMNI-218
crRNA:tracrRNA テュプレックス V1	crRNA (リポソーム)	GUUGUAGUUCCCUAUUUGU (配列番号 115)	GUUGUGGUUUGAUGAU (配列番号 128)
	crRNA 1 の一部	GUUGUAGUUCCCUAU (配列番号 116)	GUUGUGGUUUGAUGA (配列番号 129)
	crRNA 2 の一部	GUUGUAGUUCCC (配列番号 117)	GUUGUGGUUUGA (配列番号 130)
	crRNA 3 の一部	GUUGUAGUUC (配列番号 118)	GUUGUGGUUU (配列番号 131)
	tracrRNA (アンチリポソーム)	ACAAUUAGGUUACUAUGAU (配列番号 119)	AUCAUCAAUCACAAU (配列番号 132)
	tracrRNA 1 の一部	UUAGGUUACUAUGAU (配列番号 120)	UCAUCAAUCACAAU (配列番号 133)
	tracrRNA 2 の一部	GGUUACUAUGAU (配列番号 121)	UCAAUCACAAU (配列番号 134)
	tracrRNA 3 の一部	UUACUAUGAU (配列番号 122)	AAAUACACAAU (配列番号 135)
tracrRNA 配列	tracrRNA 部分 1	AAGGUAGUAUACCGC (配列番号 123)	AAGGCUAUAUGCC (配列番号 136)
	tracrRNA 部分 1 -その一部	GGUAGUAUACC (配列番号 124)	GGCUAUAUGCC (配列番号 137)
	tracrRNA 部分 2	AAAGCUCUAACGCCCCGUCUUUGACGGGGCGUUAUCUUUUUU (配列番号 125)	GAAGGAUGAAUCCUAUC (配列番号 138)
	tracrRNA 部分 2 - ホリ T	AAAGCUCUAACGCCCCGUCUUUGACGGGGCGUUAUC (配列番号 126)	記載なし
	tracrRNA 部分 3	記載なし	GCCUCUCUUCUGGAGAGGCUUUUU (配列番号 139)
	tracrRNA 部分 3 -ホリ T	記載なし	GCCUCUCUUCUGGAGAGGC (配列番号 140)
sgRNA パーティション	sgRNA V1	GTTGTAGTTCCCTATTTGTgaaaACAATTAGGTTACTATGATAAGGTAGTATACCGCAAAGCTCTAACGCCCGTCTTTGACGGGGCGTTATCTTTTTT (配列番号 127)	GTTGTGGTTTGATGATgaaaATCATCAAATCACATAAGGCTATATGCCGAAGGATGAATTCCTATCGCCTCTCTTCTGGAGAGGCTTTTTT (配列番号 141)

【 0 2 6 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

表2(続き) — OMNIガイドRNA及び足場RNAの配列

		sgRNA 237 を伴う OMNI-237	sgRNA 248 を伴う OMNI-248	
crRNA:tracrRNA テンプル レックス V1	crRNA (リポ ート)	GUUUGAGAGUAGUGUAA (配列 番号 142)	GUUUGAGUGUAAUGUA (配列番 号 156)	10
	crRNA 1 の 一部	GUUUGAGAGUAGUGU (配列番 号 143)	GUUUGAGUGUAAUGU (配列番 号 157)	
	crRNA 2 の 一部	GUUUGAGAGUAG (配列番号 144)	GUUUGAGUGUAA (配列番号 158)	
	crRNA 3 の 一部	GUUUGAGAGU (配列番号 145)	GUUUGAGUGU (配列番号 159)	
	tracrRNA (アン チリポート)	UUACACUACAAGUUCAAAU (配 列番号 146)	UACAUUACAAAGUUCAAAU (配 列番号 160)	
	tracrRNA 1 の一部	ACACUACAAGUUCAAAU (配列 番号 147)	ACAUUACAAAGUUCAAAU (配 列番号 161)	
	tracrRNA 2 の一部	CUACAAGUUCAAAU (配列番号 148)	UUACAAAGUUCAAAU (配列番号 162)	
	tracrRNA 3 の一部	ACAAGUUCAAAU (配列番号 149)	ACAAAGUUCAAAU (配列番号 163)	
tracrRNA 配列	tracrRNA 部 分 1	AAAAAUUUUAUUCAAAUCCUUU UGCUGCAUUGUGCAGAAUCU (配列番号 150)	AAGCUUUAAGCGAAAUCAUA (配列番号 164)	20
	tracrRNA 部 分 1 -その一 部	記載なし	GCUUUAAGC	
	tracrRNA 部 分 2	AAAGAUCUGGAAACAGAUUU UUUUU (配列番号 151)	GAGAAGCAGUGCUUCUCAUUU UUUU (配列番号 165)	
	tracrRNA 部 分 2 - ホリ T	AAAGAUCUGGAAACAGAU (配 列番号 152)	GAGAAGCAGUGCUUCUCA (配 列番号 166)	
sgRNA パー ジョン	sgRNA V1	GTTTGAGAGTAGTGTAAGaaaTT ACACTACAAGTTCAAATAAAAA TTTATTCAAATCCTTTTGCTGCA TTGTGCAGAATCTAAAGATCTG GAAACAGATCTTTTTTT (配列番 号 153)	GTTTGAGTGTAATGTAGaaaTACA TTACAAAGTTCAAATAAGCTTT AAGCGAAATCATAGAGAAGCA GTGCTTCTCATTTTTTT (配列番 号 167)	30
	sgRNA V2	GTTTGAGAGTAGTGTAAGaaaTT ACACTACAAGTTCAAATAAAAA TTTATTCAAATCCTTCTGCTGCA TTGTGCAGAATCTAAAGATCTG GAAACAGATCTTTTTTT (配列番 号 154)	記載なし	
	sgRNA V2 tracrRNA 部 分 1 の改変	AAAAAUUUUAUUCAAAUCCUUC UGCUGCAUUGUGCAGAAUCU (配列番号 155)	記載なし	

【 0 2 7 0 】

【表 2 - 5】

表2(続き) — OMNIガイドRNA及び足場RNAの配列

		sgRNA 2512 を伴う OMNI-251 及び OMNI-252	sgRNA 253 を伴う OMNI-253
crRNA:tracrRNA テンプレックス V1	crRNA (リポート)	GUUUGCUAGGUG (配列番号 168)	GUUUGCUAGGUG (配列番号 177)
	crRNA 3 の一部	GUUUGCUAGG (配列番号 169)	GUUUGCUAGG (配列番号 178)
	tracrRNA (アンチリポート)	CACAGUUGCGUGC (配列番号 170)	CACAGCUGCGUGCAAAU (配列番号 179)
	tracrRNA 3 の一部	CAGUUGCGUGC (配列番号 171)	GCUGCGUGCAAAU (配列番号 180)
tracrRNA 配列	tracrRNA 部分 1	AAAUAAGUCACUUUGUGGCGCAUCCAUG (配列番号 172)	AAGUCACUUUGUGGCGUAUCCAUAACU (配列番号 181)
	tracrRNA 部分 1 -その一部	GUCACUUUGUGGC (配列番号 173)	GUCACUUUGUGGC (配列番号 182)
	tracrRNA 部分 2	GCUCCAUUGGAACGGAGCAUUUUU (配列番号 174)	CCCCAUUGGAACGGGGCUUUUU (配列番号 183)
	tracrRNA 部分 2 - ホリ T	GCUCCAUUGGAACGGAGCA (配列番号 175)	CCCCAUUGGAACGGGGC (配列番号 184)
sgRNA パーシジョン	sgRNA V1	GTTTGCTAGGTGgaaaCACAGTTGCGTGCAAATAAGTCACTTTGTGGCGCATCCATGGCTCCATTGGAACGGAGCATTTTTT (配列番号 176)	GTTTGCTAGGTGgaaaCACAGCTGCGTGCAAATAAGTCACTTTGTGGCGTATCCATAACTCCCCATTGGAACGGGGCTTTTTT (配列番号 185)

10

20

【 0 2 7 1 】

30

40

50

【表 2 - 6】

表2(続き) — OMNIガイドRNA及び足場RNAの配列

		sgRNA 259 を伴う OMNI-259
crRNA:tracrRNA テンプレートの レックス V1	crRNA (リポーター)	GUUUUAGUUCUAUGUC (配列番号 186)
	crRNA 1 の一部	GUUUUAGUUCUAUGU (配列番号 187)
	crRNA 2 の一部	GUUUUAGUUCUA (配列番号 188)
	crRNA 3 の一部	GUUUUAGUUC (配列番号 189)
	tracrRNA (アンチリポーター)	GACAUAGAGAGUUAAAAU (配列番号 190)
	tracrRNA 1 の一部	ACAUAGAGAGUUAAAAU (配列番号 191)
	tracrRNA 2 の一部	UAGAGAGUUAAAAU (配列番号 192)
	tracrRNA 3 の一部	GAGAGUUAAAAU (配列番号 193)
tracrRNA 配列	tracrRNA 部分 1	AAAGGAUUACCUAAAUA (配列番号 194)
	tracrRNA 部分 1 -その一部	AGGAUUACCU (配列番号 195)
	tracrRNA 部分 2	CUCAUUAUGUGAUGAG (配列番号 196)
	tracrRNA 部分 3	AGGCUGCUUAGGCUAGCCUUUUUUU (配列番号 197)
	tracrRNA 部分 3 -ホリ T	AGGCUGCUUAGGCUAGCC (配列番号 198)
sgRNA ハー ジョン	sgRNA V1	GTTTTAGTTCTATGTCgaaaGACATAGAGAGTTAAAATA AAGGATTACCTAAATACTCATTATGTGATGAGAGGCT GCTTAGGCTAGCCTTTTTTTTT (配列番号 199)
	sgRNA V2	GTTCTAGTTCTATGTCgaaaGACATAGAGAGTTAGAATA AAGGATTACCTAAATACTCATTATGTGATGAGAGGCT GCTTAGGCTAGCCTTTTTTTTT (配列番号 200)
	sgRNA V2 crRNA (リポ ーター)	GUUCUAGUUCUAUGUC (配列番号 201)
	sgRNA V2 crRNA (アン チリポーター)	GACAUAGAGAGUUAGAAU (配列番号 202)

【 0 2 7 2 】

【表 3】

表3 OMNIヌクレアーゼPAMの要約

名称	寛容 PAM	PAM 詳細 1	追加の寛容 PAM	PAM 詳細 2	PAM 詳細 3
OMNI-115	NNRYTT	NNRTTT	NNRYTTHN	NNRYTTTN	記載なし
OMNI-124	NNGNRC	記載なし	NNGNDCNN	NNGNRCNN	NNGNRMNN
OMNI-127	NYRRV	記載なし	NYARMNNN	NYAGCNNN	記載なし
OMNI-144	NNRC	NNGC	NNDVNNNN	NNGCCANN	NNRCNNNN
OMNI-145	NNRC	NNGC	NNDVNNNN	NNGCCANN	NNGCCANN
OMNI-146	NNRC	NNGC	NNRCDNNN	NNRCRNCY	NNDCCNNN
OMNI-147	NNRC	NNGC	NNDVNNNN	NNGCCANN	NNRCNNNN
OMNI-148	NNRC	NNGC	NNRCNNNN	NNGCRANN	NNRCNANN
OMNI-149	NNRC	NNGC	NNDCCNNN	NNGCDNHN	NNRCNRCY
OMNI-159	NNNNCH	NNNNCM	NNNNCMAN	NNNNCMAN	NNNNCMNN
OMNI-218	NNGNKC	NGGRKC	NRGNCRN	SRGGNCRN	NRGGGCRN
OMNI-237	NNVVHY	NNRRHY	NNRVCYNN	NNRACTNN	NNRACYTN
OMNI-248	NRVA	NRMA	NRVANNNN	NAAANNNN	NRAANNNN
OMNI-251	NRNCC	記載なし	NRNCCNNN	NRNCCNNN	記載なし
OMNI-252	NRNCC	記載なし	NRNCCNNN	NRNCCNNN	NRNCCNNN
OMNI-253	NNNCC	記載なし	NNNCCNNN	NRNCCNNN	NNNCYNNN
OMNI-259	NNGAYA	記載なし	NDGHYAHN	NNGAYAHN	NKGWYAHN

【 0 2 7 3 】

【表 4】

表4 プラスミドとその構築

プラスミド	目的	要素	例
pET9a	細菌系での OMNI ホリペプチドの発現	T7 プロモーター HA タグ - リンカー -OMNI ORF (ヒトに最適化) - SV40 NLS - 8X ヒスタグ - T7 ターミネーター	pET9a-OMNI-115 (配列番号)
pbShuttle ガイド T2	細菌系での OMNI sgRNA の発現	U6 プロモーター - T7 プロモーター - T2 スペーサー sgRNA 足場 - T7 ターミネーター	pShuttle ガイド-T2-OMNI-97 V1 (配列番号)
pbPOS T2 ライブラリー	細菌/TXTL 枯渇アッセイ	T2 プロモーター - 8N PAM ライブラリー - クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ	pbPOS T2 ライブラリー (配列番号)
pmOMNI	ヒト細胞系での OMNI ホリペプチドの発現	CMV プロモーター - コサック - SV40 NLS - OMNI ORF (ヒトに最適化) - HA - SV40 NLS - P2A - mCherry - bGH ホリ(A)シグナル	pmOMNI-OMNI-127 (配列番号)
pET28	細菌系での OMNI ホリペプチドの発現	T7 プロモーター HA タグ - リンカー -OMNI ORF (細菌に最適化) - SV40 NLS - 8X ヒスタグ - T7 ターミネーター	pET28a-OMNI127

【 0 2 7 4 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表5 哺乳動物細胞の内因性環境におけるヌクレアーゼ活性

ヌクレアーゼ	標的遺伝子	対応するスパーサー名	スパーサー配列	PAM	最大活性の平均
OMNI-124	B2M	hB2M_s32_22bp_II	AGCGCGAGCACAGCUA AGGCCA (配列番号 269)	CGGAGCGA	87.0000
	CXCR4	hCXCR4_s85_22bp_II	CCUCGGUGAUGGAAAU CCACUU (配列番号 270)	GTGCACAG	54.0000
	B2M	hB2M_S52_22bp_II	CGUGAGUAAACCUGAA UCUUUG (配列番号 271)	GAGTACCT	51.0000
	ELANE	hELANE_g138_22bp_II	GGUGUCAAGCCCCAGA GGCCAC (配列番号 272)	AGGGACAG	39.0000
	CXCR4	hCXCR4_S100_22bp_II	UGCCUUGCAUAGGAAG UUCCCA (配列番号 273)	AAGTACCA	23.0000
	SARM1	hSARM1_g13_22bp_II	UGCUCAGACACGCGGU GCAGCA (配列番号 274)	GGGAGCGG	22.0000
	TRAC	hTRAC_S21_22bp_II	GGCCACUUUCAGGAGG AGGAUU (配列番号 275)	CGGAACCC	13.0000
	ELANE	hELANE_g39_22bp_II	CACAGCGGGUGUAGAC UCCGAG (配列番号 276)	GGGGACGT	13.0000
OMNI-218	ELANE	hELANE_g143_22bp_II	GCCUGUUGCUGCAGUC CGGGCU (配列番号 277)	GGGAGCGG	89.0000
	CXCR4	hCXCR4_S25_22bp_II	UGGCAAGAGACCCACA CACCGG (配列番号 278)	AGGAGCGC	89.0000
	B2M	hB2M_s32_22bp_II	AGCGCGAGCACAGCUA AGGCCA (配列番号 279)	CGGAGCGA	71.0000
	TRAC	hTRAC_s128_22bp_II	AGUCUCUCAGCUGGUA CACGGC (配列番号 280)	AGGGTCAG	65.0000
	TRAC	hTRAC_S22_22bp_II	CAAGAGCAACAGUGCU GUGGCC (配列番号 281)	TGGAGCAA	27.0000
	TIGIT	hTIGIT_S24_22bp_II	CAUCAGACAGCUGUGA CAGCCA (配列番号 282)	TGGAGCTC	22.0000
	CTLA4	hCTLA4_S15_22bp_II	CAAGGACUGAGGGCCA UGGACA (配列番号 283)	CGGGACTC	18.0000
	CXCR4	hCXCR4_S103_22bp_II	CUGUUGGCUGCCUAC UACAUA (配列番号 284)	GGGATCAG	15.0000
OMNI-237	B2M	hB2M_s12_22bp_II	GUAUGCCUGCCGUGUG AACCAU (配列番号 285)	GTGACTTT	18.0000
OMNI-248	CXCR4	hCXCR4_s186_22bp_II	UCCUGGUCAUGGGUUA CCAGAA (配列番号 286)	GAAACTGA	25.0000
	CXCR4	hCXCR4_s187_22bp_II	AUAAGGCCAACCAUGA UGUGCU (配列番号 287)	GAAACTGG	16.0000
	TRAC	hTRAC_S35_22bp_II	GACCCUGCCGUGUACC AGCUGA (配列番号 288)	GAGACTCT	14.0000
	B2M	hB2M_S83_22bp_II	AUUCUCUGCUGGAUGA CGUGAG (配列番号 289)	TAAACCTG	14.0000
OMNI-251	SAMD9L	hSAMD9L_g130alt_22bp_II	GUCCAAAACAGAACAC CAAAAA (配列番号 290)	AATCCAAA	1.0000
OMNI-252	TRAC	hTRAC_S72_22bp_II	UUCAGAAAGACACCUU CUUCCC (配列番号 291)	CAGCCCAG	1.0000
	SAMD9L	hSAMD9L_g130_22bp_II	GUCCAAAACAGAACAC CAGAAA (配列番号 292)	AATCCAAA	1.0000
OMNI-253	CXCR4	hCXCR4_S65_22bp_II	AGGGGACUAUGACUCC AUGAAG (配列番号 293)	GAACCCTG	4.0000

【 0 2 7 5 】

10

20

30

40

【表 5 - 2】

ヌクレアーゼ	標的遺伝子	対応するスパーサー名	スパーサー配列	PAM	最大活性の平均
OMNI-159	GATA2	hGATA2_g71_22bp_II	GAUCCAGACUCGGAACCGGAAG (配列番号 294)	ATGTCCAA	91.0000
	CXCR4	hCXCR4_S36_22bp_II	GUAAGGCAGCCAACAGGCGAAG (配列番号 295)	AAAGCCAG	87.0000
	ELANE	hELANE_g139alt_22bp_II	AGUCCCAGCUCGCGGA AUGGGA (配列番号 296)	TTCCCAGG	75.0000
	ELANE	hELANE_g133_22bp_II	AGUCCGGGCUGGGAGC GGGUGG (配列番号 297)	GGAGCAGA	68.0000
	SARM1	hSARM1_g12_22bp_II	AGACACGCGGUGCAGC AGGGAG (配列番号 298)	CGGTCCAG	63.0000
	ELANE	hELANE_g146_22bp_II	UGUUAUGGUCACAGCG GGUGUA (配列番号 299)	GACTCCGA	19.0000
	ELANE	hELANE_g48_22bp_II	CCCUCGGAGUCUACAC CCGCUG (配列番号 300)	TGACCATA	10.0000
OMNI-127	TRAC	hTRAC_s130_22bp_II	GGCCCCUCACCUCAGC UGGACC (配列番号 301)	ACAGCCGC	87.0000
OMNI-127	ELANE	hELANE_g136_22bp_II	CCACCCGCUCCAGCC CGGACU (配列番号 302)	GCAGCAAC	86.0000
OMNI-127	ELANE	hELANE_g135_22bp_II	GCGGGAAAGGGAUUCC CAGGAC (配列番号 303)	CCAGCCCC	67.0000
OMNI-127	ELANE	hELANE_g135_22bp_II	GCGGGAAAGGGAUUCC CAGGAC (配列番号 304)	CCAGCCCC	64.0000
OMNI-127	B2M	hB2M_S38_22bp_II	CUCUUUCUGGCCUGGA GGCUAU (配列番号 305)	CCAGCGTG	48.0000
OMNI-127	TRAC	hTRAC_s129_22bp_II	GCAUGUGCAAACGCCU UCAACA (配列番号 306)	ACAGCATT	43.0000
OMNI-127	CXCR4	hCXCR4_s72_22bp_II	GUGGAUUUCCAUCACC GAGGCC (配列番号 307)	CTAGCTTT	41.0000
OMNI-127	CXCR4	hCXCR4_s73_22bp_II	AGGAGGUCGGCCACUG ACAGGU (配列番号 308)	GCAGCCTG	40.0000
OMNI-127	TRAC	hTRAC_S58_22bp_II	AGAACCCUGACCCUGC CGUGUA (配列番号 309)	CCAGCTGA	39.0000
OMNI-127	ELANE	hELANE_g134_22bp_II	GGGUCCUGGGAAUCCC UUUCCC (配列番号 310)	GCAGCTGG	23.0000

表 5 哺乳動物細胞の内因性環境におけるヌクレアーゼ活性 OMNIヌクレアーゼを、sgRNA発現プラスミドと共にDNAトランスフェクションした哺乳動物細胞系(HeLa)で発現させた。部位特異的ゲノムDNA増幅及びNGSには、細胞溶解物を使用した。インデルの割合を測定、分析して、編集レベルを求めた。各 sgRNA は、tracrRNA(表 2 参照)と上記スパーサーで構成される。スパーサーの3' ゲノム配列は、各 OMNI ヌクレアーゼに関連する想定 PAM を含む。トランスフェクション効率、これまでに説明したように mCherry シグナルのフローサイトメトリーによって測定した。すべての実験は3回行った。OMNIヌクレアーゼのみ(ガイドなし)でトランスフェクトした細胞を陰性対照とした(データは示さず)。

【 0 2 7 6 】

10

20

30

40

50

【表 6】

表6 ELANEを標的とするOMNI-127合成sgRNA

位置	スパーサー長	スパーサー配列	PAM	足場 sgRNA12 V2	完全 sgRNA
g134_alt	22	配列番号 311	GCAGCTGG	配列番号 324	配列番号 325
g134_ref	22	配列番号 312	GCAGCTGG	配列番号 324	配列番号 326
g135_alt	22	配列番号 313	CCAGCCCC	配列番号 324	配列番号 327
g135_ref	20	配列番号 314	CCAGCCCC	配列番号 324	配列番号 328
g135_ref	21	配列番号 315	CCAGCCCC	配列番号 324	配列番号 329
g135_ref	22	配列番号 316	CCAGCCCC	配列番号 324	配列番号 330
g135_ref	23	配列番号 317	CCAGCCCC	配列番号 324	配列番号 331
g135_ref	24	配列番号 318	CCAGCCCC	配列番号 324	配列番号 332
g136	20	配列番号 319	GCAGCAAC	配列番号 324	配列番号 333
g136	21	配列番号 320	GCAGCAAC	配列番号 324	配列番号 334
g136	22	配列番号 321	GCAGCAAC	配列番号 324	配列番号 335
g136	23	配列番号 322	GCAGCAAC	配列番号 324	配列番号 336
g136	24	配列番号 323	GCAGCAAC	配列番号 324	配列番号 337

10

【0277】

20

【表 7】

表7 哺乳動物U2OS細胞におけるOMNI-127 RNP活性とスパーサーの最適化

遺伝子	ゲノム位置	スパーサー配列	PAM	スパーサー長	インデル率 (%)
ELANE	g134_ref	GGGUCCUGGGAUCCCUUCCCC (配列番号 338)	GCAGCTGG	22	46.0000
	g135_ref	GGGAAAGGGAUCCCCAGGAC (配列番号 339)	CCAGCCCC	20	95.0000
	g135_ref	CGGGAAAGGGAUCCCCAGGAC (配列番号 340)	CCAGCCCC	21	96.0000
	g135_ref	GCGGGAAAGGGAUCCCCAGGAC (配列番号 341)	CCAGCCCC	22	92.0000
	g135_ref	UGCGGGAAAGGGAUCCCCAGGAC (配列番号 342)	CCAGCCCC	23	93.0000
	g135_ref	CUGCGGGAAAGGGAUCCCCAGGAC (配列番号 343)	CCAGCCCC	24	95.0000
	g136_ref	CCACCCGCUCCCAGCCCGGACU (配列番号 344)	GCAGCAAC	20	97.0000
	g136_ref	CCACCCGCUCCCAGCCCGGACU (配列番号 345)	GCAGCAAC	21	91.0000
	g136_ref	CCACCCGCUCCCAGCCCGGACU (配列番号 346)	GCAGCAAC	22	98.0000
	g136_ref	CCCACCCGCUCCCAGCCCGGACU (配列番号 347)	GCAGCAAC	23	97.0000
	g136_ref	CCCCACCCGCUCCCAGCCCGGACU (配列番号 348)	GCAGCAAC	24	98.0000

30

40

表7 U2OS細胞におけるRNP複合体の一部としてのOMNI-127の活性とスパーサーの最適化

OMNI-127RNPを合成sgRNA (Agilent、表6)と組み立て、U2OS細胞にエレクトロポレーションした。遺伝子名、スパーサー配列及びスパーサー長を、NGSで測定した編集レベルの横に示す。

【0278】

50

【表 8】

表8 哺乳動物HSC-MLP2細胞におけるOMNI-127 RNP活性とスパーサーの最適化

遺伝子	ゲノム位置	スパーサー配列	PAM	スパーサー長	インデル率 (%)
ELANE	g135_ref	GCGGGAAAGGGAUUCCAGGAC (配列番号 349)	CCAGCCCC	22	39.0000
	g135_alt	GCGGGAAUGGGAUUCCAGGAC (配列番号 350)	CCAGCCCC	22	49.0000
	g136_ref	CCACCCGCUCCAGCCCGGACU (配 列番号 351)	GCAGCAAC	22	71.0000

表8 HSC-MLP2細胞におけるRNP複合体の一部分としてのOMNI-127の活性とスパーサーの最適化
OMNI-127RNPを合成sgRNA (Agilent、表6)と組み立て、HSC-MLP2細胞にエレクトロポレーションした。遺伝子名、スパーサー配列及びスパーサー長を、NGSで測定した編集レベルの横に示す。

10

【0279】

参考文献

1. Ahmad and Allen (1992) "Antibody-mediated Specific Binding and Cytotoxicity of Liposome-entrapped Doxorubicin to Lung Cancer Cells in Vitro", Cancer Research 52:4817-20.
2. Anderson (1992) "Human gene therapy", Science 256:808-13.
3. Basha et al. (2011) "Influence of Cationic Lipid Composition on Gene Silencing Properties of Lipid Nanoparticle Formulations of siRNA in Antigen-Presenting Cells", Mol. Ther. 19(12):2186-200.
4. Behr (1994) "Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: Prospects for gene therapy", Bioconjugate Chem 5:382-89.
5. Blaese et al. (1995) "Vectors in cancer therapy: how will they deliver", Cancer Gene Ther. 2:291-97.
6. Blaese et al. (1995) "T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years", Science 270(5235):475-80.
7. Briner et al. (2014) "Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality", Molecular Cell 56:333-39.
8. Buchsacher and Panganiban (1992) "Human immunodeficiency virus vectors for inducible expression of foreign genes", J. Virol. 66:2731-39.
9. Burstein et al. (2017) "New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes", Nature 542:237-41.
10. Canver et al., (2015) "BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis", Nature Vol. 527, Pgs. 192-214.
11. Chang and Wilson (1987) "Modification of DNA ends can decrease end-joining relative to homologous recombination in mammalian cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963.
12. Charlesworth et al. (2019) "Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans", Nature Medicine, 25(2), 249.
13. Chung et al. (2006) "Agrobacterium is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria", Trends Plant Sci. 11(1):1-4.
14. Coelho et al. (2013) "Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis" N. Engl. J. Med. 369, 819-829.
15. Crystal (1995) "Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success", Science 270(5235):404-10.
16. Dillon (1993) "Regulation gene expression in gene therapy" Trends in Biotechnology 11(5):167-173.
17. Dranoff et al. (1997) "A phase I study of vaccination with autologous

20

30

40

50

- us, irradiated melanoma cells engineered to secrete human granulocyte macrophage colony stimulating factor", *Hum. Gene Ther.* 8(1):111-23.
18. Dunbar et al. (1995) "Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation", *Blood* 85:3048-57.
 19. Ellem et al. (1997) "A case report: immune responses and clinical course of the first human use of granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor-transduced autologous melanoma cells for immunotherapy", *Cancer Immunol Immunother* 44:10-20.
 20. Gao and Huang (1995) "Cationic liposome-mediated gene transfer" *Gene Ther.* 2(10):710-22. 10
 21. Haddada et al. (1995) "Gene Therapy Using Adenovirus Vectors", in: *The Molecular Repertoire of Adenoviruses III: Biology and Pathogenesis*, ed. Doerfler and Boehm, pp. 297-306.
 22. Han et al. (1995) "Ligand-directed retro-viral targeting of human breast cancer cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(21):9747-51.
 23. Humbert et al., (2019) "Therapeutically relevant engraftment of a CRISPR-Cas9-edited HSC-enriched population with HbF reactivation in nonhuman primates", *Sci. Trans. Med.*, Vol. 11, Pgs. 1-13.
 24. Inaba et al. (1992) "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor", *J Exp Med.* 176(6):1693-702. 20
 25. Jinek et al. (2012) "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", *Science* 337(6096):816-21.
 26. Johan et al. (1992) "GLVR1, a receptor for gibbon ape leukemia virus, is homologous to a phosphate permease of *Neurospora crassa* and is expressed at high levels in the brain and thymus", *J Virol* 66(3):1635-40.
 27. Judge et al. (2006) "Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo", *Mol Ther.* 13(3):494-505.
 28. Kohn et al. (1995) "Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency", *Nature Medicine* 1:1017-23. 30
 29. Kremer and Perricaudet (1995) "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer", *Br. Med. Bull.* 51(1):31-44.
 30. Macdiarmid et al. (2009) "Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug", *Nat Biotechnol.* 27(7):643-51.
 31. Malech et al. (1997) "Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease", *PNAS* 94(22):12133-38. 40
 32. Maxwell et al. (2018) "A detailed cell-free transcription-translation-based assay to decipher CRISPR protospacer adjacent motifs", *Methods* 143:48-57.
 33. Miller et al. (1991) "Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus", *J Virol.* 65(5):2220-24.
 34. Miller (1992) "Human gene therapy comes of age", *Nature* 357:455-60.
 35. Mitani and Caskey (1993) "Delivering therapeutic genes - matching approach and application", *Trends in Biotechnology* 11(5):162-66.
 36. Nabel and Felgner (1993) "Direct gene transfer for immunotherapy and immunization", *Trends in Biotechnology* 11(5):211-15. 50

37. Nehls et al. (1996) "Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium" *Science* 272:886-889.
38. Remy et al. (1994) "Gene Transfer with a Series of Lipophilic DNA-Binding Molecules", *Bioconjugate Chem.* 5(6):647-54.
39. Sentmanat et al. (2018) "A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing", *Scientific Reports* 8:888, doi:10.1038/s41598-018-19441-8.
40. Sommerfelt et al. (1990) "Localization of the receptor gene for type D simian retroviruses on human chromosome 19", *J. Virol.* 64(12):6214-20.
41. Van Brunt (1988) "Molecular framing: transgenic animals as bioactors" *Biotechnology* 6:1149-54.
42. Vigne et al. (1995) "Third-generation adenovectors for gene therapy", *Restorative Neurology and Neuroscience* 8(1,2): 35-36.
43. Wagner et al. (2019) "High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population" *Nature Medicine*, 25(2), 242
44. Wilson et al. (1989) "Formation of infectious hybrid virion with gibbon ape leukemia virus and human T-cell leukemia virus retroviral envelope glycoproteins and the gag and pol proteins of Moloney murine leukemia virus", *J. Virol.* 63:2374-78.
45. Yu et al. (1994) "Progress towards gene therapy for HIV infection", *Gene Ther.* 1(1):13-26.
46. Zetsche et al. (2015) "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system" *Cell* 163(3):759-71.
47. Zuris et al. (2015) "Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein based genome editing in vitro and in vivo" *Nat Biotechnol.* 33(1):73-80.

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1 A】

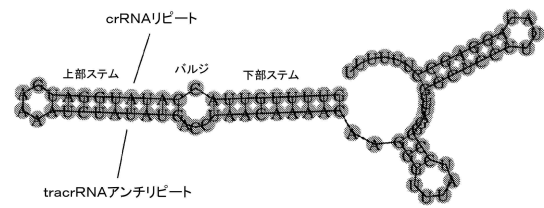


Fig. 1A

【図 1 B】

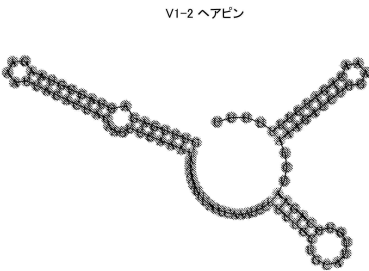


Fig. 1B

【図 1 C】

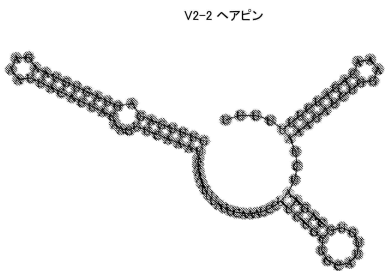


Fig. 1C

【図 1 D】

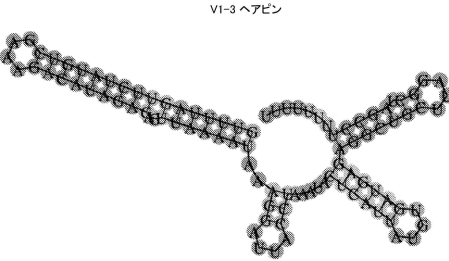


Fig. 1D

10

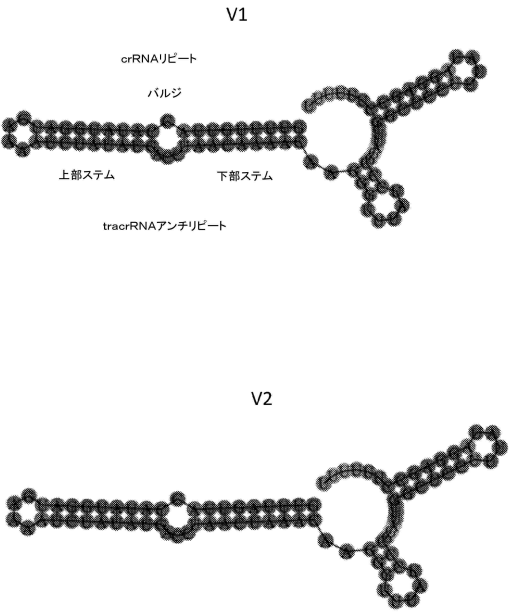
20

30

40

50

【図 1 E】



【図 2】

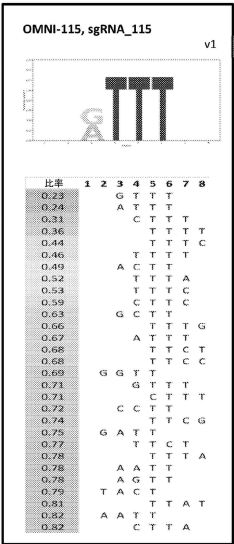


Fig. 2

【図 3】

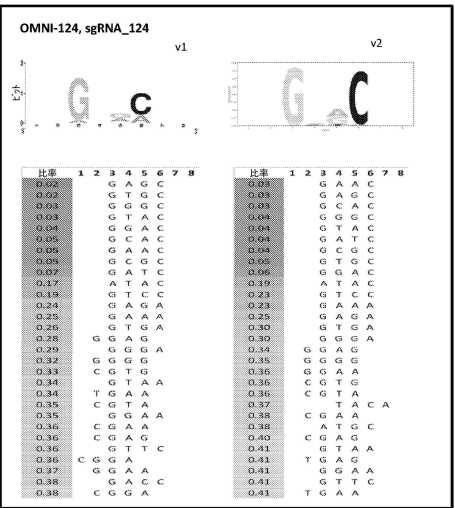


Fig. 3

【図 4】

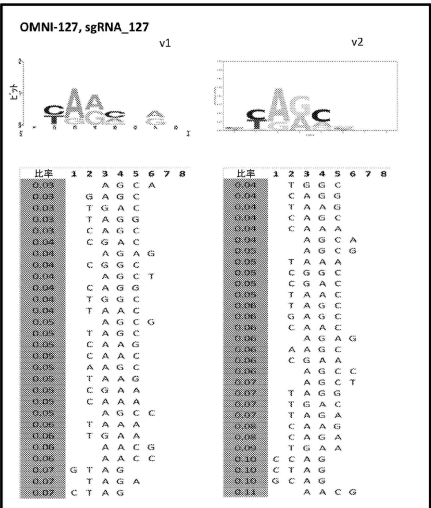


Fig. 4

【図 19 C】

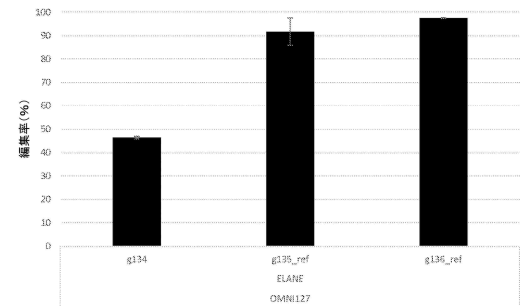


Fig. 19C

【配列表】

2024532784000001.xml

10

20

30

40

50

【手続補正書】
【提出日】令和6年4月22日(2024.4.22)
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】変更
【補正の内容】
【配列表】

2024532784000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/74941

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - INV. C12N 9/22; C12N 15/11 (2022.01) ADD. CPC - INV. C12N 15/907; C12N 9/22; C12N 15/102; C12N 15/11 ADD. C12N 2310/20 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018/172656 A1 (CUREVAC AG) 27 September 2018; claim 12	1-6, 47-49
A	WO 2020/223553 A2 (EMENDO BIO INC.) 05 November 2020; claim 34	1-6, 47-49
A	WO 2021/097271 A1 (ASSEMBLY BIOSCIENCES, INC.) 20 May 2021; [0010]	1-6, 47-49
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 November 2022 (29.11.2022)		Date of mailing of the international search report FEB 28 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US22/74941
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed. b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/74941

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 50-57
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I+, Claims 1-49; SEQ ID NO: 3 (CRISPR nuclease amino acid sequence); SEQ ID NO: 82 (crRNA molecule sequence);
SEQ ID NO: 86 (tracrRNA molecule sequence)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/74941

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

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

Group I+, Claims 1-49, SEQ ID NO: 3 (CRISPR nuclease amino acid sequence), SEQ ID NO: 82 (crRNA molecule sequence), and SEQ ID NO: 86 (tracrRNA molecule sequence) are directed towards a non-naturally occurring composition comprising a CRISPR nuclease.

The compositions of Claims 1-6 (each in-part) and 47-49 (each in-part) are believed to encompass the first named invention of Group I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 3 (first exemplary CRISPR nuclease amino acid sequence), SEQ ID NO: 82 (first exemplary crRNA molecule sequence), and SEQ ID NO: 86 (first exemplary tracrRNA molecule sequence). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 1, 3-6, and 47-49 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional nuclease sequence(s), crRNA molecule sequence(s) and tracrRNA molecule sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO:, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional nuclease sequence(s), crRNA molecule sequence(s) and tracrRNA molecule sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected nuclease sequence(s), crRNA molecule sequence(s) and tracrRNA molecule sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 83 (crRNA molecule sequence); SEQ ID NO: 87 (tracrRNA molecule sequence).

No technical features are shared between the nuclease sequences, crRNA molecule sequences and tracrRNA molecule sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a non-naturally occurring composition comprising a CRISPR nuclease comprising a sequence having at least 90% identity, or a nucleic acid molecule comprising a sequence encoding the CRISPR nuclease; these shared technical features are previously disclosed by WO 2018/081728 A1 (EMENDOBIO INC.) (hereinafter "Emendobio").

Emendobio discloses a non-naturally occurring composition comprising a CRISPR nuclease comprising a sequence having at least 90% identity (a composition comprising an engineered CRISPR nuclease (a non-naturally occurring composition comprising a CRISPR nuclease comprising a sequence having at least 90% identity); page 23, line 27 – page 24, line 5, lines 13-21; claims 1, 8), or a nucleic acid molecule comprising a sequence encoding the CRISPR nuclease.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Emendobio reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ン・レジオン、ハバール・シエム・トブ 7

(72)発明者 メロン、ヌリット

イスラエル国、ラマトガン 5 2 5 8 3 0 2、ハショシャニム・ブールバード 3

(72)発明者 アディブ・タル、オフィール

イスラエル国、7 6 4 7 3 0 6 レホボト、ドクター・モスコビチ・ストリート 1 8

(72)発明者 ギスパン、アリエル

イスラエル国、9 0 6 1 8 0 0 クファール・アドゥミム、ハメヤスディム 1 8

(72)発明者 ブッフ、イディット

イスラエル国、4 5 0 2 5 1 3 ホドーハシャロン、ヤール・シュテルン・ストリート 2 5