

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-504898
(P2025-504898A)

(43)公表日 令和7年2月19日(2025.2.19)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 6
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 7
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全223頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-543890(P2024-543890)			(71)出願人	521282169
(86)(22)出願日	令和5年1月23日(2023.1.23)				ライフエディット セラピューティクス
(85)翻訳文提出日	令和6年9月24日(2024.9.24)				, インコーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/IB2023/050560				アメリカ合衆国, ノース カロライナ 2
(87)国際公開番号	WO2023/139557				7 7 0 1, ダーラム, モリス ストリート
(87)国際公開日	令和5年7月27日(2023.7.27)				3 0 0, スイート 3 0 0
(31)優先権主張番号	63/302,271			(74)代理人	100099759
(32)優先日	令和4年1月24日(2022.1.24)				弁理士 青木 篤
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100123582
					弁理士 三橋 真二
(31)優先権主張番号	63/386,061			(74)代理人	100117019
(32)優先日	令和4年12月5日(2022.12.5)				弁理士 渡辺 陽一
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100141977
					弁理士 中島 勝
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ			(74)代理人	100138210
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 RNA誘導型ヌクレアーゼ及びその活性断片及びバリエント、並びに使用方法

(57)【要約】

目的の標的配列に結合するための組成物及び方法が提供される。組成物は、目的の標的配列の切断又は修飾、目的の標的配列の視覚化、及び目的の配列の発現の修飾での使用が見出される。組成物は、RNA誘導型ヌクレアーゼ（RGN）ポリペプチド、CRISPR RNA、トランス活性化CRISPR RNA、ガイドRNA、及びそれらをコードする核酸分子を含む。核酸分子を含むベクター及び宿主細胞もまた提供される。更に、目的の標的配列に結合するためのRGN系であって、RNA誘導型ヌクレアーゼポリペプチドと、1つ以上のガイドRNAと、を含む、RGN系が提供される。

【選択図】 図 1

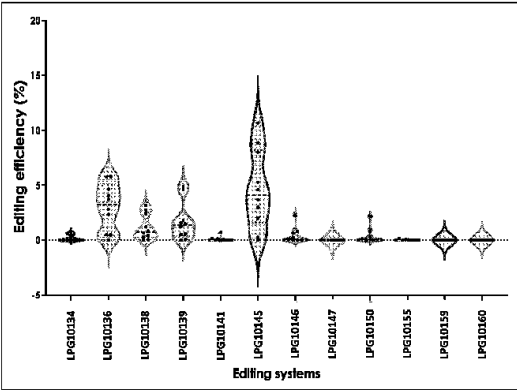


FIGURE 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

RNA 誘導型ヌクレアーゼ（RGN）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子であって、前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1～12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む RGN ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、

前記 RGN ポリペプチドが、標的 DNA 配列にハイブリダイズすることができるガイド RNA（gRNA）に結合したときに、RNA 誘導型配列特異的に前記標的 DNA 配列と結合することができる、核酸分子。

【請求項 2】

前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 1～12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

RGN ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチドに対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 又は 2 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記 RGN ポリペプチドが、結合時に前記標的 DNA 配列を切断することができる、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記 RGN ポリペプチドが、二本鎖切断を生成することができる、請求項 4 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記 RGN ポリペプチドが、一本鎖切断を生成することができる、請求項 4 に記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記 RGN ポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記 RGN ポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 9】

前記プライム編集ポリペプチドが、DNA ポリメラーゼを含む、請求項 8 に記載の核酸分子。

【請求項 10】

前記プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、請求項 8 に記載の核酸分子。

【請求項 11】

前記 RGN ポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 12】

前記塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、請求項 11 に記載の核酸分子。

【請求項 13】

前記デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、請求項 12 に記載の核酸分子。

【請求項 14】

前記デアミナーゼが、配列番号 377～448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する、請求項 12 に記載の核酸分子。

【請求項 15】

前記デアミナーゼが、配列番号 377～448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と

10

20

30

40

50

少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100%の配列同一性を有する、請求項 12 に記載の核酸分子。

【請求項 16】

前記 RGN ポリペプチドが、1 つ以上の核局在化シグナルを含む、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 17】

前記 RGN ポリペプチドが、真核生物細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 18】

前記標的 DNA 配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) に隣接して位置する、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の核酸分子。 10

【請求項 19】

請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 20】

前記標的 DNA 配列にハイブリダイズすることができる前記 gRNA をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を更に含む、請求項 19 に記載のベクター。

【請求項 21】

前記ガイド RNA が、

a)

i) 配列番号 13 と少なくとも 90%の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、CRISPR RNA と、 20

ii) 配列番号 25 と少なくとも 90%の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、ガイド RNA であって、

前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 1 と少なくとも 90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、

b)

i) 配列番号 14 と少なくとも 90%の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、CRISPR RNA と、

ii) 配列番号 26 と少なくとも 90%の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、ガイド RNA であって、 30

前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 2 と少なくとも 90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、

c)

i) 配列番号 15 と少なくとも 90%の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、CRISPR RNA と、

ii) 配列番号 27 と少なくとも 90%の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、ガイド RNA であって、

前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 3 と少なくとも 90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、

d)

i) 配列番号 16 と少なくとも 90%の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、CRISPR RNA と、

ii) 配列番号 28 と少なくとも 90%の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、ガイド RNA であって、

前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 4 と少なくとも 90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、

e)

i) 配列番号 17 と少なくとも 90%の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、CRISPR RNA と、

ii) 配列番号 29 と少なくとも 90%の配列同一性を有する tracrRNA と、 50

を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、
f)

i) 配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、
g)

i) 配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、
h)

i) 配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、
i)

i) 配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、
j)

i) 配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、
k)

i) 配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、及び
l)

i) 配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

10

20

30

40

50

前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 2 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、からなる群から選択される、請求項 2 0 に記載のベクター。

【請求項 2 2】

前記ガイド RNA が、

a)

i) 配列番号 1 3 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列を含む、C R I S P R RNA と、

i i) 配列番号 2 5 と 1 0 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r RNA と、を含む、ガイド RNA であって、

前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、

b)

i) 配列番号 1 4 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列を含む、C R I S P R RNA と、

i i) 配列番号 2 6 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r RNA と、を含む、ガイド RNA であって、

前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 2 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、

c)

i) 配列番号 1 5 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列を含む、C R I S P R RNA と、

i i) 配列番号 2 7 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r RNA と、を含む、ガイド RNA であって、

前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 3 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、

d)

i) 配列番号 1 6 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列を含む、C R I S P R RNA と、

i i) 配列番号 2 8 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r RNA と、を含む、ガイド RNA であって、

前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 4 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、

e)

i) 配列番号 1 7 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列を含む、C R I S P R RNA と、

i i) 配列番号 2 9 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r RNA

10

20

30

40

50

Aと、を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号5と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

f)

i) 配列番号18と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号30と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

g)

i) 配列番号19と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号31と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号7と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

h)

i) 配列番号20と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号32と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号8と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

i)

i) 配列番号21と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号33と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号9と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

j)

i) 配列番号22と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号34と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNA

10

20

30

40

50

Aと、を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号10と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

k)

i) 配列番号23と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号35と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号11と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、及び

l)

i) 配列番号24と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号36と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

前記RGNポリペプチドが、配列番号12と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、からなる群から選択される、請求項20に記載のベクター。

【請求項23】

前記gRNAが、シングルガイドRNAである、請求項20又は21に記載のベクター。

【請求項24】

前記sgRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を更に含む、実施形態23に記載のベクター。

【請求項25】

前記gRNAが、デュアルガイドRNAである、請求項20又は21に記載のベクター。

【請求項26】

請求項1～18のいずれか一項に記載の核酸分子又は請求項19～25のいずれか一項に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項27】

RGNポリペプチドを作製するための方法であって、請求項26に記載の細胞を、前記RGNポリペプチドが発現される条件下で培養することを含む、方法。

【請求項28】

RGNポリペプチドを作製するための方法であって、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むRNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸分子を細胞に導入することであって、

前記RGNポリペプチドが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができるガイドRNA(gRNA)に結合したときに、RNA誘導型配列特異的に前記標的DNA配列と結合することができる、導入することと、

前記細胞を、前記RGNポリペプチドが発現される条件下で培養することと、を含む、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 1～12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記 RGN ポリペプチドを精製することを更に含む、請求項 27～29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記細胞が、前記 RGN ポリペプチドに結合して、RGN リボ核タンパク質複合体を形成することができる 1 つ以上のガイド RNA を更に発現する、請求項 27～29 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 32】

前記 RGN リボ核タンパク質複合体を精製することを更に含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

RNA 誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドであって、前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 1～12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記 RGN ポリペプチドが、標的 DNA 配列にハイブリダイズすることができるガイド RNA (gRNA) に結合したときに、RNA 誘導型配列特異的に DNA 分子の前記標的 DNA 配列と結合することができる、RNA 誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチド。

20

【請求項 34】

前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 1～12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 33 に記載の RGN ポリペプチド。

【請求項 35】

前記 RGN ポリペプチドが、単離された RGN ポリペプチドである、請求項 33 又は 34 に記載の RGN ポリペプチド。

30

【請求項 36】

前記 RGN ポリペプチドが、結合時に前記標的 DNA 配列を切断することができる、請求項 33～35 のいずれか一項に記載の RGN ポリペプチド。

【請求項 37】

前記 RGN ポリペプチドによる切断が、二本鎖切断を生成する、請求項 36 に記載の RGN ポリペプチド。

【請求項 38】

前記 RGN ポリペプチドによる切断が、一本鎖切断を生成する、請求項 36 に記載の RGN ポリペプチド。

【請求項 39】

前記 RGN ポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである、請求項 33～35 のいずれか一項に記載の RGN ポリペプチド。

40

【請求項 40】

前記 RGN ポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、請求項 33～39 のいずれか一項に記載の RGN ポリペプチド。

【請求項 41】

前記プライム編集ポリペプチドが、DNA ポリメラーゼを含む、請求項 40 に記載の RGN ポリペプチド。

【請求項 42】

前記プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、請求項 40 に記載の RGN ポリ

50

ペプチド。

【請求項 4 3】

前記 R G N ポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、請求項 3 3 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の R G N ポリペプチド。

【請求項 4 4】

前記塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、請求項 4 3 に記載の R G N ポリペプチド。

【請求項 4 5】

前記デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、請求項 4 4 に記載の R G N ポリペプチド。

【請求項 4 6】

前記デアミナーゼが、配列番号 3 7 7 ～ 4 4 8 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する、請求項 4 4 に記載の R G N ポリペプチド。

【請求項 4 7】

前記デアミナーゼが、配列番号 3 7 7 ～ 4 4 8 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する、請求項 4 4 に記載の R G N ポリペプチド。

【請求項 4 8】

前記標的 D N A 配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) に隣接して位置する、請求項 3 3 ～ 4 7 のいずれか一項に記載の R G N ポリペプチド。

【請求項 4 9】

前記 R G N ポリペプチドが、1 つ以上の核局在化シグナルを含む、請求項 3 3 ～ 4 8 のいずれか一項に記載の R G N ポリペプチド。

【請求項 5 0】

請求項 3 3 ～ 4 9 のいずれか一項に記載の R G N ポリペプチドと、前記 R G N ポリペプチドに結合した前記ガイド R N A と、を含む、リボ核タンパク質 (R N P) 複合体。

【請求項 5 1】

D N A 分子の標的 D N A 配列に結合するための系であって、前記系が、

a) 前記標的 D N A 配列にハイブリダイズすることができる 1 つ以上のガイド R N A、又は前記 1 つ以上のガイド R N A (g R N A) をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む 1 つ以上のポリヌクレオチドと、

b) 配列番号 1 ～ 1 2 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む R N A 誘導型ヌクレアーゼ (R G N) ポリペプチド、又は前記 R G N ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、を含み、

前記 1 つ以上のガイド R N A が、前記標的 D N A 配列にハイブリダイズすることができる、

前記 1 つ以上のガイド R N A が、前記 D N A 分子の前記標的 D N A 配列に結合するように前記 R G N ポリペプチドを導くために、前記 R G N ポリペプチドと複合体を形成することができる、系。

【請求項 5 2】

前記 1 つ以上のガイド R N A をコードする前記ヌクレオチド配列及び前記 R G N ポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列のうちの少なくとも 1 つが、前記ヌクレオチド配列に対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、請求項 5 1 に記載の系。

【請求項 5 3】

前記 1 つ以上のガイド R N A をコードする前記ヌクレオチド配列及び前記 R G N ポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、1 つのベクター上に位置する、請求項 5 1 又は 5 2 に記載の系。

【請求項 5 4】

D N A 分子の標的 D N A 配列に結合するための系であって、前記系が、

10

20

30

40

50

a) 前記標的DNA配列にハイブリダイズすることができる1つ以上のガイドRNA、又は前記1つ以上のガイドRNA (gRNA) をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドと、

b) 配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、RNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドと、を含み、

前記1つ以上のガイドRNAが、前記標的DNA配列にハイブリダイズすることができる、

前記1つ以上のガイドRNAが、前記DNA分子の前記標的DNA配列に結合するように前記RGNポリペプチドを導くために、前記RGNポリペプチドと複合体を形成することができる、系。

【請求項55】

前記RGNポリペプチドが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項51～54のいずれか一項に記載の系。

【請求項56】

前記1つ以上のガイドRNAをコードする前記ヌクレオチド配列のうちの少なくとも1つが、前記ヌクレオチド配列に対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、請求項51～55のいずれか一項に記載の系。

【請求項57】

前記RGNポリペプチド及び前記1つ以上のガイドRNAが、天然に互いに複合体化されていることは見出されない、請求項51～56のいずれか一項に記載の系。

【請求項58】

前記標的DNA配列が、真核生物標的DNA配列である、請求項51～57のいずれか一項に記載の系。

【請求項59】

前記gRNAが、シングルガイドRNA (sgRNA) である、請求項51～58のいずれか一項に記載の系。

【請求項60】

前記sgRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を更に含む、請求項59に記載の系。

【請求項61】

前記gRNAが、デュアルガイドRNAである、請求項51～58のいずれか一項に記載の系。

【請求項62】

前記gRNAが、

a) 配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、前記RGNポリペプチドが、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

b) 配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、前記RGNポリペプチドが、配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

c) 配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、前記RGNポリペプチドが、配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

d) 配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、g

10

20

30

40

50

R N A であって、前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 4 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

e) 配列番号 1 7 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 2 9 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 5 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

f) 配列番号 1 8 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 3 0 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

g) 配列番号 1 9 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 3 1 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 7 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

h) 配列番号 2 0 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 3 2 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 8 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

i) 配列番号 2 1 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 3 3 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 9 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

j) 配列番号 2 2 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 3 4 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 0 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

k) 配列番号 2 3 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 3 5 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 1 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、及び

l) 配列番号 2 4 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 3 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 2 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、からなる群から選択される、請求項 5 1 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 6 3】

前記 g R N A が、

a) 配列番号 1 3 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 2 5 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む g R N A であって、前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

b) 配列番号 1 4 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 2 6 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む g R N A であって、前記 R G N ポリペプチドが、配列番号 2 と少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1

i) 配列番号21と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号33と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、前記RGNポリペプチドが、配列番号9と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

50

j) 配列番号 22 と少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 34 と少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む gRNA であって、前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 10 と少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する アミノ酸配列を含む、gRNA、

k) 配列番号 23 と少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 35 と少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む gRNA であって、前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 11 と少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する アミノ酸配列を含む、gRNA、及び

l) 配列番号 24 と少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 36 と少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む gRNA であって、前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 12 と少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する アミノ酸配列を含む、gRNA、からなる群から選択される、請求項 51～61 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 64】

前記標的 DNA 配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) に隣接して位置する、請求項 51～63 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 65】

前記標的 DNA 配列が、細胞内にある、請求項 51～64 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 66】

前記 1 つ以上のガイド RNA が、前記標的 DNA 配列にハイブリダイズすることができ、前記ガイド RNA が、前記標的 DNA 配列の切断を導くために、前記 RGN ポリペプチドと複合体を形成することができる、請求項 51～65 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 67】

前記切断が、二本鎖切断を生成する、請求項 66 に記載の系。

【請求項 68】

前記切断が、一本鎖切断を生成する、請求項 66 に記載の系。

【請求項 69】

前記 RGN ポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである、請求項 51～65 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 70】

前記 RGN ポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、請求項 51～69 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 71】

前記プライム編集ポリペプチドが、DNA ポリメラーゼを含む、請求項 70 に記載の系。

【請求項 72】

前記プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、請求項 70 に記載の系。

【請求項 73】

前記 RGN ポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、請求項 51～69 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 74】

10

20

30

40

50

前記塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、請求項 73 に記載の系。

【請求項 75】

前記デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、請求項 74 に記載の系。

【請求項 76】

前記デアミナーゼが、配列番号 377～448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、請求項 74 に記載の系。

【請求項 77】

前記デアミナーゼが、配列番号 377～448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、請求項 74 に記載の系。

【請求項 78】

前記 RGN ポリペプチドが、1 つ以上の核局在化シグナルを含む、請求項 51～77 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 79】

前記 RGN ポリペプチドが、真核生物細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項 51～78 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 80】

前記系が、1 つ以上のドナーポリヌクレオチドを更に含む、請求項 51～79 のいずれか一項に記載の系。

【請求項 81】

請求項 51～80 のいずれか一項に記載の系を含む、細胞。

【請求項 82】

請求項 1～18 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 19～25 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 26 若しくは 81 に記載の細胞、請求項 33～49 のいずれか一項に記載の RGN ポリペプチド、請求項 50 に記載の RNP 複合体、又は請求項 51～80 のいずれか一項に記載の系と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 83】

DNA 分子の標的 DNA 配列に結合するための方法であって、請求項 51～80 のいずれか一項に記載の系を、前記標的 DNA 配列又は前記標的 DNA 配列を含む細胞に送達することを含む、方法。

【請求項 84】

前記 RGN ポリペプチド又は前記ガイド RNA が、検出可能な標識を更に含み、それによって、前記標的 DNA 配列の検出を可能にする、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

前記ガイド RNA 又は前記 RGN ポリペプチドが、発現調節因子を更に含み、それによって、前記標的 DNA 配列又は前記標的 DNA 配列による転写制御下にある遺伝子の発現を調節する、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 86】

DNA 分子の標的 DNA 配列を切断及び／又は修飾するための方法であって、請求項 36～57 のいずれか一項に記載の系を、前記標的 DNA 配列又は前記 DNA 分子を含む細胞に送達することを含み、前記標的 DNA 配列の切断又は修飾が生じる、方法。

【請求項 87】

前記修飾された標的 DNA 配列が、異種 DNA の前記標的 DNA 配列への挿入を含む、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 88】

前記修飾された標的 DNA 配列が、前記標的 DNA 配列からの少なくとも 1 つのヌクレオチドの欠失を含む、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 89】

前記修飾された標的 DNA 配列が、前記標的 DNA 配列における少なくとも 1 つのヌク

10

20

30

40

50

レオチドの変異を含む、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 90】

DNA 分子の標的 DNA 配列に結合するための方法であって、

a)

i) 前記標的 DNA 配列にハイブリダイズすることができる 1 つ以上のガイド RNA と、

ii) 配列番号 1 ~ 12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む RGN ポリペプチドとを、

RNA 誘導型ヌクレアーゼ (RGN) リボヌクレオチド複合体の形成に好適な条件下で組み合わせることによって、前記 RGN リボヌクレオチド複合体を組み立てることと、

b) 前記標的 DNA 配列又は前記標的 DNA 配列を含む細胞を、組み立てられた前記 RGN リボヌクレオチド複合体と接触させることと、を含み、

前記 1 つ以上のガイド RNA が、前記標的 DNA 配列にハイブリダイズし、それによって、前記標的 DNA 配列に結合するように前記 RGN ポリペプチドを導く、方法。

【請求項 91】

前記 RGN ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 92】

前記方法が、インビトロ、インビボ、又はエクスビボで実行される、請求項 90 又は 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記 RGN ポリペプチド又は前記ガイド RNA が、検出可能な標識を更に含み、それによって、前記標的 DNA 配列の検出を可能にする、請求項 90 ~ 92 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 94】

前記ガイド RNA 又は前記 RGN ポリペプチドが、発現調節因子を更に含み、それによって、前記標的 DNA 配列の発現の調節を可能にする、請求項 90 ~ 92 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 95】

前記 RGN ポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドを更に含み、それによって、前記標的 DNA 配列の修飾を可能にする、請求項 90 ~ 92 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 96】

前記プライム編集ポリペプチドが、DNA ポリメラーゼを含む、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

前記プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 98】

前記 RGN ポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドを更に含み、それによって、前記標的 DNA 配列の修飾を可能にする、請求項 90 ~ 92 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 99】

前記塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼを含む、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 100】

前記デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

前記 RGN ポリペプチドが、前記標的 DNA 配列を切断することができ、それによって、前記標的 DNA 配列の切断及び／又は修飾を可能にする、請求項 90 ~ 92 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 102】

10

20

30

40

50

DNA分子の標的DNA配列を切断及び／又は修飾するための方法であって、

a) RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドであって、前記RGNが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチド、及び

b) 前記(a)のRGNを前記標的DNA配列に標的化することが可能な1つ以上のガイドRNAと、前記DNA分子を接触させることを含み、

前記1つ以上のガイドRNAが、前記標的DNA配列にハイブリダイズし、それによって、前記標的DNA配列に結合するように前記RGNポリペプチドを導き、前記標的DNA配列の切断及び／又は修飾が生じる、方法。

【請求項103】

10

前記RGNポリペプチドが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項102に記載の方法。

【請求項104】

前記RGNポリペプチドによる切断が、二本鎖切断を生成する、請求項102又は103に記載の方法。

【請求項105】

前記RGNポリペプチドによる切断が、一本鎖切断を生成する、請求項102又は103に記載の方法。

【請求項106】

20

前記RGNポリペプチドが、ニッカーゼであり、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、請求項102又は103に記載の方法。

【請求項107】

前記プライム編集ポリペプチドが、DNAポリメラーゼを含む、請求項106に記載の方法。

【請求項108】

前記プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、請求項106に記載の方法。

【請求項109】

前記RGNポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼであり、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、請求項102又は103に記載の方法。

30

【請求項110】

前記塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、請求項109に記載の方法。

【請求項111】

前記デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、請求項110に記載の方法。

【請求項112】

前記デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項110に記載の方法。

【請求項113】

40

前記デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する、請求項110に記載の方法。

【請求項114】

前記修飾された標的DNA配列が、異種DNAの前記標的DNA配列への挿入を含む、請求項102又は103に記載の方法。

【請求項115】

前記修飾された標的DNA配列が、前記標的DNA配列からの少なくとも1つのヌクレオチドの欠失を含む、請求項102又は103に記載の方法。

【請求項116】

50

前記修飾された標的 DNA 配列が、前記標的 DNA 配列における少なくとも 1 つのヌクレオチドの変異を含む、請求項 102 又は 103 に記載の方法。

【請求項 117】

前記標的 DNA 配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) に隣接して位置する、請求項 83～116 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 118】

前記標的 DNA 配列が、真核生物標的 DNA 配列である、請求項 83～117 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 119】

前記 gRNA が、シングルガイド RNA (sgRNA) である、請求項 83～118 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 120】

前記 sgRNA が、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を更に含む、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

前記 gRNA が、デュアルガイド RNA である、請求項 83～118 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 122】

a) 前記 RGN が、配列番号 1 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 13 と少なくとも 90% の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 25 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

b) 前記 RGN が、配列番号 2 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 14 と少なくとも 90% の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 26 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

c) 前記 RGN が、配列番号 3 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 15 と少なくとも 90% の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 27 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

d) 前記 RGN が、配列番号 4 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 16 と少なくとも 90% の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 28 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

e) 前記 RGN が、配列番号 5 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 17 と少なくとも 90% の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 29 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

f) 前記 RGN が、配列番号 6 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 18 と少なくとも 90% の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 30 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

g) 前記 RGN が、配列番号 7 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 19 と少なくとも 90% の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 31 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

h) 前記 RGN が、配列番号 8 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 20 と少なくとも 90% の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 32 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

i) 前記 RGN が、配列番号 9 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 21 と少なくとも 90% の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 33 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

j) 前記 RGN が、配列番号 10 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 22 と少なくとも 90% の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 34 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

、

k) 前記 RGN が、配列番号 11 と少なくとも 90% の配列同一性を有し、前記ガイド

10

20

30

40

50

L) 前記 R G N が、配列番号 1 2 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、前記ガイド R N A が、配列番号 2 4 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する c r R N A 反復配列と、配列番号 3 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、請求項 8 3 ～ 1 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

a) 前記 RGN が、配列番号 1 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記 ガイド RNA が、配列番号 13 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 25 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

b) 前記 R G N が、配列番号 2 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記 ガイド RNA が、配列番号 14 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する c r RNA 反復配列と、配列番号 26 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する t r a c r RNA と、を含むか、

c) 前記 RGN が、配列番号 3 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記 ガイド RNA が、配列番号 15 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 27 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

d) 前記 RGN が、配列番号 4 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記 ガイド RNA が、配列番号 16 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 28 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

e) 前記 RGN が、配列番号 5 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記 ガイド RNA が、配列番号 17 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 29 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

f) 前記 RGN が、配列番号 6 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記 ガイド RNA が、配列番号 18 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 30 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

g) 前記 RGN が、配列番号 7 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 19 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 31 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

h) 前記 RGN が、配列番号 8 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 20 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 32 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

i) 前記 RGN が、配列番号 9 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 21 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 33 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

j) 前記 RGN が、配列番号 10 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 22 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 34 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、

k) 前記 RGN が、配列番号 11 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 23 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 35 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する tracrRNA と、を含むか、又は

l) 前記 RGN が、配列番号 12 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有し、前記ガイド RNA が、配列番号 24 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する crRNA 反復配列と、配列番号 36 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、請求項 83 ~ 121 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 124】

前記標的 DNA 配列が、細胞内にある、請求項 83 ~ 123 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 125】

前記 RGN ポリペプチドが発現され、前記標的 DNA 配列を切断及び修飾して、修飾された標的 DNA 配列を含む DNA 分子を産生する条件下で前記細胞を培養することと、前記修飾された標的 DNA 配列を含む細胞を選択することと、を更に含む、請求項 124 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 6】

請求項 1 2 5 に記載の方法による修飾された標的 DNA 配列を含む、細胞。

【請求項 1 2 7】

請求項 2 6、8 1 及び 1 2 6 のいずれか一項に記載の細胞と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 1 2 8】

疾患、障害、又は状態を治療する方法であって、前記方法が、疾患、障害、又は状態の治療を必要とする対象に、有効量の請求項 8 2 又は 1 2 7 に記載の薬学的組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 1 2 9】

前記疾患が、原因となる変異と関連し、前記有効量の前記薬学的組成物が、前記原因となる変異を修正する、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記対象が、前記疾患、障害、又は状態を発症するリスクを有する、請求項 1 2 8 又は 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

CRISPR RNA (crRNA) 又は crRNA をコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子であって、前記 crRNA が、スペーサー配列及び CRISPR 反復配列を含み、前記 CRISPR 反復配列が、配列番号 1 3 ~ 2 4 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、

a) 前記 crRNA と、

b) 前記 crRNA の前記 CRISPR 反復配列にハイブリダイズしたトランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) と、を含むガイド RNA が、

前記ガイド RNA が RNA 誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドに結合したときに、前記 crRNA の前記スペーサー配列を介して配列特異的に標的 DNA 配列にハイブリダイズすることができる、核酸分子。

【請求項 1 3 2】

crRNA をコードする前記ポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチドに対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 3 1 に記載の核酸分子。

【請求項 1 3 3】

前記 CRISPR 反復配列が、配列番号 1 3 ~ 2 4 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 1 3 1 又は 1 3 2 に記載の核酸分子。

【請求項 1 3 4】

前記 crRNA をコードする前記ポリヌクレオチドを含む請求項 1 3 1 ~ 1 3 3 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 1 3 5】

前記ベクターが、前記 tracrRNA をコードするポリヌクレオチドを更に含む、請求項 1 3 4 に記載のベクター。

【請求項 1 3 6】

前記 tracrRNA が、

a) 配列番号 2 5 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する tracrRNA であって、前記 CRISPR 反復配列が、配列番号 1 3 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する、tracrRNA、

b) 配列番号 2 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する tracrRNA であって、前記 CRISPR 反復配列が、配列番号 1 4 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する、tracrRNA、

c) 配列番号 2 7 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する tracrRNA であって、前記 CRISPR 反復配列が、配列番号 1 5 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する

10

20

30

40

50

、 t r a c r R N A、

d) 配列番号 28 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 16 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、

e) 配列番号 29 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 17 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、

f) 配列番号 30 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 18 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、

g) 配列番号 31 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 19 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、

h) 配列番号 32 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 20 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、

i) 配列番号 33 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 21 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、

j) 配列番号 34 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 22 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、

k) 配列番号 35 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 23 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、及び

l) 配列番号 36 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 24 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、からなる群から選択される、請求項 135 に記載のベクター。

【請求項 137】

前記 t r a c r R N A が、

a) 配列番号 25 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 13 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、

b) 配列番号 26 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 14 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、

c) 配列番号 27 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 15 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、

d) 配列番号 28 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A であって、前記 C R I S P R 反復配列が、配列番号 16 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、 t r a c r R N A、

e) 配列番号 29 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、前記 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 17 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、*tracrRNA*、

f) 配列番号 30 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、前記 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 18 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、*tracrRNA*、

g) 配列番号 31 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、前記 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 19 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、*tracrRNA*、

h) 配列番号 32 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、前記 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 20 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、*tracrRNA*、

i) 配列番号 33 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、前記 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 21 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、*tracrRNA*、

j) 配列番号 34 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、前記 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 22 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、*tracrRNA*、

k) 配列番号 35 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、前記 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 23 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、*tracrRNA*、及び

l) 配列番号 36 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、前記 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 24 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する、*tracrRNA*、からなる群から選択される、請求項 135 に記載のベクター。

【請求項 138】

前記ベクターが、前記 *RGN* ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に含む、請求項 134 ~ 137 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 139】

前記 *RGN* ポリペプチドが、

a) 配列番号 1 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *RGN* ポリペプチドであって、前記 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 13 と少なくとも 90 % の配列同一性を有し、前記 *tracrRNA* が、配列番号 25 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、*RGN* ポリペプチド、

b) 配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

c) 配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

d) 配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

e) 配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

f) 配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

g) 配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

h) 配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

i) 配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

j) 配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

k) 配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、及び

l) 配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、からなる群から選択される、請求項138に記載のベクター。

【請求項140】

前記RGNポリペプチドが、

a) 配列番号1と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号13と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

50

50

h) 配列番号 8 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、前記 CRISPR 反復配列が、配列番号 20 と少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有し、前記 *tracrRNA* が、配列番号 32 と少なくとも 95 %、少なくとも 9

6 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

i) 配列番号9と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号21と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号33と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

j) 配列番号10と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号22と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号34と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

k) 配列番号11と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号23と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号35と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、及び

l) 配列番号12と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、前記CRISPR反復配列が、配列番号24と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有し、前記tracrRNAが、配列番号36と少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、からなる群から選択される、請求項138に記載のベクター。

【請求項141】

配列番号25～36のうちのいずれか1つと少なくとも90 %の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) 又はtracrRNAをコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子であって、

a) 前記tracrRNAと、

b) スペーサー配列及びCRISPR反復配列を含むcrRNAであって、前記tracrRNAが、前記crRNAの前記CRISPR反復配列とハイブリダイズする、crRNAと、を含むガイドRNAが、

前記ガイドRNAがRNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドに結合したときに、前記crRNAの前記スペーサー配列を介して配列特異的に標的DNA配列にハイブリダイズすることができる、核酸分子。

【請求項142】

tracrRNAをコードする前記ポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチドに対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、請求項141に記載の核酸分子。

【請求項143】

前記tracrRNAが、配列番号25～36のうちのいずれか1つと少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、又は100 %の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項141又は142に記載の核酸分子。

10

20

30

40

50

【請求項 144】

前記 *tracrRNA* をコードする前記ポリヌクレオチドを含む請求項 141～143 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 145】

前記 *crRNA* を含む請求項 131～133 のいずれか一項に記載の核酸分子と、前記 *tracrRNA* を含む請求項 141～143 のいずれか一項に記載の核酸分子と、を含む、シングルガイド *RNA*。

【請求項 146】

前記 *crRNA* を含む請求項 131～133 のいずれか一項に記載の核酸分子と、前記 *tracrRNA* を含む請求項 141～143 のいずれか一項に記載の核酸分子と、を含む、デュアルガイド *RNA*。

【請求項 147】

請求項 131～133 及び 141～143 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 134～140 及び 144 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 145 に記載のシングルガイド *RNA*、又は請求項 146 に記載のデュアルガイド *RNA* を含む、細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年1月24日に出願された米国仮特許出願第 63 / 302, 271 号、及び 2022年12月5日に出願された同第 63 / 386, 061 号の優先権を主張するものであり、これらの各々は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0002】

XML ファイルとして電子提出された配列表への参照

本出願は、USPTO 特許センターを介して *xml* 形式で提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2023年1月23日に作成された当該 *xml* コピーは、L103438__1260WO__Seq__List.xml と名付けられ、サイズは 905 KB である。

【0003】

本発明は、分子生物学及び遺伝子編集の分野に関する。

【背景技術】

【0004】

標的ゲノム編集又は修飾は、急速に基礎研究及び応用研究のための重要なツールとなりつつある。初期の方法は、メガヌクレアーゼなどのヌクレアーゼ、ジンクフィンガー融合タンパク質、又は *TALEN* を操作することを含み、各特定の標的配列に特異的な、操作された、プログラム可能な、配列特異的 DNA 結合ドメインを有するキメラヌクレアーゼの生成を必要とする。クラスター化された規則的な配置の短い回文リピート (*CRISPR*) - *Cas* 細菌系の *CRISPR* 関連 (*Cas*) タンパク質などの *RNA* 誘導型ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼを特定の標的配列と特異的にハイブリダイズするガイド *RNA* と複合体化することによって、特定の配列の標的化を可能にする。標的的特異的ガイド *RNA* を産生することは、各標的配列についてキメラヌクレアーゼを生成することよりも低コストであり、より効率的である。このような *RNA* 誘導型ヌクレアーゼを使用して、エラーが発生しやすい非相同末端結合 (*NHEJ*) を介して修復され、特定のゲノム位置に変異を導入する配列特異的な二本鎖切断を導入することによって、任意選択的にゲノムを編集することができる。代替的に、異種 DNA を、相同性指向修復によりゲノム部位に導入してもよい。*RNA* 誘導型ヌクレアーゼ (*RGN*) は、デアミナーゼと融合すると、塩基編集に使用することもできる。

【発明の概要】

【0005】

目的の標的配列に結合するための組成物及び方法が提供される。組成物は、目的の標的

10

20

30

40

50

配列の切断又は修飾、目的の標的配列の検出、及び目的の配列の発現の修飾における使用が見出される。組成物は、RNA誘導型ヌクレアーゼ（RGN）ポリペプチド、CRISPR RNA（crRNA）、トランス活性化CRISPR RNA（tracrRNA）、ガイドRNA（gRNA）、それらをコードする核酸分子、並びに核酸分子を含むベクター及び宿主細胞を含む。また、目的の標的配列に結合するためのRGN系であって、RNA誘導型ヌクレアーゼポリペプチドと、1つ以上のガイドRNAと、を含む、RGN系が提供される。したがって、本明細書に開示される方法は、目的の標的配列に結合することに関し、いくつかの実施形態では、目的の標的配列を切断又は修飾することに関する。目的の標的配列は、例えば、非相同末端結合、導入されたドナー配列による相同性指向修復、又は塩基編集の結果として修飾され得る。

10

【0006】

第1の態様では、本開示は、RNA誘導型ヌクレアーゼ（RGN）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子であって、ポリヌクレオチドが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むRGNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、RGNポリペプチドが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができるガイドRNA（gRNA）に結合したときに、RNA誘導型配列特異的に標的DNA配列と結合することができる、核酸分子を提供する。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0007】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている。

【0008】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、結合時に標的DNA配列を切断することができる。

30

【0009】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、二本鎖切断を生成することができる。

【0010】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、一本鎖切断を生成することができる。

【0011】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである。

40

【0012】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、プライム編集ポリペプチドは、DNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、プライム編集ポリペプチドは、逆転写酵素を含む。上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、塩基編集ポリペプチドは、デアミナーゼである。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、シトシンデアミナーゼ又はシチジンデアミナーゼである。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配

50

列同一性を有する。上記態様のいくつかの実施形態では、デアミナーゼは、配列番号 377 ~ 448 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する。

【0013】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、1つ以上の核局在化シグナルを含む。

【0014】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、真核生物細胞における発現のためにコドン最適化されている。

【0015】

上記態様のいくつかの実施形態では、標的DNA配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に隣接して位置する。

【0016】

別の態様では、本開示は、上述の核酸分子を含む、ベクターを提供する。

【0017】

上記態様のいくつかの実施形態では、ベクターは、標的DNA配列にハイブリダイズすることができるgRNAをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を更に含む。

【0018】

上記態様のいくつかの実施形態では、ガイドRNAは、a) 配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、b) 配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、c) 配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、d) 配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、e) 配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、f) 配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、g) 配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、h) 配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

含む、ガイドRNA、i) 配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、j) 配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、及びl) 配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0019】

上記態様のいくつかの実施形態では、ガイドRNAは、a) 配列番号13と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号25と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号1と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、b) 配列番号14と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号26と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号2と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、c) 配列番号15と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCRISPR RNAと、配列番号27と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号3と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、d) 配列番号16と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含むCR

50

なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、ガイド RNA であって、RGN ポリペプチドが、配列番号 9 と少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する アミノ酸配列を含む、ガイド RNA、j) 配列番号 22 と少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列を含む *CRISPR RNA* と、配列番号 34 と少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、ガイド RNA であって、RGN ポリペプチドが、配列番号 10 と少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する アミノ酸配列を含む、ガイド RNA、k) 配列番号 23 と少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列を含む *CRISPR RNA* と、配列番号 35 と少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、ガイド RNA であって、RGN ポリペプチドが、配列番号 11 と少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する アミノ酸配列を含む、ガイド RNA、及び l) 配列番号 24 と少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列を含む *CRISPR RNA* と、配列番号 36 と少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、ガイド RNA であって、RGN ポリペプチドが、配列番号 12 と少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する アミノ酸配列を含む、ガイド RNA、からなる群から選択される。

10

20

30

40

【0020】

上記態様のいくつかの実施形態では、gRNA は、シングルガイド RNA である。いくつかの実施形態では、シングルガイド RNA は、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を更に含む。

【0021】

上記態様のいくつかの実施形態では、gRNA は、デュアルガイド RNA である。

【0022】

別の態様では、本開示は、上述の核酸分子又は上述のベクターを含む、細胞を提供する。更に別の態様では、本開示は、RGN ポリペプチドを作製するための方法であって、RGN ポリペプチドが発現される条件下で、上述の細胞を培養することを含む、方法を提供する。

【0023】

別の態様では、本開示は、RGN ポリペプチドを作製するための方法であって、配列番号 1 ~ 12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 90% の配列同一性を有する アミノ酸配列

50

を含むRNA誘導型ヌクレアーゼ（RGN）ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸分子を細胞に導入することであって、RGNポリペプチドが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができるガイドRNA（gRNA）に結合したときに、RNA誘導型配列特異的に標的DNA配列に結合することができる、導入することと、RGNポリペプチドが発現される条件下で細胞を培養することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0024】

上記態様のいくつかの実施形態では、方法は、RGNポリペプチドを精製することを更に含む。

【0025】

上記態様のいくつかの実施形態では、細胞は、RGNポリペプチドに結合して、RGNリボ核タンパク質複合体を形成することができる1つ以上のガイドRNAを更に発現する。

20

【0026】

上記態様のいくつかの実施形態では、方法は、RGNリボ核タンパク質複合体を精製することを更に含む。

【0027】

更に別の態様では、本開示は、RNA誘導型ヌクレアーゼ（RGN）ポリペプチドであって、RGNポリペプチドが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、RGNポリペプチドが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができるガイドRNA（gRNA）に結合したときに、RNA誘導型配列特異的にDNA分子の標的DNA配列と結合することができる、RNA誘導型ヌクレアーゼ（RGN）ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、単離されたRGNポリペプチドである。

30

40

【0028】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、結合時に標的DNA配列を切断することができる。

【0029】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドによる切断は、二本鎖切断を生成する。

【0030】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドによる切断は、一本鎖切断を生成する。

50

【0031】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである。

【0032】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、プライム編集ポリペプチドは、DNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、プライム編集ポリペプチドは、逆転写酵素を含む。

【0033】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、塩基編集ポリペプチドは、デアミナーゼである。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、シトシンデアミナーゼ又はシチジンデアミナーゼである。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、配列番号377～448のうちのいずれか1つと少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。

【0034】

上記態様のいくつかの実施形態では、標的DNA配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に隣接して位置する。

【0035】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、1つ以上の核局在化シグナルを含む。

【0036】

別の態様では、本開示は、上述のRGNポリペプチドと、RGNポリペプチドに結合したガイドRNAと、を含む、リボ核タンパク質(RNP)複合体を提供する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、シングルガイドRNAである。いくつかの実施形態では、シングルガイドRNAは、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む。更に別の態様では、本開示は、DNA分子の標的DNA配列に結合するための系であって、系が、a) 標的DNA配列にハイブリダイズすることができる1つ以上のガイドRNA、又は1つ以上のガイドRNA(gRNA)をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドと、b) 配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むRNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチド、又はRGNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、を含み、1つ以上のガイドRNAが、標的DNA配列にハイブリダイズことができ、1つ以上のガイドRNAが、DNA分子の標的DNA配列に結合するようにRGNポリペプチドを導くために、RGNポリペプチドと複合体を形成することができる、系を提供する。

【0037】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0038】

上記態様のいくつかの実施形態では、1つ以上のガイドRNAをコードするヌクレオチド配列及びRGNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のうちの少なくとも1つは、ヌクレオチド配列に対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている。

【0039】

上記態様のいくつかの実施形態では、1つ以上のガイドRNAをコードするヌクレオチド配列及びRGNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、1つのベクター上に位置する。

【0040】

更に別の態様では、本開示は、DNA分子の標的DNA配列に結合するための系であって、系が、a) 標的DNA配列にハイブリダイズすることができる1つ以上のガイドRNA、又は1つ以上のガイドRNA (gRNA) をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドと、b) 配列番号1~12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むRNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドと、を含み、1つ以上のガイドRNAが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができ、1つ以上のガイドRNAが、DNA分子の標的DNA配列に結合するようにRGNポリペプチドを導くために、RGNポリペプチドと複合体を形成することができる、系を提供する。

10

【0041】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0042】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号1~12のうちのいずれか1つと少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0043】

上記態様のいくつかの実施形態では、1つ以上のガイドRNAをコードするヌクレオチド配列のうちの少なくとも1つは、ヌクレオチド配列に対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている。

【0044】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチド及び1つ以上のガイドRNAは、天然に互いに複合体化されていることは見出されない。

【0045】

上記態様のいくつかの実施形態では、標的DNA配列は、真核生物標的DNA配列である。

30

【0046】

上記態様のいくつかの実施形態では、gRNAは、シングルガイドRNA (sgRNA) である。いくつかの実施形態では、sgRNAは、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む。

【0047】

上記態様のいくつかの実施形態では、gRNAは、デュアルガイドRNAである。

【0048】

上記態様のいくつかの実施形態では、gRNAは、a) 配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、b) 配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、c) 配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、d) 配列番号16

40

50

と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、e) 配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、f) 配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、g) 配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、h) 配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、i) 配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、j) 配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、k) 配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、及びl) 配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む。

10

20

30

40

50

【0049】

上記態様のいくつかの実施形態では、gRNAは、a) 配列番号13と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号25と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むgRNAであって、RGNポリペプチドが、配列番号1と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、b) 配列番号14と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号26と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも9

50

50

とも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 30 と少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む。

【0050】

上記態様のいくつかの実施形態では、標的 D N A 配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) に隣接して位置する。

【0051】

上記態様のいくつかの実施形態では、標的 D N A 配列は、細胞内にある。

10

【0052】

上記態様のいくつかの実施形態では、1つ以上のガイド R N A は、標的 D N A 配列にハイブリダイズすることができ、ガイド R N A は、標的 D N A 配列の切断を導くために、R G N ポリペプチドと複合体を形成することができる。

【0053】

上記態様のいくつかの実施形態では、切断は、二本鎖切断を生成する。

【0054】

上記態様のいくつかの実施形態では、切断は、一本鎖切断を生成する。

【0055】

上記態様のいくつかの実施形態では、R G N ポリペプチドは、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである。

20

【0056】

上記態様のいくつかの実施形態では、R G N ポリペプチドは、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、プライム編集ポリペプチドは、D N A ポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、プライム編集ポリペプチドは、逆転写酵素を含む。

【0057】

上記態様のいくつかの実施形態では、R G N ポリペプチドは、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている。

【0058】

上記態様のいくつかの実施形態では、塩基編集ポリペプチドは、デアミナーゼである。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、シトシンデアミナーゼ又はシチジンデアミナーゼである。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、配列番号 377 ~ 448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、配列番号 377 ~ 448 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する。

30

【0059】

上記態様のいくつかの実施形態では、R G N ポリペプチドは、1つ以上の核局在化シグナルを含む。

40

【0060】

上記態様のいくつかの実施形態では、R G N ポリペプチドは、真核生物細胞における発現のためにコドン最適化されている。

【0061】

上記態様のいくつかの実施形態では、系は、1つ以上のドナーポリヌクレオチドを更に含む。

【0062】

別の態様では、本開示は、上述の系を含む、細胞を提供する。

【0063】

50

更に別の態様では、本開示は、核酸分子、ベクター、細胞、RGNポリペプチド、RNP複合体、又は上述の系と、薬学的に許容可能な担体と、を含む、薬学的組成物を提供する。

【0064】

更に別の態様では、本開示は、DNA分子の標的DNA配列に結合するための方法であって、上記の系を標的DNA配列又は標的DNA配列を含む細胞に送達することを含む、方法を提供する。

【0065】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチド又はガイドRNAは、検出可能な標識を更に含み、それによって標的DNA配列の検出を可能にする。

10

【0066】

上記態様のいくつかの実施形態では、ガイドRNA又はRGNポリペプチドは、発現調節因子を更に含み、それによって標的DNA配列又は標的DNA配列による転写制御下にある遺伝子の発現を調節する。

【0067】

別の態様では、本開示は、DNA分子の標的DNA配列を切断及び／又は修飾するための方法であって、上述の系を標的DNA配列又はDNA分子を含む細胞に送達することを含み、標的DNA配列の切断又は修飾が生じる、方法を提供する。

【0068】

上記態様のいくつかの実施形態では、修飾された標的DNA配列は、標的DNA配列への異種DNAの挿入を含む。

20

【0069】

上記態様のいくつかの実施形態では、修飾された標的DNA配列は、標的DNA配列からの少なくとも1つのヌクレオチドの欠失を含む。

【0070】

上記態様のいくつかの実施形態では、修飾された標的DNA配列は、標的DNA配列における少なくとも1つのヌクレオチドの変異を含む。

【0071】

別の態様では、本開示は、DNA分子の標的DNA配列に結合するための方法であって、a) 標的DNA配列にハイブリダイズすることができる1つ以上のガイドRNAと、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むRGNポリペプチドとを、RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)リボヌクレオチド複合体の形成に好適な条件下で組み合わせることによって、RGNリボヌクレオチド複合体を組み立てることと、b) 標的DNA配列又は標的DNA配列を含む細胞を組み立てられたRGNリボヌクレオチド複合体と接触させることと、を含み、1つ以上のガイドRNAが、標的DNA配列にハイブリダイズし、それによって、標的DNA配列に結合するようにRGNポリペプチドを導くことと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有する。

30

【0072】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。

40

【0073】

上記態様のいくつかの実施形態では、方法は、インビトロ、インビボ、又はエクスピボで実行される。

50

【0074】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチド又はガイドRNAは、検出可能な標識を更に含み、それによって標的DNA配列の検出を可能にする。

【0075】

上記態様のいくつかの実施形態では、ガイドRNA又はRGNポリペプチドは、発現調節因子を更に含み、それによって、標的DNA配列の発現の調節を可能にする。

【0076】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結され、それによって、標的DNA配列の修飾を可能にする。いくつかの実施形態では、プライム編集ポリペプチドは、DNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、プライム編集ポリペプチドは、逆転写酵素を含む。

10

【0077】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結され、それによって、標的DNA配列の修飾を可能にする。いくつかの実施形態では、塩基編集ポリペプチドは、デアミナーゼを含む。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、シトシンデアミナーゼ又はシチジンデアミナーゼである。上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、標的DNA配列を切断することができ、それによって、標的DNA配列の切断及び／又は修飾を可能にする。

【0078】

別の態様では、本開示は、DNA分子の標的DNA配列を切断及び／又は修飾するための方法であって、a) RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドであって、RGNが、配列番号1~12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチド、及びb) (a)のRGNを標的DNA配列に標的化することが可能な1つ以上のガイドRNAと、DNA分子を接触させることを含み、1つ以上のガイドRNAが、標的DNA配列にハイブリダイズし、それによって、標的DNA配列に結合するようにRGNポリペプチドを導き、標的DNA配列の切断及び／又は修飾が生じる、方法を提供する。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有する。

20

【0079】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号1~12のうちのいずれか1つと少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。

30

【0080】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドによる切断は、二本鎖切断を生成する。

40

【0081】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドによる切断は、一本鎖切断を生成する。

【0082】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである。

【0083】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結され、それによって、標的DNA配列の修飾を可能にする。いくつかの実施形態では、プライム編集ポリペプチドは、DNAポリメラーゼを含む。いくつかの

50

実施形態では、プライム編集ポリペプチドは、逆転写酵素を含む。

【0084】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている。

【0085】

上記態様のいくつかの実施形態では、塩基編集ポリペプチドは、デアミナーゼである。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、シトシンデアミナーゼ又はシチジンデアミナーゼである。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、配列番号377～448のうちのいずれか1つと少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。

【0086】

上記態様のいくつかの実施形態では、修飾された標的DNA配列は、標的DNA配列への異種DNAの挿入を含む。

【0087】

上記態様のいくつかの実施形態では、修飾された標的DNA配列は、標的DNA配列からの少なくとも1つのヌクレオチドの欠失を含む。

【0088】

上記態様のいくつかの実施形態では、修飾された標的DNA配列は、標的DNA配列における少なくとも1つのヌクレオチドの変異を含む。

【0089】

上記態様のいくつかの実施形態では、標的DNA配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に隣接して位置する。

【0090】

上記態様のいくつかの実施形態では、標的DNA配列は、真核生物標的DNA配列である。

【0091】

上記態様のいくつかの実施形態では、gRNAは、シングルガイドRNA(sgRNA)である。いくつかの実施形態では、sgRNAは、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む。

【0092】

上記態様のいくつかの実施形態では、gRNAは、デュアルガイドRNAである。

【0093】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGN、ガイドRNA、及びtracrRNAは、a) 配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、b) 配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、c) 配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、d) 配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、e) 配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、f) 配列番号6と少

なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、g) 配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、h) 配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、i) 配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、j) 配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、k) 配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、並びにl) 配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を有するRGN、配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA、からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、RGNは、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有し、ガイドRNAは、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含み、tracrRNAは、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有する。

10

20

30

40

50

【0094】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGN、ガイドRNA、及びtracrRNAは、a) 配列番号1と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するRGN、配列番号13と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号25と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNA、b) 配列番号2と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するRGN、配列番号14と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号26と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNA、c) 配列番号3と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するRGN、配列番号15と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号27と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少

なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する

10
20
30
40
50

含むガイドRNA、及び配列番号33と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNA、j) 配列番号10と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するRGN、配列番号22と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号34と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNA、k) 配列番号11と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するRGN、配列番号23と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号35と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNA、並びにl) 配列番号12と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するRGN、配列番号24と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含むガイドRNA、及び配列番号36と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNA、からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、RGNは、配列番号6と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有し、ガイドRNAは、配列番号18と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するcrRNA反復配列を含み、tracrRNAは、配列番号30と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。

【0095】

上記態様のいくつかの実施形態では、標的DNA配列は、細胞内にある。

【0096】

上記態様のいくつかの実施形態では、方法は、RGNポリペプチドが発現され、標的DNA配列を切断及び修飾して、修飾された標的DNA配列を含むDNA分子を産生する条件下で細胞を培養することと、修飾された標的DNA配列を含む細胞を選択することと、を更に含む。

【0097】

別の態様では、本開示は、上述の方法による修飾された標的DNA配列を含む、細胞を提供する。

【0098】

更に別の態様では、本開示は、上述の細胞と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物を提供する。

【0099】

更に別の態様では、本開示は、疾患、障害、又は状態を治療する方法であって、疾患、障害、又は状態の治療を必要とする対象に、有効量の、上述の薬学的組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【0100】

上記態様のいくつかの実施形態では、疾患は、原因となる変異と関連し、薬学的組成物の有効量は、原因となる変異を修正又は欠失させる。

【0101】

上記態様のいくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、又は状態を発症するリスクを有する。

【0102】

別の態様では、本開示は、CRISPR RNA (crRNA) 又はcrRNAをコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子であって、crRNAが、スパーサー配列及びCRISPR反復配列を含み、CRISPR反復配列が、配列番号13～24のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、crRNA及びcrRNAのCRISPR反復配列にハイブリダイズしたトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) を含むガイドRNAが、ガイドRNAがRNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドに結合したときに、crRNAのスパーサー配列を介して配列特異的に標的DNA配列にハイブリダイズすることができる、核酸分子を提供する。いくつかの実施形態では、CRISPR反復配列は、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0103】

上記態様のいくつかの実施形態では、crRNAをコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている。

【0104】

上記態様のいくつかの実施形態では、CRISPR反復配列は、配列番号13～24のうちのいずれか1つと少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、CRISPR反復配列は、配列番号18と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0105】

別の態様では、本開示は、上述のcrRNAをコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子を含む、ベクターを提供する。

【0106】

上記態様のいくつかの実施形態では、ベクターは、tracrRNAをコードするポリヌクレオチドを更に含む。

【0107】

上記態様のいくつかの実施形態では、tracrRNAは、a) 配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、b) 配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、c) 配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、d) 配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNA

10

20

30

40

50

rRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、e) 配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、f) 配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、g) 配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、h) 配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、i) 配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、j) 配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、k) 配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、及びl) 配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を有する、tracrRNA、からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、tracrRNAは、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有し、CRISPR反復配列は、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有する。

10

20

【0108】

上記態様のいくつかの実施形態では、tracrRNAは、a) 配列番号25と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号13と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する、tracrRNA、b) 配列番号26と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号14と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する、tracrRNA、c) 配列番号27と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号15と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する、tracrRNA、d) 配列番号28と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するtracrRNAであって、CRISPR反復配列が、配列番号16と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する、tracrRNA、e) 配列番号29と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、

30

40

50

50

%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有し、CRISPR反復配列は、配列番号18と91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。

【0109】

上記態様のいくつかの実施形態では、ベクターは、RGNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に含む。

【0110】

上記態様のいくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、a) 配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、b) 配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、c) 配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、d) 配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、e) 配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、f) 配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、g) 配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、h) 配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、i) 配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、j) 配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、k) 配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、及びl) 配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有し、CRISPR反復配列は、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有し、tracrRNAは、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有する。

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

[illegible]

99%、又は100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、及びl)配列番号12と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、CRISPR反復配列が、配列番号24と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有し、tracrRNAが、配列番号36と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドは、配列番号6と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有し、CRISPR反復配列は、配列番号18と91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有し、tracrRNAは、配列番号30と91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有する。

10

20

30

40

50

【0112】

別の態様では、本開示は、配列番号25～36のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、トランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) 又はtracrRNAをコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子であって、tracrRNAと、スペーサー配列及びCRISPR反復配列を含むcrRNAであって、tracrRNAが、crRNAのCRISPR反復配列とハイブリダイズする、crRNAと、を含むガイドRNAが、ガイドRNAがRNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドに結合したときに、crRNAのスペーサー配列を介して、配列特異的に標的DNA配列にハイブリダイズすることができる、核酸分子を提供する。いくつかの実施形態では、tracrRNAは、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0113】

上記態様のいくつかの実施形態では、tracrRNAをコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている。

【0114】

上記態様のいくつかの実施形態では、tracrRNAは、配列番号25～36のうちのいずれか1つと少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、tracrRNAは、配列番号30と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0115】

別の態様では、本開示は、上述のtracrRNAをコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子を含む、ベクターを提供する。

【0116】

更に別の態様では、本開示は、上述のcrRNAを含む核酸分子と、上述のtracrRNAを含む核酸分子と、を含む、シングルガイドRNAを提供する。

【0117】

なお別の態様では、本開示は、上述のcrRNAを含む核酸分子と、上述のtracr

RNAを含む核酸分子と、を含む、ダブルガイドRNAを提供する。

【0118】

別の態様では、本開示は、上述の核酸分子、シングルガイドRNA、ダブルガイドRNA、又はベクターを含む、細胞を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0119】

【図1】複数の遺伝子上のLPG10134、LPG10136、LPG10138、LPG10139、LPG10141、LPG10145、LPG10146、LPG10147、LPG10150、LPG10155、LPG10159、及びLPG10160の編集率を提供する。RGNの発現カセット及びガイドRNAを含むプラスミドを、HEK293T細胞内に共トランスフェクトした。

10

【図2】シングルガイドRNA (sgRNA) SGN002661は、LPG10136 RNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) とともに、RGN及びsgRNAが活性化ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) 内でリボ核タンパク質 (RNP) 複合体として送達されるときに、フローサイトメトリーによって測定されるT細胞受容体アルファ (TRAC) 遺伝子の編集の75%以上を提供することを示す。B2M：ベーター2-ミクログロブリン。

【図3A】RNPの濃度の増加が編集を改善することを実証する。図は、活性化ヒトPBMCにおけるフローサイトメトリーによるベーター2-ミクログロブリン (B2M) 又はT細胞受容体アルファ (TRAC) のレベルの測定を通じて、タンパク質：RNA比1：2で、LPG10145及び様々なsgRNAから構成されるRNPの濃度を増加させる編集効率を示す。

20

【図3B】RNPの濃度の増加が編集を改善することを実証する。図は、活性化ヒトPBMCにおけるフローサイトメトリーによるベーター2-ミクログロブリン (B2M) 又はT細胞受容体アルファ (TRAC) のレベルの測定を通じて、タンパク質：RNA比1：2で、LPG10145及び様々なsgRNAから構成されるRNPの濃度を増加させる編集効率を示す。2つの異なるスパーサー長 (20又は25ヌクレオチド) を有するsgRNAを含むRNPの量が増加するにつれて増加する編集活性の用量依存性を示す。

【図4】LPG10145が複数の遺伝子内の標的を編集することができることを示す。LPG10145を、ヌクレオフェクションによりT細胞にRNPとして送達した。全てのガイドは、50%未満の変動係数 (CV) を示した。

30

【発明を実施するための形態】

【0120】

本明細書に記載される本発明の多くの修正及び他の実施形態は、前述の説明及び関連する図面に提示される教示の利益を有するこれらの発明が関連する当業者には思い浮かぶであろう。したがって、本発明が開示される特定の実施形態に限定されず、修正及び他の実施形態が添付の実施形態の範囲内に含まれることが意図されることを理解されたい。特定の用語が本明細書で用いられているが、それらは、一般的かつ説明的な意味でのみ使用され、限定の目的では使用されない。

【0121】

I. 概要

40

RNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) は、ゲノム内の特定の部位 (複数可) を標的とした操作を可能にし、治療及び研究用途のための遺伝子標的化の文脈において有用である。哺乳動物を含む様々な生物において、RNA誘導型ヌクレアーゼは、例えば、非相同末端結合及び相同組換えを刺激することによって、ゲノム操作に使用されている。本明細書に記載の組成物及び方法は、ポリヌクレオチドにおける一本鎖又は二本鎖切断の作成、ポリヌクレオチドの修飾、ポリヌクレオチド内の特定の部位の検出、又は特定の遺伝子の発現の修飾に有用である。

【0122】

本明細書に開示されるRNA誘導型ヌクレアーゼは、標的配列を修飾することによって遺伝子発現を変化させることができる。特定の実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼ

50

は、クラスター化された規則的な配置の短い回文リピート（C R I S P R）RNA誘導型ヌクレアーゼ系の一部として、ガイドRNA（gRNA）によって標的配列に導かれる。ガイドRNAは、標的配列に結合するようにRNA誘導型ヌクレアーゼを導くようにRNA誘導型ヌクレアーゼと複合体を形成し、いくつかの実施形態では、標的配列に一本鎖又は二本鎖切断を導入するため、RGNは、「RNA誘導型」であるとみなされる。標的配列が切断された後、標的配列のDNA配列が修復プロセス中に修飾されるように、切断を修復することができる。したがって、本明細書で提供されるのは、RNA誘導型ヌクレアーゼを使用して、宿主細胞のDNA中の標的配列を修飾するための方法である。例えば、RNA誘導型ヌクレアーゼを使用して、真核細胞又は原核細胞のゲノム遺伝子座における標的配列を修飾することができる。

10

【0123】

II. RNA誘導型ヌクレアーゼ

RNA誘導型ヌクレアーゼが本明細書に提供される。RNA誘導型ヌクレアーゼ（RGN）という用語は、特定の標的ヌクレオチド配列に配列特異的に結合し、ポリペプチドと複合体化し、標的配列とハイブリダイズするガイドRNA分子によって標的ヌクレオチド配列に導かれるポリペプチドを指す。RNA誘導型ヌクレアーゼは、結合時に標的配列を切断することができるが、RNA誘導型ヌクレアーゼという用語は、標的配列に結合することはできるが、切断することはできないヌクレアーゼ不活性型のRNA誘導型ヌクレアーゼも包含する。RNA誘導型ヌクレアーゼによる標的配列の切断は、一本鎖又は二本鎖切断をもたらす得る。二本鎖核酸分子の一本鎖のみを切断することができるRNA誘導型ヌクレアーゼは、本明細書においてニッカーゼと称される。

20

【0124】

本明細書に開示されるRNA誘導型ヌクレアーゼとしては、配列番号1～12としてそれぞれ記載されるLPG10134、LPG10136、LPG10138、LPG10139、LPG10141、LPG10145、LPG10146、LPG10147、LPG10150、LPG10155、LPG10159、及びLPG10160 RNA誘導型ヌクレアーゼ、並びにRNA誘導型配列特異的に標的ヌクレオチド配列に結合する能力を保持するその活性断片又はバリエーションが挙げられる。これらの実施形態のうちのいくつかでは、LPG10134、LPG10136、LPG10138、LPG10139、LPG10141、LPG10145、LPG10146、LPG10147、LPG10150、LPG10155、LPG10159、又はLPG10160 RGNの活性断片又はバリエーションは、一本鎖又は二本鎖の標的配列を切断することができる。いくつかの実施形態では、LPG10134、LPG10136、LPG10138、LPG10139、LPG10141、LPG10145、LPG10146、LPG10147、LPG10150、LPG10155、LPG10159、又はLPG10160 RGNの活性バリエーションは、配列番号1～12のうちのいずれか1つとして示されるアミノ酸配列と少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、LPG10134、LPG10136、LPG10138、LPG10139、LPG10141、LPG10145、LPG10146、LPG10147、LPG10150、LPG10155、LPG10159、又はLPG10160 RGNの活性断片は、配列番号1～12のうちのいずれか1つとして示されるアミノ酸配列の少なくとも50個、100個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、450個、500個、550個、600個、650個、700個、750個、800個、850個、900個、950個、1000個、1050個、又はそれ以上の連続したアミノ酸残基を含む。本明細書に提供されるRNA誘導型ヌクレアーゼは、ガイドRNAと相互作用するために、少なくとも1つのヌクレアーゼドメイン（例えば、DNaseドメイン、RNaseドメイン）並びに少なくとも1つのRNA認識ドメイン及び／又はRNA結合ドメインを含むことができる。本明細書で提供されるRNA誘導型ヌクレアーゼ

30

40

50

に見出すことができる更なるドメインとしては、DNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質-タンパク質相互作用ドメイン、及び二量体化ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本明細書に提供されるRNA誘導型ヌクレアーゼは、DNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質-タンパク質相互作用ドメイン、及び二量体化ドメインのうちの1つ以上と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を含むことができる。

【0125】

標的ヌクレオチド配列は、本明細書に提供されるRNA誘導型ヌクレアーゼによって結合され、RNA誘導型ヌクレアーゼと会合するガイドRNAとハイブリダイズする。次に、ポリペプチドがヌクレアーゼ活性を有する場合、標的配列をRNA誘導型ヌクレアーゼによって切断することができる。用語「切断する」又は「切断」は、標的配列内の一本鎖切断又は二本鎖切断のいずれかをもちし得る、標的ヌクレオチド配列の骨格内の少なくとも1つのホスホジエステル結合の加水分解を指す。本開示のRGNは、エンドヌクレアーゼとして機能するポリヌクレオチド内のヌクレオチドを切断することができるか、又はエキソヌクレアーゼであり、ポリヌクレオチドの末端（5'末端及び／又は3'末端）から連続したヌクレオチドを除去することができる。他の実施形態では、開示されたRGNは、ポリヌクレオチドの任意の位置内で標的配列のヌクレオチドを切断することができ、したがって、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼの両方として機能する。本開示のRGNによる標的ポリヌクレオチドの切断は、交錯（staggered）切断又は平滑末端をもたらしすることができる。

【0126】

本開示のRNA誘導型ヌクレアーゼは、細菌種又は古細菌種に由来する野生型配列であり得る。代替的に、RNA誘導型ヌクレアーゼは、野生型ポリペプチドのバリエーション又は断片であり得る。野生型RGNは、例えば、ヌクレアーゼ活性を変化させるか、又はPAM特異性を変化させるように修飾され得る。いくつかの実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼは、天然に存在しない。

【0127】

ある特定の実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼは、ニッカーゼとして機能し、標的ヌクレオチド配列の一本鎖のみを切断する。かかるRNA誘導型ヌクレアーゼは、単一の機能的ヌクレアーゼドメインを有する。特定の実施形態では、ニッカーゼは、正の鎖又は負の鎖を切断することができる。これらの実施形態のいくつかでは、ヌクレアーゼ活性が低下又は排除されるように、追加のヌクレアーゼドメインが変異されている。

【0128】

他の実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性を完全に欠き、本明細書中では、ヌクレアーゼ不活性型又はヌクレアーゼ不活性と称される。PCR媒介変異誘発及び部位特異的変異誘発などのアミノ酸配列に変異を導入するための当該技術分野で既知の任意の方法を、ニッカーゼ又はヌクレアーゼ不活性型RGNを生成するために使用することができる。例えば、米国特許公開第2014/0068797号及び米国特許第9,790,490号（その各々は、その全体が参照により組み込まれる）を参照されたい。ニッカーゼの非限定的な例は、配列番号551として本明細書に示されるLPG10145 D16Aニッカーゼである。RuvCドメインにおける変異を含み、機能的HNHドメインを有するニッカーゼは、塩基編集に有用であり、ニッカーゼは、デアミナーゼなどの塩基編集ポリペプチドに融合している。ニッカーゼの別の非限定的な例は、配列番号552として本明細書に示されるLPG10145 H611Aニッカーゼである。HNHドメインにおける変異を含み、機能的RuvCドメインを有するニッカーゼは、プライム編集に有用であり、ニッカーゼは、逆転写酵素などのプライム編集ポリペプチドに融合している。ヌクレアーゼ不活性型RGNの非限定的な例は、配列番号553として示されるLPG10145 D16A H611A配列である。

【0129】

ヌクレアーゼ活性を欠くRNA誘導型ヌクレアーゼは、融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド、又は小分子ペイロードを特定のゲノム位置に送達するために使用することができる。これらの実施形態のいくつかでは、RGNポリペプチド又はガイドRNAは、検出可能な標識に融合されて、特定の配列の検出を可能にすることができる。非限定的な例として、ヌクレアーゼ不活性型RGNは、検出可能な標識（例えば、蛍光タンパク質）に融合され、疾患と関連する特定の配列を標的として、疾患関連配列の検出を可能にすることができる。

【0130】

代替的に、ヌクレアーゼ不活性型RGNは、所望の配列の発現を変化させるために、特定のゲノム位置を標的とすることができる。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼ不活性型RNA誘導型ヌクレアーゼの標的配列への結合は、標的ゲノム領域内のRNAポリメラーゼ又は転写因子の結合を妨害することによって、標的配列又は標的配列による転写制御下にある遺伝子の発現の減少をもたらす。他の実施形態では、RGN（例えば、ヌクレアーゼ不活性型RGN）又はその複合体化ガイドRNAは、標的配列に結合すると、標的配列又は標的配列による転写制御下にある遺伝子の発現を抑制又は活性化させるのに役立つ発現調節因子を更に含む。これらの実施形態のいくつかでは、発現調節因子は、エピジェネティック機構を介して標的配列又は調節遺伝子の発現を調節する。

【0131】

他の実施形態では、ヌクレアーゼ不活性型RGN又はニッカーゼ活性を有するRGNは、特定のゲノム位置を標的として、塩基編集ポリペプチド、例えば、核酸塩基を直接化学的に修飾する（例えば、脱アミノ酸化する）（1つの核酸塩基から別の核酸塩基への変換をもたらす）デアミナーゼポリペプチド又はその活性バリエーション若しくは断片への融合を通じて標的ポリヌクレオチドの配列を修飾することができる。塩基編集ポリペプチドは、そのN末端又はC末端でRGNに融合され得る。更に、塩基編集ポリペプチドは、ペプチドリンカーを介してRGNに融合され得る。かかる組成物及び方法に有用なデアミナーゼポリペプチドの非限定的な例としては、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼ（Gaudelli et al. (2017) Nature 551: 464-471、米国特許公開第2017/0121693号及び同第2018/0073012号、並びに国際公開第2018/027078号に記載されるアデニンデアミナーゼ塩基編集エディタ、又は国際公開第2020/139873号、2020年9月11日出願された米国仮特許出願第63/077,089号、2021年2月8日出願された同第63/146,840号、及び2021年3月22日出願された同第63/164,273号、並びに2021年9月10日出願された国際出願第PCT/US2021/049853号に開示されたデアミナーゼのうちのいずれかなど（その各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる））が挙げられる。一実施形態では、そのような組成物及び方法に有用なデアミナーゼポリペプチドは、配列番号377~448のうちのいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含むシトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである。一実施形態では、そのような組成物及び方法に有用なデアミナーゼポリペプチドは、配列番号377~448として示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つと少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の同一性を有するシトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである。いくつかの実施形態では、このような本開示の組成物及び方法に有用なデアミナーゼポリペプチドは、国際公開第2020/139873号の表17（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示されるデアミナーゼである。更に、RGNと塩基編集酵素（例えば、シトシンデアミナーゼ）との間の特定の融合タンパク質はまた、デアミナーゼによって核酸分子中のチミジン、デオキシチミジン、又はチミンへのシチジン、デオキシチミジン、又はシトシンの変異率を増加させる少なくとも1つのウラシル安定化ポリペプチドを含み得ることが当該技術分野で知られている。ウラシル安定化ポリペプチドの非限定的な例としては

10

20

30

40

50

、2020年7月15日に出願された米国仮出願第63／052,175号、及び2021年7月15日に出願された国際出願第PCT／US2021／041809号（その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示されるもの（USP2（配列番号325）、及び塩基編集効率を増加させ得るウラシルグリコシラーゼ阻害剤（UGI）ドメイン（配列番号315）を含む）が挙げられる。したがって、融合タンパク質は、本明細書に記載のRGN又はそのバリエーション、デアミナーゼ、及び任意選択的に、UGI又はUSP2などの少なくとも1つのウラシル安定化ポリペプチドを含んでもよい。ある特定の実施形態では、塩基編集ポリペプチドに融合されるRGNは、塩基編集ポリペプチド（例えば、デアミナーゼ）によって作用されないDNA鎖を切断するニックアーゼである。

10

【0132】

いくつかの実施形態では、RGNは、プライム編集ポリペプチドに融合され得る。プライム編集は、ポリメラーゼと会合して機能する核酸プログラム可能DNA結合タンパク質を使用して、新しい遺伝情報を特定のDNA部位に直接書き込む、汎用性のある正確なゲノム編集方法である。プライム編集系は、ニックアーゼであるRGNを使用し、系は、プライム編集（PE）ガイドRNA（「PEG RNA」）でプログラムされる。PEG RNAは、標的配列を特定し、ガイドRNA上（例えば、5'末端若しくは3'末端、又はガイドRNAの内部部分）に操作された伸長によって、編集を含有する置換鎖の重合のためのテンプレートを提供するガイドRNAである。RGNニックアーゼ／プライム編集ポリペプチド融合物は、PEG RNAによって標的配列に誘導され、編集される配列の上流及びPAMの上流に標的鎖をニックし、標的鎖上に3'フラップを作製する。peg RNAは、標的鎖の3'フラップに相補的なプライマー結合部位（PBS）を含む。いくつかの実施形態では、PBSは、少なくとも約5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、又は50個のヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、peg RNAは、少なくとも5個（例えば、少なくとも5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、28個、19個、又は20個）のヌクレオチド長のPBSを含む。いくつかの実施形態では、peg RNAは、少なくとも8個のヌクレオチド長のPBSを含み得る。PBSと標的鎖の3'フラップのハイブリダイゼーションは、PEG RNAの伸長をテンプレートとして使用して、編集を含む置換鎖の重合を可能にする。PEG RNAの伸長は、RNA又はDNAから形成され得る。RNA伸長の場合、プライムエディタのポリメラーゼは、RNA依存性DNAポリメラーゼ（逆転写酵素など）であり得る。DNA伸長の場合、プライムエディタのポリメラーゼは、DNA依存性DNAポリメラーゼであり得る。

20

30

【0133】

所望の編集（例えば、単一の核酸塩基置換）を含有する置換鎖は、編集される標的配列の標的鎖と同じ配列を共有する（所望の編集を含むことを除く）。DNAの修復及び／又は複製の機構を通じて、標的配列の標的鎖は、所望の編集を含有する新たに合成された置換鎖によって置き換えられる。場合によっては、プライムエディタは、編集される所望の標的配列を検索及び位置決めするだけでなく、同時に、標的配列の対応する標的鎖の代わりにインストールされる所望の編集を含有する置換鎖をコードするため、プライム編集は「検索・置換」ゲノム編集技術と考えられ得る。したがって、いくつかの実施形態では、本開示のガイドRNAは、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む。いくつかの実施形態では、RGNに融合され得るプライム編集ポリペプチドは、DNAポリメラーゼを含む。ある特定の実施形態では、DNAポリメラーゼは、逆転写酵素である。いくつかの実施形態では、RGNは、ニックアーゼである。

40

【0134】

50

ポリペプチド又はドメインに融合されるRNA誘導型ヌクレアーゼは、リンカーによって分離又は接合され得る。本明細書で使用される「リンカー」という用語は、2つの分子又は部分、例えば、ヌクレアーゼの結合ドメイン及び切断ドメインを連結する化学基又は分子を指す。いくつかの実施形態では、リンカーは、RNA誘導型ヌクレアーゼのgRNA結合ドメインと、デアミナーゼなどの塩基編集ポリペプチドとを接合する。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヌクレアーゼ不活性型RGNとデアミナーゼを接合する。典型的には、リンカーは、2つの基、分子、若しくは他の部分の間に位置付けられるか、又はそれらに隣接し、共有結合を介して各々に接続され、したがって、両者を接続する。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸又は複数のアミノ酸（例えば、ペプチド又はタンパク質）である。いくつかの実施形態では、リンカーは、有機分子、基、ポリマー、又は化学部分である。いくつかの実施形態では、リンカーは、5～100個のアミノ酸長、例えば、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、30～35個、35～40個、40～45個、45～50個、50～60個、60～70個、70～80個、80～90個、90～100個、100～150個、又は150～200個のアミノ酸長である。より長いリンカー又はより短いリンカーもまた企図される。

10

【0135】

本開示のRNA誘導型ヌクレアーゼは、RGNの細胞核への輸送を強化するために、少なくとも1つの核局在化シグナル(NLS)を含むことができる。核局在化シグナルは、当該技術分野で知られており、一般に、塩基性アミノ酸のストレッチを含む（例えば、Lange et al., J. Biol. Chem. (2007) 282:5101-5105を参照されたい）。いくつかの実施形態では、RGNは、2個、3個、4個、5個、6個、又はそれ以上の核局在化シグナルを含む。核局在化シグナル（複数可）は、異種NLSであり得る。本開示のRGNに有用な核局在化シグナルの非限定的な例は、SV40大型T抗原、ヌクレオプラスミン、及びc-Mycの核局在化シグナルである（例えば、Ray et al. (2015) Bioconjug Chem 26(6):1004-7を参照されたい）。特定の実施形態では、RGNは、配列番号316又は317として示されるNLS配列を含む。RGNは、そのN末端、C末端、又はN末端及びC末端の両方に1つ以上のNLS配列を含むことができる。例えば、RGNは、N末端領域に2つのNLS配列、及びC末端領域に4つのNLS配列を含むことができる。

20

30

【0136】

ポリペプチドを特定の細胞下位置（複数可）に局在化する当該技術分野で既知の他の局在化シグナル配列もまた、RGNを標的化するために使用することができ、これには、プラスチド局在化配列、ミトコンドリア局在化配列、及びプラスチドとミトコンドリアの両方を標的とする二重標的化シグナル配列が含まれるが、これらに限定されない（例えば、Nassoury and Morse (2005) Biochim Biophys Acta 1743:5-19、Kunze and Berger (2015) Front Physiol doi.org/10.3389/fphys.2015.00259、Herrmann and Neupert (2003) IUBMB Life 55:219-225、Soll (2002) Curr Opin Plant Biol 5:529-535、Carrie and Small (2013) Biochim Biophys Acta 1833:253-259、Carrie et al. (2009) FEBS J 276:1187-1195、Silva-Filho (2003) Curr Opin Plant Biol 6:589-595、Peters and Small (2001) Biochim Biophys Acta 1541:54-63、Murcha et al. (2014) J Exp Bot 65:6301-6335、Mackenzie (2005) Trends Cell Biol 15:548-554、Glaser et al. (1998) Plant Mol Biol 38:311-338を参照されたい）。

40

50

【0137】

ある特定の実施形態では、本開示のRNA誘導型ヌクレアーゼは、RGNの細胞取り込みを促進する少なくとも1つの細胞透過性ドメインを含む。細胞透過性ドメインは当該技術分野で既知であり、一般に、正荷電アミノ酸残基（すなわち、ポリカチオン性細胞透過性ドメイン）、交互の極性アミノ酸残基及び非極性アミノ酸残基（すなわち、両親媒性細胞透過性ドメイン）、又は疎水性アミノ酸残基（すなわち、疎水性細胞透過性ドメイン）のストレッチを含む（例えば、Milletti F. (2012) Drug Discov Today 17: 850-860を参照されたい）。細胞透過性ドメインの非限定的な例は、ヒト免疫不全ウイルス1由来のトランス活性化転写活性化因子（TAT）である。

10

【0138】

核局在化シグナル、形質体局在化シグナル、ミトコンドリア局在化シグナル、二重標的化局在化シグナル、及び／又は細胞透過性ドメインは、アミノ末端（N末端）、カルボキシル末端（C末端）、又はRNA誘導型ヌクレアーゼの内部位置に位置し得る。

【0139】

本開示のRGNは、リンカーペプチドを介して、直接的又は間接的に、切断ドメイン、デアミナーゼドメイン、又は発現調節因子ドメインなどのエフェクタードメインに融合させることができる。そのようなドメインは、RNA誘導型ヌクレアーゼのN末端、C末端、又は内部位置に位置し得る。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のRGN成分は、ヌクレアーゼ不活性型RGN又はニックアーゼである。

20

【0140】

いくつかの実施形態では、RGN融合タンパク質は、切断ドメインを含み、これは、ポリヌクレオチド（すなわち、RNA、DNA、又はRNA/DNAハイブリッド）を切断することができる任意のドメインであり、制限エンドヌクレアーゼ及びホーミングエンドヌクレアーゼ、例えば、IIS型エンドヌクレアーゼ（例えば、FokI）を含むが、これらに限定されない（例えば、Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3379-3388、Linn et al. (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993を参照）。

【0141】

他の実施形態では、RGN融合タンパク質は、核酸塩基を脱アミナーゼし、1つの核酸塩基から別の核酸塩基への変換をもたらすデアミナーゼドメインを含み、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼ（例えば、Gaudelli et al. (2017) Nature 551: 464-471、米国特許公開第2017/0121693号及び同第2018/0073012号、米国特許第9,840,699号、並びに国際公開第2018/027078号、又は国際公開第2020/139873号、2020年9月11日に出願された米国仮特許出願第63/077,089号、2021年2月8日に出願された同第63/146,840号、及び2021年3月22日に出願された同第63/164,273号、並びに2021年9月10日に出願された国際出願第PCT/US2021/049853号に開示されたデアミナーゼのうちのいずれかなど（その各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）を含むが、これらに限定されない。

30

【0142】

いくつかの実施形態では、RGN融合タンパク質のエフェクタードメインは、転写を上方調節又は下方調節するのに役立つドメインである発現調節因子ドメインであり得る。発現調節因子ドメインは、エピジェネティック修飾ドメイン、転写抑制因子ドメイン、又は転写活性化ドメインであり得る。

【0143】

これらの実施形態のいくつかでは、RGN融合タンパク質の発現調節因子は、DNA又はヒストンタンパク質を共有結合的に修飾して、DNA配列を変化させることなくヒスト

40

50

ン構造及び／又は染色体構造を変化させ、遺伝子発現の変化（すなわち、上方調節又は下方調節）をもたらすエピジェネティック修飾ドメインを含む。エピジェネティック修飾の非限定的な例としては、リジン残基のアセチル化又はメチル化、アルギニンメチル化、セリン及びスレオニンリン酸化、並びにヒストンタンパク質のリジンユビキチン化及びスモイル化、並びにDNA中のシトシン残基のメチル化及びヒドロキシメチル化が挙げられる。エピジェネティック修飾ドメインの非限定的な例としては、ヒストンアセチルトランスフェラーゼドメイン、ヒストンデアセチラーゼドメイン、ヒストンメチルトランスフェラーゼドメイン、ヒストンデメチラーゼドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼドメイン、及びDNAデメチラーゼドメインが挙げられる。

【0144】

他の実施形態では、融合タンパク質の発現調節因子は、転写制御エレメント及び／又は転写調節タンパク質、例えば、RNAポリメラーゼ及び転写因子と相互作用して、少なくとも1つの遺伝子の転写を低減又は終結させる転写抑制因子ドメインを含む。転写抑制因子ドメインは、当該技術分野で既知であり、Sp1様抑制因子、IkB、及びKrueppel会合ボックス（KRAB）ドメインを含むが、これらに限定されない。

【0145】

なお他の実施形態では、融合タンパク質の発現調節因子は、転写制御エレメント及び／又は転写調節タンパク質、例えばRNAポリメラーゼ及び転写因子と相互作用して、少なくとも1つの遺伝子の転写を増加又は活性化させる転写活性化ドメインを含む。転写活性化ドメインは、当該技術分野で既知であり、単純ヘルペスウイルスVP16活性化ドメイン及びNFAT活性化ドメインを含むが、これらに限定されない。

【0146】

本開示のRGNポリペプチドは、検出可能な標識又は精製タグを含むことができる。検出可能な標識又は精製タグは、直接的に、又はリンカーペプチドを介して間接的に、RNA誘導型ヌクレアーゼのN末端、C末端、又は内部位置に位置し得る。これらの実施形態のいくつかでは、融合タンパク質のRGN成分は、ヌクレアーゼ不活性型RGNである。他の実施形態では、融合タンパク質のRGN成分は、ニックアーゼ活性を有するRGNである。

【0147】

検出可能な標識は、視覚化され得る、又はそうでなければ観察され得る分子である。検出可能な標識は、融合タンパク質（例えば、蛍光タンパク質）としてRGNに融合されてもよく、又は視覚的に又は他の手段によって検出することができるRGNポリペプチドにコンジュゲートされた小分子であってもよい。融合タンパク質として本開示のRGNに融合することができる検出可能な標識には、特異的抗体で検出することができる蛍光タンパク質又はタンパク質ドメインを含むが、これらに限定されない、任意の検出可能なタンパク質ドメインが含まれる。蛍光タンパク質の非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質（例えば、GFP、EGFP、ZsGreen1）及び黄色蛍光タンパク質（例えば、YFP、EYFP、ZsYellow1）が挙げられる。小分子検出可能標識の非限定的な例としては、 ^3H 及び ^{35}S などの放射性標識が挙げられる。

【0148】

RGNポリペプチドはまた、混合物（例えば、生体試料、培養培地）からタンパク質又は融合タンパク質を単離するために利用され得る任意の分子である精製タグを含むことができる。精製タグの非限定的な例としては、ビオチン、myc、マルトース結合タンパク質（MBP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、及び3X FLAGタグが挙げられる。

【0149】

III. ガイドRNA

本開示は、ガイドRNA及びそれをコードするポリヌクレオチドを提供する。「ガイドRNA」という用語は、標的配列とハイブリダイズし、関連するRNA誘導型ヌクレアーゼの標的ヌクレオチド配列への配列特異的結合を導く標的ヌクレオチド配列と十分な相補

10

20

30

40

50

性を有するヌクレオチド配列を指す。したがって、RGNのそれぞれのガイドRNAは、RGNに結合し、特定の標的ヌクレオチド配列に結合するようにRGNを誘導することができる1つ以上のRNA分子（一般に、1つ又は2つ）であり、RGNがニッカーゼ又はヌクレアーゼ活性を有するこれらの実施形態では、標的ヌクレオチド配列も切断する。一般に、ガイドRNAは、CRISPR RNA (crRNA) 及びトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) を含む。crRNA及びtracrRNAの両方を含む天然ガイドRNAは、一般的に、crRNAの反復配列及びtracrRNAの反復防止配列を介して互いにハイブリダイズする2つの別個のRNA分子を含む。

【0150】

CRISPRアレイ内の天然直接反復配列は、概して、28～37塩基対の長さの範囲であるが、その長さは、約23bp～約55bpの間で変化し得る。CRISPRアレイ内のスペーサー配列は、一般に、約32～約38bpの長さの範囲であるが、その長さは、約21bp～約72bpとすることができる。各CRISPRアレイは、一般に、50単位未満のCRISPR反復スペーサー配列を含む。CRISPRは、CRISPRアレイの大部分を含む、一次CRISPR転写産物と呼ばれる長い転写産物の一部として転写される。一次CRISPR転写産物は、Casタンパク質によって切断されてcrRNAを産生するか、又は場合によっては、追加のCasタンパク質によって成熟crRNAに更に処理されるプレcrRNAを産生する。成熟crRNAは、スペーサー配列及びCRISPR反復配列を含む。プレcrRNAが成熟した（又は処理された）crRNAに処理されるいくつかの実施形態では、成熟は、約1～約6個、又はそれ以上の5'、3'、又は5'及び3'ヌクレオチドの除去を伴う。目的の特定の標的ヌクレオチド配列のゲノム編集又は標的化の目的のために、プレcrRNA分子の成熟中に除去されるこれらのヌクレオチドは、ガイドRNAを生成又は設計するために必要ではない。

【0151】

CRISPR RNA (crRNA) は、スペーサー配列及びCRISPR反復配列を含む。「スペーサー配列」は、目的の標的ヌクレオチド配列と直接ハイブリダイズするヌクレオチド配列である。スペーサー配列は、目的の標的配列と完全に又は部分的に相補的であるように操作される。様々な実施形態では、スペーサー配列は、約8ヌクレオチド～約30ヌクレオチド、又はそれ以上を含むことができる。例えば、スペーサー配列は、約8個、約9個、約10個、約11個、約12個、約13個、約14個、約15個、約16個、約17個、約18個、約19個、約20個、約21個、約22個、約23個、約24個、約25個、約26個、約27個、約28個、約29個、約30個、又はそれ以上のヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個又はそれ以上のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、約10個～約26個のヌクレオチド長、又は約12個～約30個のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、19～27個のヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、特に、RGNが、配列番号6として示されるアミノ酸配列又はその活性バリエーション若しくは断片を有する場合、スペーサー配列は、21～24個のヌクレオチド長である。特定の実施形態では、スペーサー配列は、約30個のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、30個のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、スペーサー配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを使用して最適にアラインメントされた場合、約50%若しくはそれより大きい、約60%若しくはそれより大きい、約70%若しくはそれより大きい、約75%若しくはそれより大きい、約80%若しくはそれより大きい、約81%若しくはそれより大きい、約82%若しくはそれより大きい、約83%若しくはそれより大きい、約84%若しくはそれより大きい、約85%若しくはそれより大きい、約86%若しくはそれより大きい、約87%若しくはそれより大きい、約88%若しくはそれより大きい、約89%若しくはそれより大きい、約90%若しくはそれより大きい、

約 91% 若しくはそれより大きい、約 92% 若しくはそれより大きい、約 93% 若しくはそれより大きい、約 94% 若しくはそれより大きい、約 95% 若しくはそれより大きい、約 96% 若しくはそれより大きい、約 97% 若しくはそれより大きい、約 98% 若しくはそれより大きい、約 99% 若しくはそれより大きい、又はそれ以上を含むが、これらに限定されない、50%～99% 又はそれ以上である。特定の実施形態では、スパーサー配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを使用して最適にアラインメントされた場合、50%、60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上である。特定の実施形態では、スパーサー配列は、二次構造を含まず、これは、mF

10

old (例えば、Zuker and Stiegler (1981) Nucleic Acids Res. 9:133-148 を参照されたい) 及び RNA fold (例えば、Gruber et al. (2008) Cell 106(1):23-24 を参照されたい) を含むが、これらに限定されない、当該技術分野において知られている任意の好適なポリヌクレオチド折り畳みアルゴリズムを使用して予測することができる。

【0152】
CRISPR RNA 反復配列は、それ自体で、又はハイブリダイズされた tracrRNA と協調して、RGN 分子によって認識される構造を形成するヌクレオチド配列を含む。様々な実施形態では、CRISPR RNA 反復配列は、約 8 個のヌクレオチド～約 30 個のヌクレオチド、又はそれ以上を含むことができる。例えば、CRISPR 反復配列は、約 8 個、約 9 個、約 10 個、約 11 個、約 12 個、約 13 個、約 14 個、約 15 個、約 16 個、約 17 個、約 18 個、約 19 個、約 20 個、約 21 個、約 22 個、約 23 個、約 24 個、約 25 個、約 26 個、約 27 個、約 28 個、約 29 個、約 30 個、又はそれ以上のヌクレオチド長であり得る。特定の実施形態では、CRISPR 反復配列は、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、30 個又はそれ以上のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、CRISPR 反復配列とその対応する tracrRNA 配列との間の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを使用して最適にアラインメントされた場合、約 50% 若しくはそれより大きい、約 60% 若しくはそれより大きい、約 70% 若しくはそれより大きい、約 75% 若しくはそれより大きい、約 80% 若しくはそれより大きい、約 81% 若しくはそれより大きい、約 82% 若しくはそれより大きい、約 83% 若しくはそれより大きい、約 84% 若しくはそれより大きい、約 85% 若しくはそれより大きい、約 86% 若しくはそれより大きい、約 87% 若しくはそれより大きい、約 88% 若しくはそれより大きい、約 89% 若しくはそれより大きい、約 90% 若しくはそれより大きい、約 91% 若しくはそれより大きい、約 92% 若しくはそれより大きい、約 93% 若しくはそれより大きい、約 94% 若しくはそれより大きい、約 95% 若しくはそれより大きい、約 96% 若しくはそれより大きい、約 97% 若しくはそれより大きい、約 98% 若しくはそれより大きい、約 99% 若しくはそれより大きい、又はそれ以上である。特定の実施形態では、CRISPR 反復配列とその対応する tracrRNA 配列との間の相補性の程度は、好適なア

20

30

40

ラインメントアルゴリズムを使用して最適にアラインメントされた場合、50%、60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上である。

【0153】
特定の実施形態では、CRISPR 反復配列は、配列番号 13～24 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列、又はガイド RNA 内に含まれるときに、本明細書に提供される関連する RNA 誘導型ヌクレアーゼの目的の標的配列への配列特異的結合を導くことができるその活性バリエーション若しくは断片を含む。ある特定の実施形態では、野生型配列の活性 CRISPR 反復配列バリエーションは、配列番号 13～24 として示されるヌクレオチド

50

配列のうちのいずれか1つと少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態では、野生型配列の活性CRISPR反復配列断片は、配列番号13~24として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか1つの少なくとも5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、又は22個の連続したヌクレオチドを含む。

【0154】

ある特定の実施形態では、crRNAは、天然に存在しない。これらの実施形態のいくつかでは、特異的CRISPR反復配列は、天然に操作されたスペーサー配列に連結されておらず、CRISPR反復配列は、スペーサー配列に対して異種であるとみなされる。ある特定の実施形態では、スペーサー配列は、天然に存在しない操作された配列である。

【0155】

トランス活性化CRISPR RNA又はtracrRNA分子は、crRNAのCRISPR反復配列にハイブリダイズするのに十分な相補性を有する領域を含むヌクレオチド配列を含み、これは本明細書中では反復防止領域と称される。いくつかの実施形態では、tracrRNA分子は、二次構造（例えば、ステムループ）を有する領域を更に含むか、又はその対応するcrRNAとハイブリダイズすると二次構造を形成する。特定の実施形態では、CRISPR反復配列に完全に又は部分的に相補的なtracrRNAの領域は、分子の5'末端にあり、tracrRNAの3'末端は、二次構造を含む。二次構造のこの領域は、一般に、反復防止配列に隣接して見出されるネクサスヘアピンを含むいくつかのヘアピン構造を含む。ネクサスは、ガイドRNAとRGNとの間の相互作用のコアを形成し、ガイドRNA、RGN、及び標的DNAの間の交点にある。ネクサスヘアピンは、しばしば、ヘアピンステムの塩基に保存されたヌクレオチド配列を有し、モチーフUNANNC（配列番号318）は、tracrRNA中の多くのネクサスヘアピンに見出される。興味深いことに、本発明のRGNのうちのいくつかは、UNANNA、UNANNG、及びCNANNC（それぞれ、配列番号319、321、及び322）を含む、それらのネクサスヘアピンのヘアピンステムの塩基に非正準配列を含むtracrRNAを使用する。多くの場合、構造及び数が異なることができるtracrRNAの3'末端に末端ヘアピンが存在するが、多くの場合、GCリッチRho非依存性転写ターミネーターヘアピンに続いて3'末端にUのストリングを含む。例えば、Briner et al. (2014) Molecular Cell 56:333-339、Briner and Barrangou (2016) Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.top090902、及び米国公開第2017/0275648号（その各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0156】

様々な実施形態では、CRISPR反復配列に完全又は部分的に相補的であるtracrRNAの反復防止領域は、約8個のヌクレオチド~約30個のヌクレオチド、又はそれ以上を含む。例えば、tracrRNA反復防止配列とCRISPR反復配列との間の塩基対形成領域は、約8個、約9個、約10個、約11個、約12個、約13個、約14個、約15個、約16個、約17個、約18個、約19個、約20個、約21個、約22個、約23個、約24個、約25個、約26個、約27個、約28個、約29個、約30個、又はそれ以上のヌクレオチド長であり得る。特定の実施形態では、tracrRNA反復防止配列とCRISPR反復配列との間の塩基対形成領域は、6、7、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個又はそれ以上のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、CRISPR反復配列とその対応するtracrRNA反復防止配列との間の相補性の程度は、好適なアラ

10

20

30

40

50

インメントアルゴリズムを使用して最適にアラインメントされた場合、約 50 % 若しくはそれより大きい、約 60 % 若しくはそれより大きい、約 70 % 若しくはそれより大きい、約 75 % 若しくはそれより大きい、約 80 % 若しくはそれより大きい、約 81 % 若しくはそれより大きい、約 82 % 若しくはそれより大きい、約 83 % 若しくはそれより大きい、約 84 % 若しくはそれより大きい、約 85 % 若しくはそれより大きい、約 86 % 若しくはそれより大きい、約 87 % 若しくはそれより大きい、約 88 % 若しくはそれより大きい、約 89 % 若しくはそれより大きい、約 90 % 若しくはそれより大きい、約 91 % 若しくはそれより大きい、約 92 % 若しくはそれより大きい、約 93 % 若しくはそれより大きい、約 94 % 若しくはそれより大きい、約 95 % 若しくはそれより大きい、約 96 % 若しくはそれより大きい、約 97 % 若しくはそれより大きい、約 98 % 若しくはそれより大きい、約 99 % 若しくはそれより大きい、又はそれ以上である。特定の実施形態では、CRISPR 反復配列とその対応する *tracrRNA* 反復防止配列との間の相補性の程度は、最適なインメントアルゴリズムを使用して最適にアラインメントされた場合、50 %、60 %、70 %、75 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又はそれ以上である。

10

【0157】

様々な実施形態では、全体の *tracrRNA* は、約 60 個のヌクレオチド～約 210 個超のヌクレオチドを含むことができる。例えば、*tracrRNA* は、約 60 個、約 65 個、約 70 個、約 75 個、約 80 個、約 85 個、約 90 個、約 95 個、約 100 個、約 105 個、約 110 個、約 115 個、約 120 個、約 125 個、約 130 個、約 135 個、約 140 個、約 150 個、約 160 個、約 170 個、約 180 個、約 190 個、約 200 個、約 210 個、又はそれ以上のヌクレオチド長であり得る。特定の実施形態では、*tracrRNA* は、60 個、65 個、70 個、75 個、80 個、85 個、90 個、95 個、100 個、105 個、110 個、115 個、120 個、125 個、130 個、135 個、140 個、150 個、160 個、170 個、180 個、190 個、200 個、210 個又はそれ以上のヌクレオチド長である。特定の実施形態では、*tracrRNA* は、約 70 ～約 105 個のヌクレオチド長であり、約 70 個、約 71 個、約 72 個、約 73 個、約 74 個、約 75 個、約 76 個、約 77 個、約 78 個、約 79 個、約 80 個、約 81 個、約 82 個、約 83 個、約 84 個、約 85 個、約 86 個、約 87 個、約 88 個、約 89 個、約 90 個、約 91 個、約 92 個、約 93 個、約 94 個、約 95 個、約 96 個、約 97 個、約 98 個、約 99 個、約 100 個、約 101 個、約 102 個、約 103 個、約 104 個、及び約 105 個のヌクレオチド長を含む。特定の実施形態では、*tracrRNA* は、70 個、71 個、72 個、73 個、74 個、75 個、76 個、77 個、78 個、79 個、80 個、81 個、82 個、83 個、84 個、85 個、86 個、87 個、88 個、89 個、90 個、91 個、92 個、93 個、94 個、95 個、96 個、97 個、98 個、99 個、100 個、101 個、102 個、103 個、104 個、及び 105 個のヌクレオチドを含む 70 個～105 個のヌクレオチド長である。

20

30

【0158】

特定の実施形態では、*tracrRNA* は、配列番号 25 ～36 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列、又はガイド RNA 内に含まれるときに、本明細書に提供される関連する RNA 誘導型ヌクレアーゼの目的の標的配列への配列特異的結合を導くことができるその活性バリエーション若しくは断片を含む。ある特定の実施形態では、野生型配列の活性 *tracrRNA* 反復配列バリエーションは、配列番号 25 ～36 として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つと少なくとも 40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又はそれ以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態では、野生型配列の活性 *tracrRNA* 配列断片は、配列番号 25 ～36 として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つの少なくとも 5 個、10 個、15 個、20 個、25 個、30 個、35 個、40 個、45 個、50 個、5

40

50

5 個、60 個、65 個、70 個、75 個、80 個、又はそれ以上の連続したヌクレオチドを含む。

【0159】

2つのポリヌクレオチド配列は、2つの配列がストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズするとき、実質的に相補的であるとみなすことができる。同様に、RGNに結合したガイドRNAがストリンジェントな条件下で標的配列に結合する場合、RGNは配列特異的に特定の標的配列に結合すると考えられる。「ストリンジェントな条件」又は「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、2つのポリヌクレオチド配列が他の配列よりも検出可能に高い程度（例えば、バックグラウンドの少なくとも2倍）で互いにハイブリダイズする条件を意図している。ストリンジェントな条件は、配列依存的であり、異なる状況において異なるであろう。典型的には、ストリンジェントな条件は、塩濃度が、pH 7.0～8.3で約1.5 M未満のNaイオン、典型的には約0.01～1.0 MのNaイオン濃度（又は他の塩）であり、温度が、短い配列（例えば10～50ヌクレオチド）については少なくとも約30℃及び長い配列（例えば50ヌクレオチド超）については少なくとも約60℃である条件であるだろう。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加で達成され得る。例示的な低ストリンジェンシー条件には、37℃での30～35%のホルムアミド、1 MのNaCl、1%のSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の緩衝液によるハイブリダイゼーション、及び50～55℃での1倍～2倍のSSC（20倍のSSC=3.0 MのNaCl/0.3 Mのクエン酸三ナトリウム）での洗浄が含まれる。例示的な中程度のストリンジェンシー条件としては、37℃での40～45%のホルムアミド、1.0 MのNaCl、1%のSDSでのハイブリダイゼーション、及び55～60℃での0.5倍～1倍のSSCでの洗浄が挙げられる。例示的な高ストリンジェンシー条件には、37℃での50%ホルムアミド、1 MのNaCl、1%のSDSでのハイブリダイゼーション、及び60～65℃での0.1倍のSSCでの洗浄が含まれる。任意選択的に、洗浄緩衝剤は、約0.1%～約1%のSDSを含み得る。ハイブリダイゼーションの継続時間は、概して約24時間未満、通常約4～約12時間である。洗浄時間の期間は、少なくとも平衡に達するのに十分な時間である。

【0160】

T_m は、相補的標的配列の50%が完全にマッチした配列にハイブリダイズする温度（定義されたイオン強度及びpH下）である。DNA-DNAハイブリッドについては、 T_m は、Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284の方程式： $T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\% \text{形態}) - 500 / L$ （式中、Mは、一価カチオンのモル濃度であり、%GCは、DNA中のグアノシン及びシトシンヌクレオチドのパーセンテージであり、%形態は、ハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドのパーセンテージであり、Lは、塩基対中のハイブリッドの長さである）から近似できる。一般に、ストリンジェントな条件は、定義されたイオン強度及びpHで、特定の配列及びその相補鎖の熱融点（ T_m ）よりも約5℃低くなるように選択される。しかしながら、厳密にストリンジェントな条件は、熱融点（ T_m ）よりも1、2、3、又は4℃低いハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を利用することができる。適度にストリンジェントな条件は、熱融点（ T_m ）よりも6、7、8、9、又は10℃低いハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を利用することができる。低ストリンジェンシー条件は、熱融点（ T_m ）よりも11、12、13、14、15、又は20℃低いハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を利用することができる。方程式、ハイブリダイゼーション及び洗浄組成物、並びに所望の T_m を使用して、当業者は、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄液のストリンジェンシーの変動が本質的に記載されることを理解するであろう。核酸のハイブリダイゼーションに関する広範なガイドは、Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York)、及びAusub

el et al., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York) に見出される。Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York) を参照されたい。

【0161】

「配列特異的」という用語はまた、ランダム化されたバックグラウンド配列への結合よりも高い頻度での標的配列の結合を指し得る。

10

【0162】

ガイドRNAは、シングルガイドRNA (sgRNA) 又はデュアルガイドRNA系であり得る。シングルガイドRNAは、RNAの単一の分子上にcrRNA及びtracrRNAを含み、デュアルガイドRNA系は、crRNAのCRISPR反復配列の少なくとも一部分及びcrRNAのCRISPR反復配列に完全又は部分的に相補的であり得るtracrRNAの少なくとも一部分を介して互いにハイブリダイズされた、2つの異なるRNA分子上に存在するcrRNA及びtracrRNAを含む。ガイドRNAが、シングルガイドRNAである実施形態のうちのいくつかにおいて、crRNA及びtracrRNAは、リンカーヌクレオチド配列によって分離される。一般に、リンカーヌクレオチド配列は、リンカーヌクレオチド配列のヌクレオチド内又はリンカーヌクレオチド配列のヌクレオチドを含む二次構造の形成を回避するために、相補塩基を含まない配列である。いくつかの実施形態では、crRNAとtracrRNAとの間のリンカーヌクレオチド配列は、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、又はそれ以上のヌクレオチド長である。特定の実施形態では、シングルガイドRNAのリンカーヌクレオチド配列は、少なくとも4個のヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、リンカーヌクレオチド配列は、配列番号323として示されるヌクレオチド配列である。

20

【0163】

シングルガイドRNA又はデュアルガイドRNAは、化学的に、又はインビトロ転写を介して合成することができる。RGNとガイドRNAとの間の配列特異的結合を決定するためのアッセイは、当該技術分野で既知であり、発現されたRGNとガイドRNAとの間のインビトロ結合アッセイが挙げられるが、これらに限定されず、これは、検出可能な標識（例えば、ビオチン）でタグ付けされ、ガイドRNA：RGN複合体が検出可能な標識（例えば、ストレプトアビジンビーズ）を介して捕捉されるプルダウン検出アッセイで使用され得る。ガイドRNAに無関係の配列又は構造を有する対照ガイドRNAを、RGNのRNAへの非特異的結合のための陰性対照として使用することができる。ある特定の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号37～48のうちのいずれか1つであり、スペーサー配列は、任意の配列であり得、ポリN配列として示される。

30

【0164】

ある特定の実施形態では、ガイドRNAは、RNA分子として、標的細胞、小器官、又は胚に導入され得る。ガイドRNAは、インビトロで転写され得るか、又は化学的に合成され得る。他の実施形態では、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、細胞、小器官、又は胚に導入される。これらの実施形態のいくつかでは、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、プロモーター（例えば、RNAポリメラーゼIIIプロモーター）に作動可能に連結されている。プロモーターは、天然プロモーター又はガイドRNAコードヌクレオチド配列に対して異種であり得る。

40

【0165】

様々な実施形態では、ガイドRNAは、本明細書に記載されるように、リボ核タンパク質複合体として標的細胞、小器官、又は胚に導入することができ、ガイドRNAは、RN

50

A誘導型ヌクレアーゼポリペプチドに結合する。

【0166】

ガイドRNAは、ガイドRNAの標的ヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーションを通じて、関連するRNA誘導型ヌクレアーゼを目的の特定の標的ヌクレオチド配列に導く。標的ヌクレオチド配列は、DNA、RNA、又はその両方の組み合わせを含み得、一本鎖又は二本鎖であり得る。標的ヌクレオチド配列は、ゲノムDNA（すなわち、染色体DNA）、プラスミドDNA、又はRNA分子（例えば、メッセンジャーRNA、リボソームRNA、トランスファーRNA、マイクロRNA、低分子干渉RNA）であり得る。標的ヌクレオチド配列は、インビトロ又は細胞内で、RNA誘導型ヌクレアーゼによって結合することができる（いくつかの実施形態では、切断することができる）。RGNによって標的化される染色体配列は、核、プラスチド又はミトコンドリア染色体配列であり得る。いくつかの実施形態では、標的ヌクレオチド配列は、標的ゲノムにおいて一意である。

10

【0167】

標的ヌクレオチド配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）に隣接している。プロトスペーサーに隣接するモチーフは、一般に、標的ヌクレオチド配列から約1～約10個のヌクレオチド以内であり、標的ヌクレオチド配列から約1個、約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、又は約10個のヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、PAMは、標的ヌクレオチド配列から1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、又は10個のヌクレオチドを含む、標的ヌクレオチド配列から1～10個のヌクレオチド以内である。本明細書に別段の記載がない場合、本開示のRGNについての所与のPAM配列は、標的ヌクレオチド配列に直ちに隣接している。PAMは、標的配列の5'又は3'であり得る。いくつかの実施形態では、PAMは、本開示のRGNについての標的配列の3'である。一般に、PAMは、約3～4個のヌクレオチドのコンセンサス配列であるが、特定の実施形態では、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、又はそれ以上のヌクレオチド長であり得る。様々な実施形態では、本開示のRGNによって認識されるPAM配列は、配列番号73～84のうちのいずれか1つに示されるコンセンサス配列を含む。

20

【0168】

特定の実施形態では、配列番号1～12のうちのいずれか1つを有するRNA誘導型ヌクレアーゼ、又はその活性バリエーション若しくは断片は、配列番号73～84のうちのいずれか1つとして示されるPAM配列に隣接する標的ヌクレオチド配列に結合する。いくつかの実施形態では、RGNは、それぞれ配列番号13～24のうちのいずれか1つに示されるCRISPR反復配列、又はその活性バリエーション若しくは断片、及びそれぞれ配列番号25～36のうちのいずれか1つに示されるtracrRNA配列、又はその活性バリエーション若しくは断片を含むガイド配列に結合する。RGN系は、本明細書の実施例1～3、及び表1及び2に更に記載される。

30

【0169】

いくつかの実施形態では、配列番号1を有するRNA誘導型ヌクレアーゼ又はその活性バリエーション若しくは断片は、配列番号13として示されるCRISPR反復配列又はその活性バリエーション若しくは断片と、配列番号25として示されるtracrRNA配列又はその活性バリエーション若しくは断片と、を含むガイドRNAに結合したときに、配列番号73として示されるPAM配列に隣接する標的ヌクレオチド配列に結合する。

40

【0170】

いくつかの実施形態では、配列番号2を有するRNA誘導型ヌクレアーゼ又はその活性バリエーション若しくは断片は、配列番号14として示されるCRISPR反復配列又はその活性バリエーション若しくは断片と、配列番号26として示されるtracrRNA配列又はその活性バリエーション若しくは断片と、を含むガイドRNAに結合したときに、配列番号74として示されるPAM配列に隣接する標的ヌクレオチド配列に結合する。

【0171】

いくつかの実施形態では、配列番号3を有するRNA誘導型ヌクレアーゼ又はその活性

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

いくつかの実施形態では、配列番号 11 を有する RNA 誘導型ヌクレアーゼ又はその活性バリエーション若しくは断片は、配列番号 23 として示される CRISPR 反復配列又はその活性バリエーション若しくは断片と、配列番号 35 として示される t r a c r RNA 配列又

はその活性バリエーション若しくは断片と、を含むガイドRNAに結合したときに、配列番号83として示されるPAM配列に隣接する標的ヌクレオチド配列に結合する。

【0180】

いくつかの実施形態では、配列番号12を有するRNA誘導型ヌクレアーゼ又はその活性バリエーション若しくは断片は、配列番号24として示されるCRISPR反復配列又はその活性バリエーション若しくは断片と、配列番号36として示されるtracrRNA配列又はその活性バリエーション若しくは断片と、を含むガイドRNAに結合したときに、配列番号84として示されるPAM配列に隣接する標的ヌクレオチド配列に結合する。

【0181】

所与のヌクレアーゼ酵素に対するPAM配列特異性が、RGNを発現するために使用されるプロモーター、又は細胞、小器官、若しくは胚に送達されるリボ核タンパク質複合体の量を変更することによって修飾され得る酵素濃度によって影響されることは、当該技術分野において周知である（例えば、Karvelis et al. (2015) Genome Biol 16:253を参照されたい）。

【0182】

対応するPAM配列を認識すると、RGNは、特定の切断部位で標的ヌクレオチド配列を切断することができる。本明細書で使用される場合、切断部位は、ヌクレオチド配列がRGNによって切断される標的ヌクレオチド配列内の2つの特定のヌクレオチドからなる。切断部位は、5'方向又は3'方向のいずれかで、PAMから1番目及び2番目、2番目及び3番目、3番目及び4番目、4番目及び5番目、5番目及び6番目、7番目及び8番目、又は8番目及び9番目のヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、切断部位は、5'方向又は3'方向のいずれかで、PAMから10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、又は20個を超えるヌクレオチドであってもよい。いくつかの実施形態では、特に、RGNが配列番号6として示されるアミノ酸配列又はその活性バリエーション若しくは断片を有する実施形態では、RGNの切断部位は、PAMの3番目と4番目のヌクレオチド5'の間にあり、平滑末端を生成する。RGNは標的ヌクレオチド配列を切断して、交錯末端をもたらすため、いくつかの実施形態では、切断部位は、ポリヌクレオチドの正の(+)鎖上のPAMからの2つのヌクレオチドの距離及びポリヌクレオチドの負の(-)鎖上のPAMからの2つのヌクレオチドの距離に基づいて定義される。

【0183】

IV. RNA誘導型ヌクレアーゼ、CRISPR RNA、及び／又はtracrRNAをコードするヌクレオチド

本開示は、本開示のCRISPR RNA、tracrRNA、及び／又はsgRNAを含むポリヌクレオチド、並びに本開示のRNA誘導型ヌクレアーゼ、CRISPR RNA、tracrRNA、及び／又はsgRNAをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本開示のポリヌクレオチドには、配列番号13~24として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか1つを含むCRISPR反復配列、又はガイドRNA内に含まれるときに、関連するRNA誘導型ヌクレアーゼの目的の標的配列への配列特異的結合を導くことができるその活性バリエーション若しくは断片を含むか又はコードするポリヌクレオチドが含まれる。また、配列番号25~36として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか1つを含むtracrRNA、又はガイドRNA内に含まれるときに、関連するRNA誘導型ヌクレアーゼの目的の標的配列への配列特異的結合を導くことができるその活性バリエーション若しくは断片を含むか又はコードするポリヌクレオチドも開示される。また、配列番号1~12として示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含むRNA誘導型ヌクレアーゼと、RNA誘導型配列特異的に標的ヌクレオチド配列に結合する能力を保持するその活性断片又はバリエーションとをコードするポリヌクレオチドも提供される。

【0184】

「ポリヌクレオチド」又は「核酸分子」という用語の使用は、本開示を、DNAを含む

ポリヌクレオチドに限定することを意図するものではない。当業者であれば、ポリヌクレオチドが、リボヌクレオチド（RNA）並びにリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドの組み合わせを含むことができることを認識するであろう。かかるデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドは、天然に存在する分子及び合成類似体の両方を含む。これらには、ペプチド核酸（PNA）、PNA-DNAキメラ、ロック核酸（LNA）、及びホスホチオレート結合配列が含まれる。本明細書に開示のポリヌクレオチドはまた、一本鎖形態、二本鎖形態、DNA-RNAハイブリッド、三重構造、ステム及びループ構造などを含むが、これらに限定されない配列の全ての形態を包含する。

【0185】

いくつかの実施形態では、本開示のRGNをコードするポリヌクレオチドは、mRNA（メッセンジャーRNA）分子である。mRNAは、目的のポリペプチドをコードする任意のポリヌクレオチドを指し、目的のコードされたポリペプチドを、インビトロ、インビボ、インサイチュ、又はエクスビボで産生するように翻訳することが可能である。実施形態では、mRNA分子の基本成分は、少なくともコード領域、5'UTR、3'UTR、5'キャップ、及びポリAテールを含む。実施形態では、本開示の方法及び組成物に有用なRGNをコードするmRNAは、ポリヌクレオチドに有用な特性を付与する1つ以上の構造的及び／又は化学的修飾又は変化を含み得る。例えば、mRNAの有用な特性は、mRNAが導入される細胞の自然免疫応答の実質的な誘導の欠如を含む。「構造的」特徴又は修飾とは、2つ以上の連結されたヌクレオチドが、ヌクレオチド自体に著しい化学的修飾を行うことなく、mRNAに挿入、欠失、複製、反転、又はランダム化されるものである。化学結合は必然的に破壊され、構造的修飾をもたらすように再構成されるため、構造的修飾は化学的性質を有し、したがって化学的修飾である。しかしながら、構造的修飾は、ヌクレオチドの異なる配列をもたらすであろう。mRNAの化学修飾は、5-メチルシトシン、N1-メチルシュードウリジン、シュードウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メトキシウリジン、2'フルオログアノシン、2'フルオロウリジン、5-ブロモリジン、5-（2-カルボメトキシビニル）ウリジン、5-[3（1-E-プロペニルアミノ）]ウリジン、 α -チオシチジン、N6-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、又はそれらの組み合わせをmRNAに含むことができる。

【0186】

RGNをコードする核酸分子は、目的の生物での発現のためにコドン最適化され得る。「コドン最適化」コード配列は、特定の宿主細胞の好ましいコドン使用又は転写条件の頻度を模倣するように設計されたコドン使用の頻度を有するポリヌクレオチドコード配列である。特定の宿主細胞又は生物における発現は、翻訳されたアミノ酸配列が変化しないように、核酸レベルでの1つ以上のコドンの変化の結果として増強される。核酸分子は、全体的に又は部分的に、コドン最適化され得る。広範囲の生物についての優先情報を提供するコドン表及び他の参照文献は、当該技術分野において利用可能である（例えば、植物優先のコドン使用に関する検討については、Campbell and Gowri（1990）Plant Physiol. 92:1-11を参照されたい）。植物優先遺伝子又は哺乳動物（例えば、ヒト）コドン最適化コード配列を合成するための方法は、当該技術分野で利用可能である。例えば、米国特許第5,380,831号、及び同第5,436,391号、並びにMurray et al.（1989）Nucleic Acids Res. 17:477-498（参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0187】

本明細書に提供されるRGN、crRNA、tracrRNA、及び／又はsgRNAをコードするポリヌクレオチドは、インビトロ発現又は目的の細胞、小器官、胚、又は生物における発現のための発現カセット中に提供することができる。カセットは、ポリヌクレオチドの発現を可能にする、本明細書に提供されるRGN、crRNA、tracrRNA、及び／又はsgRNAをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された5'

及び3'調節配列を含む。カセットは、生物に共形質転換される少なくとも1つの追加の遺伝子又は遺伝子要素を更に含み得る。追加の遺伝子又は要素が含まれる場合、成分は作動可能に連結される。「作動可能に連結された」という用語は、2つ以上の要素間の機能的連結を意味することを意図している。例えば、プロモーターと目的のコード領域（例えば、RGN、crRNA、tracrRNA、及び／又はsgRNAをコードする領域）との間の作動可能な連結は、目的のコード領域の発現を可能にする機能的連結である。作動可能に連結された要素は、連続していても又は連続していなくてもよい。2つのタンパク質コード領域の結合を指すために使用される場合、作動可能に連結されることにより、コード領域が同じリーディングフレーム内にあることが意図される。代替的に、追加の遺伝子（複数可）又は要素（複数可）が、複数の発現カセット上に提供され得る。例えば、本開示のRGNをコードするヌクレオチド配列は、1つの発現カセット上に存在することができ、一方、crRNA、tracrRNA、又は完全ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、別個の発現カセット上に存在することができる。そのような発現カセットには、ポリヌクレオチドを、調節領域の転写調節下となるように挿入するための複数の制限部位及び／又は組換え部位が提供される。発現カセットは、更に、選択可能なマーカー遺伝子を含み得る。

10

【0188】

発現カセットは、転写の5'－3'方向に、転写（及び、いくつかの実施形態では、翻訳）開始領域（すなわち、プロモーター）、本発明のRGN－、crRNA－、tracrRNA－及び／又はsgRNA－をコードするポリヌクレオチド、並びに目的の生物中で機能的な転写（及び、いくつかの実施形態では、翻訳）終結領域（すなわち、終結領域）を含む。本発明のプロモーターは、宿主細胞におけるコード配列の発現を導くか、又は駆動することができる。調節領域（例えばプロモーター、転写調節領域及び翻訳終結領域）は、宿主細胞に対して又は互いに内因性であっても異種であってもよい。本明細書で 사용되는場合、配列に関して「異種」とは、外来種が起源である配列、又は同じ種に由来する場合、意図的な人為的介入によって組成及び／若しくはゲノム遺伝子座がその天然の形態から実質的に改変されている配列を指す。本明細書で 사용되는場合、キメラ遺伝子は、コード配列に対して異種である転写開始領域に作動可能に連結されたコード配列を含む。

20

【0189】

便利な終結領域は、*A. tumefaciens*のTiプラスミド、例えば、オクトピンシンターゼ及びノパリンシンターゼ終結領域から入手可能である。また、Guerin et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144、Proudfoot (1991) Cell 64:671-674、Sanfaco et al. (1991) Genes Dev. 5:141-149、Mogen et al. (1990) Plant Cell 2:1261-1272、Munroe et al. (1990) Gene 91:151-158、Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903、及びJoshi et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:9627-9639も参照されたい。

30

【0190】

追加の調節シグナルとしては、限定されないが、転写開始開始部位、オペレータ、活性化因子、エンハンサー、他の調節エレメント、リボソーム結合部位、開始コドン、終了シグナルなどが挙げられる。例えば、米国特許第5,039,523号及び同第4,853,331号、EPO 0480762A2、Sambrook et al. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Maniatis et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)、以下「Sambrook 11」、Davis et al., eds. (1980) Advanced Bacterial Genetics (Cold Spring Ha

40

50

rbor Laboratory Press), Cold Spring Harbor, N. Y.、並びにそこに引用された参考文献を参照されたい。

【0191】

発現カセットの調製において、適切な配向で、及び必要に応じて適切なリーディングフレームでDNA配列を提供するために、様々なDNA断片が操作されてもよい。この目的で、アダプター若しくはリンカーがDNA断片を接合するために採用されてもよく、又は好都合な制限部位、不必要なDNAの除去、制限部位の除去などを提供するために、他の操作が関与してもよい。この目的のために、インビトロ変異導入、プライマー修復、制限、アニーリング、再置換（例えば転移及び塩基転換）が関与してもよい。

【0192】

多くのプロモーターが、本発明の実施に使用され得る。プロモーターは、所望の結果に基づき選択され得る。核酸は、目的の生物における発現のために、構成的、誘導的、成長段階特異的、細胞型特異的、組織優先、組織特異的、又は他のプロモーターと組み合わせることができる。例えば、WO99/43838、並びに米国特許第8,575,425号、同第7,790,846号、同第8,147,856号、同第8,586,832号、同第7,772,369号、同第7,534,939号、同第6,072,050号、同第5,659,026号、同第5,608,149号、同第5,608,144号、同第5,604,121号、同第5,569,597号、同第5,466,785号、同第5,399,680号、同第5,268,463号、同第5,608,142号、及び同第6,177,611号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるプロモーターを参照されたい。

【0193】

植物における発現に関して、構成的プロモーターとしては、CaMV 35Sプロモーター (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812)、コメアクチン (McElroy et al. (1990) Plant Cell 2:163-171)、ユビキチン (Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:619-632及びChristensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689)、pEMU (Last et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81:581-588)、並びにMAS (Velten et al. (1984) EMBO J. 3:2723-2730) が挙げられる。

【0194】

誘導性プロモーターの例は、低酸素又は低温ストレスによって誘導可能なAdh1プロモーター、熱ストレスによって誘導可能なHsp70プロモーター、光によって誘導可能なPPDKプロモーター及びペプカルボキシラーゼプロモーターである。また、有用なのは、化学的に誘導可能なプロモーター、例えば、セーフナー誘導されるIn2-2プロモーター（米国特許第5,364,780号）、オキシシン誘導され、タバタム特異的であるが、カルスにおいても活性であるAxig1プロモーター (PCT US01/22169)、ステロイド応答性プロモーター（例えば、エストロゲン誘導されるEREプロモーター、並びにSchena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10421-10425及びMcNeillis et al. (1998) Plant J. 14(2):247-257のグルココルチコイド誘導性プロモーターを参照されたい）、並びにテトラサイクリン誘導性及びテトラサイクリン抑制性プロモーター（例えば、Gatz et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 227:229-237、及び米国特許第5,814,618号及び同第5,789,156号を参照されたい）（参照により本明細書に組み込まれる）である。

【0195】

組織特異的又は組織優先プロモーターを利用して、特定の組織内の発現構築物の発現を標的化することができる。ある特定の実施形態では、組織特異的又は組織優先プロモーターは、植物組織中で活性である。植物における発達制御下にあるプロモーターの例として

は、葉、根、果実、種子、又は花などのある特定の組織における転写を優先的に開始するプロモーターが挙げられる。「組織特異的」プロモーターは、特定の組織においてのみ転写を開始するプロモーターである。遺伝子の構成的発現とは異なり、組織特異的発現は、いくつかの相互作用するレベルの遺伝子調節の結果である。そのため、相同又は密接に関連する植物種からのプロモーターは、特定の組織における導入遺伝子の効率的かつ信頼性の高い発現を達成するために使用することが好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、発現は、組織優先プロモーターを含む。「組織優先」プロモーターは、ある特定の組織において、転写を優先的に開始するが、必ずしも完全に又は単独では開始しないプロモーターである。

【0196】

いくつかの実施形態では、RGN、crRNA、及び／又はtracrRNAをコードする核酸分子は、細胞型特異的プロモーターを含む。「細胞型特異的」プロモーターは、主に、1つ以上の臓器における特定の細胞型における発現を駆動するプロモーターである。植物において機能する細胞型特異的プロモーターが主に活性であり得る植物細胞のいくつかの例には、例えば、BETL細胞、根の血管細胞、葉、莖細胞、及び幹細胞が含まれる。核酸分子はまた、細胞型優先プロモーターを含んでもよい。「細胞型優先」プロモーターは、1つ以上の臓器における特定の細胞型において、主として、発現を主に駆動するが、必ずしも完全に又は単独では駆動しないプロモーターである。植物において機能する細胞型優先プロモーターが優先的に活性であり得る植物細胞のいくつかの例には、例えば、BETL細胞、根の血管細胞、葉、莖細胞、及び幹細胞が含まれる。

【0197】

RGN、crRNA、tracrRNA、及び／又はsgRNAをコードする核酸配列は、例えば、インビトロmRNA合成のために、ファージRNAポリメラーゼによって認識されるプロモーター配列に作動可能に連結され得る。そのような実施形態では、本明細書に記載の方法で使用するために、インビトロ転写RNAを精製することができる。例えば、プロモーター配列は、T7、T3、又はSP6プロモーター配列、又はT7、T3、又はSP6プロモーター配列のバリエーションであり得る。かかる実施形態では、発現されたタンパク質及び／又はRNAは、本明細書に記載のゲノム修飾の方法における使用のために精製することができる。

【0198】

ある特定の実施形態では、RGN、crRNA、tracrRNA、及び／又はsgRNAをコードするポリヌクレオチドはまた、ポリアデニル化シグナル（例えば、SV40ポリAシグナル及び植物で機能する他のシグナル）及び／又は少なくとも1つの転写終結配列に連結することができる。更に、RGNをコードする配列はまた、本明細書の他の場所に記載されるように、少なくとも1つの核局在化シグナル、少なくとも1つの細胞透過性ドメイン、及び／又はタンパク質を特定の細胞下位置に輸送することができる少なくとも1つのシグナルペプチドをコードする配列（複数可）に連結することができる。

【0199】

RGN、crRNA、tracrRNA、及び／又はsgRNAをコードするポリヌクレオチドは、ベクター又は複数のベクター中に存在し得る。「ベクター」は、核酸を宿主細胞に移送、送達、又は導入するためのポリヌクレオチド組成物を指す。好適なベクターとしては、プラスミドベクター、ファージミド、コスミド、人工／ミニ染色体、トランスポゾン、及びウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター）が挙げられる。ベクターは、追加の発現制御配列（例えば、エンハンサー配列、コザック配列、ポリアデニル化配列、転写終結配列）、選択可能なマーカー配列（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、複製起点などを含むことができる。追加情報は、“Current Protocols in Molecular Biology” Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York, 2003又は“Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook & Russell, Cold Spring H

10

20

30

40

50

arbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 3rd edition, 2001に見出すことができる。

【0200】

ベクターは、形質転換された細胞を選択するための選択可能なマーカーを含んでもよい。選択可能なマーカー遺伝子は、形質転換された細胞又は組織の選択に利用される。マーカー遺伝子には、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼⅠⅠ（NEO）及びヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（HPT）をコードするものなどの抗生物質耐性をコードする遺伝子、並びにグルフォシネートアンモニウム、プロモキシニル、イミダゾリノン、及び2，4-ジクロロフェノキシアセテート（2，4-D）などの除草化合物に耐性を付与する遺伝子が含まれる。

10

【0201】

いくつかの実施形態では、RGNポリペプチドをコードする配列を含む発現カセット又はベクターは、crRNA及び／又はtracrRNAをコードする配列、又はcrRNA及びtracrRNAを組み合わせてsgRNAを作製する配列を更に含むことができる。crRNA及び／又はtracrRNAをコードする配列（複数可）は、目的の生物又は宿主細胞におけるcrRNA及び／又はtracrRNAの発現のための少なくとも1つの転写制御配列に作動可能に連結され得る。例えば、crRNA及び／又はtracrRNAをコードするポリヌクレオチドは、RNAポリメラーゼⅠⅠⅠ（PolⅠⅠⅠ）によって認識されるプロモーター配列に作動可能に連結され得る。好適なPolⅠⅠⅠプロモーターの例としては、限定されないが、哺乳動物U6、U3、H1及び7SL RNAプロモーター並びにコメU6及びU3プロモーター、例えば、配列番号329として示されるヒトU6プロモーター、並びに2021年6月11日出願された米国仮出願第63／209，660号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるプロモーター（配列番号449～458として本明細書に示されるものを含む）が挙げられる。

20

【0202】

示されるように、RGN、crRNA、tracrRNA、及び／又はsgRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現構築物を使用して、目的の生物を形質転換することができる。形質転換のための方法は、目的の生物にヌクレオチド構築物を導入することに伴う。「導入すること」は、構築物が宿主細胞の内部にアクセスできるように、ヌクレオチド構築物を宿主細胞に導入することを意図している。本発明の方法は、ヌクレオチド構築物が宿主生物の少なくとも1つの細胞の内部に接近する限り、ヌクレオチド構築物を宿主生物に導入するための特定の方法を必要としない。宿主細胞は、真核細胞又は原核細胞であり得る。特定の実施形態では、真核宿主細胞は、植物細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、又は昆虫細胞である。いくつかの実施形態では、本開示のRGNを含むか、又は発現するか、又は本開示のRGNによって修飾された真核生物細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、本開示のRGNを含むか若しくは発現するか、又は本開示のRGNによって修飾されている真核細胞は、造血起源の細胞、例えば、限定されないが、B細胞、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、キメラ抗原受容体T（CAR-T）細胞、単球、マクロファージ、及び樹状細胞を含む免疫細胞（すなわち、自然免疫系又は適応免疫系の細胞）などである。いくつかの実施形態では、本開示のRGNを含むか若しくは発現するか、又は本開示のRGNによって修飾されている真核細胞は、眼細胞、筋細胞（例えば、骨格筋細胞）、上皮細胞（例えば、肺上皮細胞）、疾患細胞（例えば、腫瘍細胞）である。

30

40

【0203】

ヌクレオチド構築物を植物及び他の宿主細胞に導入するための方法は、当該技術分野において既知であり、安定な形質転換方法、一過性形質転換方法、及びウイルス媒介方法を含むが、これらに限定されない。

【0204】

この方法は、全植物を含む植物、並びに植物器官（例えば、葉、茎、根など）、種子、

50

植物細胞、繁殖、胚、及びそれらの子孫などの形質転換された生物をもたらす。植物細胞は、分化又は未分化（例えば、絨毛、浮遊培養細胞、原形質、葉細胞、根細胞、褐色細胞、花粉）であり得る。

【0205】

「トランスジェニック生物」又は「形質転換された生物」又は「安定的に形質転換された」生物又は細胞又は組織は、本発明の RGN、crRNA、及び／又は tracrRNA をコードするポリヌクレオチドを組み込むか、又は組み込んだ生物を指す。他の外因性又は内因性の核酸配列又は DNA 断片もまた、宿主細胞に組み込まれ得ることが認識されている。アグロバクテリウム及び遺伝子銃媒介の形質転換は、依然として、植物細胞の形質転換のために主に用いられる 2 つのアプローチである。しかしながら、宿主細胞の形質転換は、感染、トランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、マイクロプロジェクション、遺伝子銃又は粒子衝突、エレクトロポレーション、シリカ／炭素繊維、超音波媒介、PEG 媒介、リン酸カルシウム共沈殿、ポリカチオン DMSO 技術、DEAE デキストラン手順、並びにウイルス媒介、リポソーム媒介などによって実行され得る。RGN、crRNA、及び／又は tracrRNA をコードするポリヌクレオチドのウイルス媒介導入は、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス媒介の導入及び発現、並びにカリモウイルス、ジェミニウイルス、及び RNA 植物ウイルスの使用を含む。

10

【0206】

形質転換プロトコル、及び植物にポリペプチド又はポリヌクレオチド配列を導入するためのプロトコルは、形質転換の標的となる宿主細胞（例えば、単子葉植物又は双子葉植物細胞）の種類に応じて変化し得る。形質転換のための方法は、当該技術分野において既知であり、米国特許第 8,575,425 号、同第 7,692,068 号、同第 8,802,934 号、同第 7,541,517 号（それらの各々が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものを含む。また、Rakoczy-Trojanowska, M. (2002) Cell Mol Biol Lett. 7:849-858、Jones et al. (2005) Plant Methods 1:5、Rivera et al. (2012) Physics of Life Reviews 9:308-345、Bartlett et al. (2008) Plant Methods 4:1-12、Bates, G. W. (1999) Methods in Molecular Biology 111:359-366、Binns and Thomas (1988) Annual Reviews in Microbiology 42:575-606、Christou, P. (1992) The Plant Journal 2:275-281、Christou, P. (1995) Euphytica 85:13-27、Tzfira et al. (2004) TRENDS in Genetics 20:375-383、Yao et al. (2006) Journal of Experimental Botany 57:3737-3746、Zupan and Zambryski (1995) Plant Physiology 107:1041-1047、Jones et al. (2005) Plant Methods 1:5、も参照されたい。

20

30

40

【0207】

形質転換は、核酸の細胞への安定した又は一過性の組み込みをもたらし得る。「安定な形質転換」は、宿主細胞に導入されたヌクレオチド構築物が宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その子孫によって遺伝することができることを意味することが意図される。「一過性形質転換」は、ポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されても、宿主細胞のゲノムに組み込まれないことを意味することを意図している。

【0208】

葉緑体の形質転換のための方法は、当該技術分野で既知である。例えば、Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530、Svab and Maliga (1993) Proc. Natl. Ac

50

ad. Sci. USA 90:913-917、Svab and Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606を参照されたい。方法は、選択可能なマーカーを含有するDNAの粒子ガン送達と、相同組換えによるプラスチドゲノムへのDNAの標的化に依存する。更に、プラスチド形質転換は、核コード及びプラスチド指向性RNAポリメラーゼの組織優先発現によって、サイレントプラスチド由来導入遺伝子のトランス活性化によって達成され得る。そのような系は、McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305に報告されている。

【0209】

形質転換された細胞は、従来の方法に従って、植物などのトランスジェニック生物に成長され得る。例えば、McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84を参照されたい。次に、これらの植物を成長させ、同じ形質転換株又は異なる株のいずれかで受粉させ、得られたハイブリッドは、特定された所望の表現型特性の構成的発現を有し得る。所望の表現型特性の発現が安定して維持及び遺伝されることを確実にするために2世代以上を増殖させてもよく、次いで、所望の表現型特性の発現が達成されることを確実にするために種子を収穫してもよい。このようにして、本発明は、本発明のヌクレオチド構築物、例えば、それらのゲノムに安定して組み込まれた本発明の発現カセットを有する形質転換種子（「トランスジェニック種子」とも称される）を提供する。

【0210】

代替的に、形質転換された細胞は、生物に導入され得る。これらの細胞は、生物に由来している可能性があり、細胞は、エキスピボアプローチで形質転換される。

【0211】

本明細書で提供する配列は、単子葉植物又は双子葉植物を含むがこれらに限定されない、任意の植物種の形質転換のために使用され得る。目的の植物の例としては、限定されないが、コーン（トウモロコシ）、ソルガム、小麦、ヒマワリ、トマト、十字花科植物、コショウ、ジャガイモ、綿、コメ、大豆、テンサイ、サトウキビ、タバコ、大麦及びアブラナ、Brassica sp.、アルファルファ、ライ麦、キビ、サフラワー、ピーナッツ、サツマイモ、キャッサバ、コーヒー、ココナッツ、パイナップル、柑橘類の木、ココア、茶、バナナ、アボカド、イチジク、グアバ、マンゴー、オリーブ、パパイア、カシュー、マカダミア、アーモンド、オート麦、野菜、観賞植物、並びに針葉樹が挙げられる。

【0212】

野菜には、トマト、レタス、サヤインゲン、ライ豆、エンドウ豆、並びにキュウリ、カンタロップ、及びマスキメロンなどのCurcumi s属のメンバーが含まれるが、これらに限定されない。観賞植物には、ツツジ、アジサイ、ハイビスカス、バラ、チューリップ、ラッパズイセン、ペチュニア、カーネーション、ポインセチア、及び菊が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明の植物は、作物植物（例えば、トウモロコシ、ソルガム、小麦、ヒマワリ、トマト、十字花科植物、コショウ、ジャガイモ、綿、コメ、大豆、テンサイ、サトウキビ、タバコ、大麦、アブラナなど）である。

【0213】

本明細書で使用される場合、「植物」という用語には、植物細胞、植物プロトプラスト、植物を再生できる植物細胞組織培養物、植物カルス、植物塊、及び植物又は植物の一部（胚、花粉、胚珠、種子、葉、花、枝、果実、穀粒、穂、穂軸、殻、茎、根、根端、葯など）内で無傷の植物細胞が含まれる。穀物は、種の成長又は再生以外の目的のために商業的な栽培者によって生産される成熟した種子を意味することを意図している。再生された植物の子孫、バリエーション、及び変異体も、これらの部分が導入されたポリヌクレオチドを含むことを条件として、本発明の範囲内に含まれる。例えば、大豆粕を含む、本明細書に開示される配列を保持する加工された植物産物又は副産物が更に提供される。

【0214】

RGN、crRNA、及び／若しくはtracrRNAをコードするか、又はcrRN

10

20

30

40

50

A及び／若しくはtracrRNAを含むポリヌクレオチドを使用して、古細菌及び細菌（例えば、Bacillus sp.、Klebsiella sp. Streptomyces sp.、Rhizobium sp.、Escherichia sp.、Pseudomonas sp.、Salmonella sp.、Shigella sp.、Vibrio sp.、Yersinia sp.、Mycoplasma sp.、Agrobacterium、Lactobacillus sp.）を含むが、これらに限定されない任意の原核生物種を形質転換することもできる。

【0215】

RGN、crRNA、及び／又はtracrRNAをコードするか、又はcrRNA及び／又はtracrRNAを含むポリヌクレオチドを使用して、動物（例えば、哺乳動物、昆虫、魚、鳥、及び爬虫類）、真菌、アメーバ、藻類、及び酵母を含むがこれらに限定されない任意の真核生物種を形質転換することができる。

10

【0216】

従来ウイルス及び非ウイルスベースの遺伝子移入方法を使用して、哺乳動物、昆虫、又は鳥類細胞又は標的組織に核酸を導入することができる。かかる方法を使用して、RGN系の構成要素をコードする核酸を、培養物中の細胞、又は宿主生物中に投与することができる。非ウイルスベクター送達系は、DNAプラスミド、RNA（例えば、本明細書に記載のベクターの転写物）、裸の核酸、及びリポソームなどの送達ビヒクルと複合体化された核酸を含む。ウイルスベクター送達系には、DNA及びRNAウイルスが含まれ、これらは、細胞への送達後にエピソームゲノム又は組み込まれたゲノムのいずれかを有する。遺伝子治療手順の概説については、Anderson, Science 256:808-813 (1992)、Nabel & Feigner, TIBTECH 11:211-217 (1993)、Mitani & Caskey, TIBTECH 11:162-166 (1993)、Dillon, TIBTECH 11:167-175 (1993)、Miller, Nature 357:455-460 (1992)、Van Brunt, Biotechnology 6(10):1149-1154 (1988)、Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995)、Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995)、Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology, Doerfler and Bohm (eds) (1995)、及びYu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994)を参照されたい。

20

30

【0217】

核酸の非ウイルス送達の方法には、リポフェクション、ヌクレオフィクション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ウィロゾーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン又は脂質：核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ビリオン、及びDNAの薬剤強化された取り込みが含まれる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号、及び同第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（例えば、Transfectam（商標）及びLipofectin（商標））。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好適なカチオン性及び中性脂質としては、Feigner、WO91/17424、WO91/16024のものが挙げられる。送達は、細胞（インビトロ若しくはエクスピボ投与）又は標的組織（例えば、インビボ投与）であり得る。免疫脂質複合体などの標的リポソームを含む、脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、Crystal, Science 270:404-410 (1995)、Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995)、Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994)、Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994)、Gao et al., Gene Therapy 2:710-722

40

50

(1995)、Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (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号を参照されたい)。

【0218】

核酸の送達のためのRNA又はDNAウイルスに基づく系の使用は、ウイルスを体内の特定の細胞に標的化し、ウイルスペイロードを核に輸送するための高度に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターは、患者に直接投与され得る(インビボ)か、又は細胞をインビトロで治療するために使用され得、修飾細胞は、任意選択的に患者に投与され得る(エクスビボ)。従来のウイルスベースの系は、遺伝子導入用のレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、及び単純ヘルペスウイルスのベクターを含み得る。宿主ゲノムにおける組み込みは、レトロウイルス、レンチウイルス及びアデノ随伴ウイルス遺伝子移入方法で可能であり、しばしば、挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらす。追加的に、多くの異なる細胞型及び標的組織での高い形質導入効率が観察されている。

【0219】

外来のエンベロープタンパク質を組み込み、標的細胞の潜在的な標的集団を拡大することによって、レトロウイルスのトロピズムを変化させることができる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入又は感染させることが可能なレトロウイルスベクターであり、典型的には、高いウイルス力価を生成する。したがって、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であろう。レトロウイルスベクターは、最大6~10 kbの外來配列のパッケージング能力を有する、シス作用型の長い末端リピートから構成される。最小のシス作用LTRは、ベクターの複製及びパッケージングに十分であり、次いで、療法的遺伝子を標的細胞に統合して永続的な導入遺伝子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としては、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)、及びこれらの組み合わせに基づくものが挙げられる(例えば、Buchscher et al., J. Viral. 66:2731-2739 (1992)、Johann et al., J. Viral. 66:1635-1640 (1992)、Sommnerfelt et al., Viral. 176:58-59 (1990)、Wilson et al., J. Viral. 63:2374-2378 (1989)、Miller et al., J. Viral. 65:2220-2224 (1991)、PCT/US94/05700を参照されたい)。

【0220】

一過的な発現が好ましい用途では、アデノウイルスベースの系を使用してもよい。アデノウイルスに基づくベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要としない。このようなベクターを用いて、高い力価及び発現レベルが得られている。このベクターは、比較的単純な系において大量に生成され得る。アデノ随伴ウイルス(「AAV」)ベクターはまた、例えば、核酸及びペプチドのインビトロ産生において、並びにインビボ及びエクスビボ遺伝子療法手順など、標的核酸を細胞に形質導入するためにも使用されてもよい(例えば、West et al., Virology 160:38-47 (1987)、米国特許第4,797,368号、WO93/24641、Katin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994)、Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994)を参照されたい。組換えAAVベクターの構築は、いくつかの刊行物(米国特許第5,173,414号、Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985)、Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984)、Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984)、及びSamulski

et al., 1. Viral. 63:03822-3828 (1989) など)に記載されている。パッケージング細胞は、典型的には、宿主細胞に感染することが可能な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、アデノウイルスをパッケージングする293細胞、及びレトロウイルスをパッケージングするψJ2細胞又はPA317細胞が含まれる。

【0221】

遺伝子療法に使用され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細胞株を産生することによって生成される。ベクターは、典型的には、パッケージング及びその後の宿主への組み込みに必要な最小限のウイルス配列を含み、他のウイルス配列は、発現されるポリヌクレオチド（複数可）のための発現カセットによって置き換えられる。欠損したウイルス機能は、典型的には、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、遺伝子療法で使用されるAAVベクターは、典型的には、宿主ゲノムへのパッケージング及び組み込みに必要なAAVゲノム由来のITR配列のみを有する。ウイルスDNAは、他のAAV遺伝子、すなわちrep及びcapをコードするが、ITR配列を欠くヘルパープラスミドを含有する細胞株にパッケージングされる。

10

【0222】

細胞株は、ヘルパーとしてアデノウイルスで感染され得る。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製及び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配列を欠くことに起因して、有意な量でパッケージングされない。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よりも感受性が高い熱処理によって低減することができる。核酸を細胞に送達するための追加の方法は、当業者に既知である。例えば、US2003/0087817（参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

20

【0223】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、本明細書に記載される1つ以上のベクターで一過性又は非一過性にトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、細胞は、それが対象において天然に生じるようにトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、トランスフェクトされる細胞は、対象から採取される。いくつかの実施形態では、細胞は、対象、例えば、細胞株から採取される細胞に由来する。いくつかの実施形態では、細胞株は、哺乳動物、昆虫、又は鳥類細胞であってもよい。組織培養のための多種多様な細胞株が、当該技術分野で既知である。細胞株の例としては、C8161、CCRF-CEM、MOLT、mIMCD-3、NHDF、HeLaS3、Huh1、Huh4、Huh7、HUVEC、HASMC、HEKn、HEKa、MiaPaCell、Panel、PC-3、TFL、CTLL-2、CIR、Rat6、CVI、RPTE、ALO、T24、182、A375、ARH-77、Calu1、SW480、SW620、SKOV3、SK-UT、CaCo2、P388DL、SEM-K2、WEHI-231、HB56、TIB55、lurkat、145.01、LRMB、Bcl-1、BC-3、IC21、DLD2、Raw264.7、NRK、NRK-52E、MRC5、MEF、HepG2、HeLa B、HeLa T4が挙げられるが、これらに限定されない。COS、COS-1、COS-6、COS-M6A、BS-C-1サル腎臓上皮、BALB/3T3マウス胚線維芽細胞、3T3 SWISS、3T3-L1、132-d5ヒト胎児線維芽細胞；10.1マウス線維芽細胞、293-T、3T3、721、9L、A2780、A2780ADR、A2780cis、A172、A20、A253、A431、A-549、ALC、B16、B35、BCP-I細胞、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR 293、BxPC3、C3H-10T1/2、C6/36、Cal-27、CHO、CHO-7、CHO-IR、CHO-K1、CHO-K2、CHO-T、CHO Dhfr-/-、COR-L23、COR-L23/CPR、COR-L235010、CORL23/R23、COS-7、COV-434、CML T1、CMT、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、EL4、EM2、EM3、EMT

30

40

50

6 / AR1、EMT6 / AR10.0、FM3、H1299、H69、HB54、HB55、HCA2、HEK-293、HeLa、Hepalclc7、HL-60、HMEC、HT-29、lurkat、LY細胞、K562細胞、Ku812、KCL22、KGL、KYOL、LNCap、Ma-Mel 1-48、MC-38、MCF-7、MCF-l0A、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MDCKII、MDCKII、MOR / 0.2R、MONO-MAC 6、MTD-lA、MyEnd、NCI-H69 / CPR、NCI-H69 / LX10、NCI-H69 / LX20、NCI-H69 / LX4、NIH-3T3、NALM-1、NW-145、OPCN / OPCT細胞株、Peer、PNT-lA / PNT 2、RenCa、RIN-5F、RMA / RMAS、Saos-2細胞、Sf-9、SkBr3、T2、T-47D、T84、THPL細胞株、U373、U87、U937、VCaP、Vero細胞、WM39、WT-49、X63、YAC-1、YAR、及びそのトランスジェニック品種。細胞株は、当業者に既知の様々な供給源から入手可能である（例えば、American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Va.) を参照されたい）。

10

【0224】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の1つ以上のベクターでトランスフェクトされた細胞を使用して、1つ以上のベクター由来配列を含む新しい細胞株を確立する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のRGN系の構成要素で一過性にトランスフェクトされ（例えば、1つ以上のベクターの一過性トランスフェクション、又はRNAでのトランスフェクションによって）、RGN系の活性によって修飾された細胞を使用して、修飾を含有するが、任意の他の外因性配列を欠く細胞を含む新しい細胞株を確立する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される1つ以上のベクターで一過性又は非一過性にトランスフェクトされた細胞、又はそのような細胞に由来する細胞株は、1つ以上の試験化合物を評価する際に使用される。

20

【0225】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の1つ以上のベクターを使用して、非ヒトトランスジェニック動物又はトランスジェニック植物を産生する。いくつかの実施形態では、トランスジェニック動物は、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ウシ、又はブタなどの哺乳動物である。いくつかの実施形態では、トランスジェニック動物は、鳥、例えば、ニワトリ又はアヒルである。いくつかの実施形態では、トランスジェニック動物は、昆虫、例えば、蚊又はダニである。

30

【0226】

V. ポリペプチド及びポリヌクレオチドのバリエーション及び断片

本開示は、配列番号1～12のうちのいずれか1つとして示されるアミノ酸配列を有する、天然に存在する（すなわち、野生型）RNA誘導型ヌクレアーゼの活性バリエーション及び断片、及び配列番号13～24として示される配列のうちのいずれか1つなどの天然に存在するCRISPR反復の活性バリエーション及び断片、及び配列番号25～36として示される配列のうちのいずれか1つなどの天然に存在するtracrRNAの活性バリエーション及び断片、並びにそれらをコードするポリヌクレオチドを提供する。

40

【0227】

バリエーション又は断片の活性は、目的のポリヌクレオチド又はポリペプチドと比較して変化し得るが、変異体及び断片は、目的のポリヌクレオチド又はポリペプチドの機能を保持しなければならない。例えば、バリエーション又は断片は、目的のポリヌクレオチド又はポリペプチドと比較して、活性の増加、活性の減少、活性の異なるスペクトル、又は活性の任意の他の変化を有し得る。

【0228】

本明細書に開示されるものなどの天然に存在するRGNポリペプチドの断片及びバリエーションは、配列特異的なRNA誘導型DNA結合活性を保持する。特定の実施形態では、本明細書に開示されるものなどの天然に存在するRGNポリペプチドの断片及びバリエーション

50

は、ヌクレアーゼ活性（一本鎖又は二本鎖）を保持する。

【0229】

本明細書に開示されるものなどの天然に存在するCRISPR反復の断片及びバリエーションは、ガイドRNAの一部（tracrRNAを含む）であるときに、配列特異的にRNA誘導型ヌクレアーゼ（ガイドRNAと複合体化した）に結合し、RNA誘導型ヌクレアーゼを標的ヌクレオチド配列に導く能力を保持する。

【0230】

本明細書に開示されるものなどの天然に存在するtracrRNAの断片及びバリエーションは、ガイドRNAの一部（CRISPR RNAを含む）であるときに、RNA誘導型ヌクレアーゼ（ガイドRNAと複合体を形成した）を配列特異的に標的ヌクレオチド配列に導く能力を保持する。

【0231】

「断片」という用語は、本発明のポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の一部分を指す。「断片」又は「生物学的に活性な部分」は、生物学的活性を保持するのに十分な数の連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む（すなわち、ガイドRNA内に含まれるとき、RGNに結合し、配列特異的にRGNを標的ヌクレオチド配列に導く）。「断片」又は「生物学的に活性な部分」は、生物学的活性を保持するのに十分な数の連続したアミノ酸残基を含むポリペプチドを含む（すなわち、ガイドRNAと複合体化するとき、配列特異的に標的ヌクレオチド配列に結合する）。RGNタンパク質の断片には、代替の下流開始部位を使用することにより、完全長配列よりも短い断片が含まれる。RGNタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、配列番号1～12のうちのいずれか1つの10個、25個、50個、100個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、450個、500個、550個、600個、650個、700個、750個、800個、850個、900個、950個、1000個、1050個、1100個、1150個、1200個、1250個、1300個、1350個、1400個、1450個、1500個、1550個、1600個、1650個、1700個、又はそれ以上の連続したアミノ酸残基を含むポリペプチドであり得る。そのような生物学的に活性な部分は、組換え技術によって調製することができ、配列特異的なRNA誘導型DNA結合活性について評価することができる。CRISPR反復配列の生物学的に活性な断片は、配列番号13～24のうちのいずれか1つの少なくとも8個の連続アミノ酸を含むことができる。CRISPR反復配列の生物学的に活性な部分は、例えば、配列番号13～24のうちのいずれか1つの8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、又は24個の連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであってもよい。tracrRNAの生物学的に活性な部分は、例えば、配列番号25～36のうちのいずれか1つの8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、又はそれ以上の連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであってもよい。

【0232】

一般に、「バリエーション」は、実質的に類似した配列を意味することを意図している。ポリヌクレオチドに関して、バリエーションは、天然ポリヌクレオチド内の1つ以上の内部部位における1つ以上のヌクレオチドの欠失及び／若しくは追加、並びに／又は天然ポリヌクレオチド内の1つ以上の部位における1つ以上のヌクレオチドの置換を含む。本明細書で使用される場合、「天然」又は「野生型」ポリヌクレオチド又はポリペプチドは、それぞれ、天然に存在するヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を含む。ポリヌクレオチドについて、保存的バリエーションには、遺伝暗号の縮重のために、目的の遺伝子の天然アミノ酸配列をコードする配列が含まれる。これらのような天然に存在する対立遺伝子変異形は、例えば、以下に概説するように、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）及びハイブリダイゼーショ

ン技術を使用して、周知の分子生物学技術を使用して同定することができる。バリエーションポリヌクレオチドはまた、例えば、部位特異的変異誘発を使用して生成されるが、依然として目的のポリペプチド又はポリヌクレオチドをコードするものなど、合成的に誘導されるポリヌクレオチドも含む。一般に、本明細書に開示される特定のポリヌクレオチドのバリエーションは、本明細書の他の箇所に記載される配列アラインメントプログラム及びパラメータによって決定されるように、その特定のポリヌクレオチドと少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を有する。

【0233】

本明細書に開示される特定のポリヌクレオチド（すなわち、参照ポリヌクレオチド）のバリエーションはまた、バリエーションポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドとの間の配列同一性パーセントを比較することによって評価することができる。任意の2つのポリペプチド間の配列同一性パーセントは、本明細書の他の場所に記載される配列アラインメントプログラム及びパラメータを使用して計算することができる。本明細書に開示される任意の所与のポリヌクレオチド対を、それらがコードする2つのポリペプチドによって共有される配列同一性パーセントの比較によって評価する場合、2つのコードされるポリペプチド間の配列同一性パーセントは、少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性である。

【0234】

特定の実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、配列番号1～12として示されるアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むRNA誘導型ヌクレアーゼポリペプチドをコードする。

【0235】

本発明のRGNポリペプチドの生物学的に活性なバリエーションは、わずか約1～15個のアミノ酸残基、わずか約1～10個のアミノ酸残基、例えば、約6～10個のアミノ酸残基、わずか5個のアミノ酸残基、わずか4個のアミノ酸残基、わずか3個のアミノ酸残基、わずか2個のアミノ酸残基、又はわずか1個のアミノ酸残基だけ相違し得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、N末端又はC末端の切断を含むことができ、これは、ポリペプチドのN末端又はC末端のいずれかから少なくとも10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、450個、500個、550個、600個、650個、700個、750個、800個、850個、900個、950個、1000個、1050個、1100個、1150個、1200個、1250個、1300個、1350個、1400個、1450個、1500個、1550個、1600個、1650個、1700個のアミノ酸、又はそれ以上の欠失を含むことができる。

【0236】

ある特定の実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、配列番号13～24として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか1つと少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含むCRISPR反復を含むか、又はコードする。

【0237】

本開示のポリヌクレオチドは、配列番号 25～36 として示されるヌクレオチド配列のうちいずれか 1 つと少なくとも 40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又はそれ以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含む *tracrRNA* を含むか、又はコードすることができる。

【0238】

本発明の *CRISPR* 反復又は *tracrRNA* の生物学的に活性なバリエーションは、わずか約 1～15 個のヌクレオチド、わずか約 1～10 個のヌクレオチド、例えば、約 6～10 個のヌクレオチド、わずか 5 個のヌクレオチド、わずか 4 個のヌクレオチド、わずか 3 個のヌクレオチド、わずか 2 個のヌクレオチド、又はわずか 1 個のヌクレオチドだけ相違し得る。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、5' 又は 3' の切断を含むことができ、これは、ポリヌクレオチドの 5' 末端又は 3' 末端のいずれかから 10 個、15 個、20 個、25 個、30 個、35 個、40 個、45 個、50 個、55 個、60 個、65 個、70 個、75 個、80 個、90 個、95 個、100 個、105 個、110 個のヌクレオチド、又はそれ以上の欠失を含むことができる。

【0239】

修飾は、本明細書に提供される *RGN* ポリペプチド、*CRISPR* 反復、及び *tracrRNA* に対して行われ得、バリエーションタンパク質及びポリヌクレオチドを作製することが認識される。人によって設計された変化は、部位特異的変異誘発技術の適用を通じて導入され得る。代替的に、本明細書に開示される配列に構造的及び／若しくは機能的に関連する天然の、まだ未知の、若しくはまだ未確認のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドも、本発明の範囲内にあることが同定され得る。保存的アミノ酸置換は、*RGN* タンパク質の機能を変更しない非保存領域で行われ得る。代替的に、*RGN* の活性を改善する修飾が行われ得る。

【0240】

バリエーションポリヌクレオチド及びタンパク質はまた、*DNA* シャッフルなどの変異原性及び組換え原性手順に由来する配列及びタンパク質を包含する。そのような手順では、本明細書に開示される 1 つ以上の異なる *RGN* タンパク質（例えば、配列番号 1～12）を操作して、所望の特性を有する新しい *RGN* タンパク質を作製する。このようにして、組換えポリヌクレオチドのライブラリは、実質的な配列同一性を有し、インビトロ又はインビボで相同組換えすることができる配列領域を含む関連配列ポリヌクレオチドの集団から生成される。例えば、このアプローチを使用して、目的のドメインをコードする配列モチーフを、本明細書に提供される *RGN* 配列と他の既知の *RGN* 遺伝子との間でシャッフルして、酵素の場合には増加した K_m などの改善された目的の特性を有するタンパク質をコードする新しい遺伝子を得ることができる。そのような *DNA* シャッフルのための戦略は、当該技術分野において既知である。例えば、Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751、Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391、Cramer *et al.* (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438、Moore *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347、Zhang *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509、Cramer *et al.* (1998) *Nature* 391:288-291、及び米国特許第 5,605,793 号及び同第 5,837,458 号を参照されたい。「シャッフルされた」核酸は、本明細書に記載の任意のシャッフル手順などのシャッフル手順によって産生される核酸である。シャッフルされた核酸は、2 つ以上の核酸（又は文字列）を（物理的に又は事実上）、例えば、人工的、及び任意選択的に再帰的な方法で再結合することによって産生される。一般に、1 つ以上のスクリーニングステップは、目的の核酸を同定するためのシャッフルプロセスで使用され、このスクリーニングステップは、任意の組換えステップの前又は後に実行することができる。いくつかの（全てで

はないが) シャッフル実施形態では、スクリーニングされるプールの多様性を増加させるために、選択の前に複数ラウンドの組換えを実行することが望ましい。組換え及び選択の全体的なプロセスは、任意選択的に再帰的に繰り返される。文脈に応じて、シャッフルは、組換え及び選択の全体的なプロセスを指すことができ、又は、代替的に、全体的なプロセスの組換え部分を単に指すことができる。

【0241】

本明細書で使用される場合、2つのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」又は「同一性」は、特定の比較ウィンドウで最大限に一致するようにアラインメントされたときに同じである2つの配列の残基を参照する。配列同一性のパーセンテージがタンパク質に関して使用される場合、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換（アミノ酸残基が、同様の化学的特性（例えば、電荷又は疎水性）を有し、したがって、分子の機能的特性を変化させない他のアミノ酸残基で置換されている）によってしばしば異なることが認識される。配列が保存的置換で異なる場合、パーセント配列同一性を、置換の保存的性質について補正するために上向きに調整してもよい。そのような保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性」又は「類似性」を有すると言われる。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。典型的には、これは、保存的置換を完全なミスマッチではなく部分的なミスマッチとしてスコアリングして、それによって、配列同一性パーセンテージを増加させることを含む。したがって、例えば、同一のアミノ酸には1のスコアが与えられ、非保存的置換にゼロのスコアが与えられる場合に、保存的置換は、ゼロ～1のスコアが与えられる。保存的置換のスコアリングは、例えば、プログラムPC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California) で実施されるように計算される。

10

20

【0242】

本明細書で使用する場合、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウにわたって2つの最適にアラインメントされた配列を比較することによって決定され、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適なアラインメントのための参照配列（付加又は欠失を含まない）と比較して、付加又は欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。割合は、同一の核酸塩基又はアミノ酸残基が両方の配列で生じる位置の数を判定して、一致した位置の数を、一致した位置の数を、比較の枠内の位置の総数で割り、結果に100を乗じて、配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。

30

【0243】

特に明記しない限り、本明細書に提供される配列同一性／類似性値は、以下のパラメータ：GAP重量50及び長さ重量3、並びにnws gap dna. cmpスコアリング行列を使用するヌクレオチド配列の同一性%及び類似性%；GAP重量8及び長さ重量2、並びにBLOSUM62スコアリング行列を使用するアミノ酸配列の同一性%及び類似性%を使用したGAPバージョン10；又はその任意の同等のプログラムを使用して得られた値を指す。「同等のプログラム」は、問題の任意の2つの配列について、GAPバージョン10によって生成された対応するアラインメントと比較した場合、同一のヌクレオチド又はアミノ酸残基マッチ及び同一の配列同一性パーセントを有するアラインメントを生成する任意の配列比較プログラムを意図する。

40

【0244】

2つの配列は、定義されたアミノ酸置換行列（例えば、BLOSUM62）、ギャップ存在ペナルティ、及びギャップ伸長ペナルティを使用して類似性スコアリングのためにアラインメントされたときに「最適にアラインメント」され、その配列の対について可能な最高スコアに到達する。アミノ酸置換行列及び2つの配列間の類似性を定量化する際のそれらの使用は、当該技術分野で周知であり、例えば、Dayhoff et al. (1978) "A model of evolutionary change in proteins." In "Atlas of Protein Sequence and Structure," Vol. 5, Suppl. 3 (ed. M. O. Dayhoff), pp. 345-352. Natl. Biomed. Res. Found., Washi

50

ngton, D. C.、及びHenikoff et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919に記載されている。BLOSUM62行列は、配列アラインメントプロトコルにおけるデフォルトのスコアリング置換行列として使用されることが多い。ギャップ存在ペナルティは、アラインメントされた配列のうちの1つに単一のアミノ酸ギャップを導入するために課され、ギャップ伸長ペナルティは、既に開いたギャップに挿入された追加の空のアミノ酸位置ごとに課される。アラインメントは、アラインメントが開始及び終了する各配列のアミノ酸位置によって定義され、任意選択的に、可能な限り最高のスコアに到達するように、1つ又は両方の配列に1つのギャップ又は複数のギャップを挿入することによって定義される。最適なアラインメント及びスコアリングは手動で達成することができるが、このプロセスは、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載され、National Center for Biotechnology Information Website (www.ncbi.nlm.nih.gov) で一般に利用可能となった、コンピュータ実装アラインメントアルゴリズム、例えばギャップBLAST 2.0の使用によって促進される。複数のアラインメントを含む最適なアラインメントは、例えば、www.ncbi.nlm.nih.govを通じて入手可能であり、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402によって記載されているPSI-BLASTを使用して調製することができる。

10

20

30

【0245】

参照配列と最適にアラインメントされるアミノ酸配列に関して、アミノ酸残基は、アラインメントにおいて残基が対合される参照配列内の位置に「対応する」。「位置」は、N末端に対するその位置に基づいて、参照配列の各アミノ酸を順次特定する番号によって示される。最適なアラインメントを判定するときに考慮しなければならない欠失、挿入、切断、融合などのために、一般に、N末端から単純に数えることによって判定される試験配列のアミノ酸残基の数は、参照配列のその対応する位置の数と必ずしも同じではない。例えば、アラインメントされた試験配列に欠失がある場合、欠失部位の参照配列における位置に対応するアミノ酸は存在しない。アラインメントされた参照配列に挿入が存在する場合、その挿入は、参照配列の任意のアミノ酸の位置に対応していない。切断又は融合の場合、対応する配列のいずれのアミノ酸にも対応しない参照又はアラインメントされた配列のアミノ酸のストレッチが存在し得る。

【0246】

VI. 抗体

配列番号1~12として示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ又はその活性バリエーション若しくは断片を有するものを含む、本発明のRGNポリペプチドを含むRGNポリペプチド又はリボ核タンパク質に対する抗体もまた、包含される。抗体を産生するための方法は、当該技術分野でよく知られている（例えば、Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.、及び米国特許第4,196,265号を参照されたい）。これらの抗体は、RGNポリペプチド又はリボ核タンパク質の検出及び単離のためのキットに使用することができる。したがって、本開示は、例えば、配列番号1~12として示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを有するポリペプチドを含む、本明細書に記載のポリペプチド又はリボ核タンパク質に特異的に結合する抗体を含む、キットを提供する。

40

【0247】

VII. 目的の標的配列に結合するための系及びリボ核タンパク質複合体、並びにそれらを作製する方法

本開示は、目的の標的配列に結合するための系であって、少なくとも1つのガイドRNA又はそれをコードするヌクレオチド配列、及び少なくとも1つのRNA誘導型ヌクレアーゼ又はそれをコードするヌクレオチド配列を含む、系を提供する。ガイドRNAは、目

50

的の標的配列にハイブリダイズし、また、RGNポリペプチドと複合体を形成し、それによって、標的配列に結合するようにRGNポリペプチドを導く。これらの実施形態のうちのいくつかでは、RGNは、配列番号1～12として示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ、又はその活性バリエーション若しくは断片を含む。様々な実施形態では、ガイドRNAは、配列番号13～24として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか1つ、又はその活性バリエーション若しくは断片を含むCRISPR反復配列を含む。特定の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号25～36として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか1つを含むtracrRNA、又はその活性バリエーション若しくは断片を含む。系のガイドRNAは、シングルガイドRNA又はデュアルガイドRNAであり得る。特定の実施形態では、系は、ガイドRNAに対して異種であるRNA誘導型ヌクレアーゼを含み、RGN及びガイドRNAは、天然に互いに複合体化されている（すなわち、互いに結合している）ことは見出されない。

10

【0248】

本明細書で提供される目的の標的配列を結合するための系は、少なくとも1つのタンパク質に結合したRNAの少なくとも1つの分子であるリボ核タンパク質複合体であり得る。本明細書で提供するリボ核タンパク質複合体は、少なくとも1つのガイドRNAをRNA成分として、及びRNA誘導型ヌクレアーゼをタンパク質成分として含む。そのようなリボ核タンパク質複合体は、RGNポリペプチドを天然に発現し、目的の標的配列に対して特異的である特定のガイドRNAを発現するように操作されている細胞又は生物から精製され得る。代替的に、リボ核タンパク質複合体は、RGNポリペプチド及びガイドRNAをコードするポリヌクレオチドで形質転換された細胞又は生命体から精製され、RGNポリペプチド及びガイドRNAの発現を可能にする条件下で培養され得る。したがって、RGNポリペプチド又はRGNリボ核タンパク質複合体を作製するための方法が提供される。かかる方法は、RGNポリペプチド（及びいくつかの実施形態では、ガイドRNA）が発現される条件下で、RGNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、及びいくつかの実施形態では、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む細胞を培養することを含む。次いで、RGNポリペプチド又はRGNリボ核タンパク質は、培養された細胞の溶解物から精製され得る。実施形態では、RGNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、mRNA（メッセンジャーRNA）を含む。いくつかの実施形態では、RNP複合体を組み立てるための方法は、本開示のガイドRNAのうちの1つ以上と、本開示のRGNポリペプチドのうちの1つ以上とを、RNP複合体の形成に好適な条件下で組み合わせることを含む。

20

30

【0249】

生体試料の溶解物からRGNポリペプチド又はRGNリボ核タンパク質複合体を精製するための方法は、当該技術分野で既知である（例えば、サイズ排除及び／又は親和性クロマトグラフィー、2D-PAGE、HPLC、逆相クロマトグラフィー、免疫沈降）。特定の方法では、RGNポリペプチドは、組換え的に産生され、その精製を助けるための精製タグを含み、これには、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、キチン結合タンパク質（CBP）、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン（TRX）、ポリ（NANP）、タンデムアフィニティー精製（TAP）タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG（例えば、3X FLAGタグ）、HA、nus、Softag 1、Softag 3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、6xHis、10xHis、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（BCCP）、及びカルモジュリンが含まれるが、これらに限定されない。一般に、タグ付けされたRGNポリペプチド又はRGNリボ核タンパク質複合体は、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを使用して精製される。他の形態のクロマトグラフィー又は例えば免疫沈降を含む、当該技術分野で既知の他の同様の方法を、単独で又は組み合わせて使用してもよいことが理解されるであろう。

40

【0250】

「単離された」若しくは「精製された」ポリペプチド、又はその生物学的に活性な部分

50

は、その天然に存在する環境で見出されるようなポリペプチドに通常付随するか、又はそれと相互作用する成分を実質的又は本質的に含まない。したがって、単離された又は精製されたポリペプチドは、組換え技術によって生成される場合、他の細胞物質、若しくは培養培地を実質的に含んでいなくてもよく、又は化学合成される場合、化学前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含んでいない。細胞物質を実質的に含まないタンパク質は、約30%、20%、10%、5%、又は1%未満（乾燥重量で）の夾雑タンパク質を有するタンパク質の調製物を含む。本発明のタンパク質又はその生物学的に活性な部分が組換え的に産生される場合、最適には、培養培地は、約30%、20%、10%、5%、又は1%（乾燥重量で）未満の化学前駆体又は非目的タンパク質化学物質を表す。同様に、「単離された」ポリヌクレオチド又は核酸分子は、その天然に存在する環境から除去される。単離されたポリヌクレオチドは、化学的に合成された場合、又はホスホジエステル結合の切断を介して遺伝子座から除去された場合、化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない。単離されたポリヌクレオチドは、ベクター、物質の組成物の一部であり得るか、又は細胞がポリヌクレオチドの元の環境でない限り、細胞内に含まれ得る。

10

20

30

40

50

【0251】

目的の標的配列を結合及び／又は切断するための本明細書に提供される特定の方法は、インビトロで組み立てられたRGNリボ核タンパク質複合体の使用を伴う。RGNリボ核タンパク質複合体のインビトロアセンブリは、RGNポリペプチドがガイドRNAに結合することを可能にする条件下で、RGNポリペプチドをガイドRNAと接触させる当該技術分野で知られている任意の方法を使用して実行することができる。本明細書で使用される場合、「接触させる」、接触させること、「接触した」とは、所望の反応を行うのに好適な条件下で、所望の反応の成分と一緒に配置することを指す。RGNポリペプチドは、生物学的試料、細胞溶解物、又は培養培地から精製されてもよく、インビトロ翻訳を介して産生されてもよく、又は化学的に合成されてもよい。ガイドRNAは、生物学的試料、細胞溶解物、又は培養培地から精製されてもよく、インビトロで転写されてもよく、又は化学的に合成されてもよい。RGNポリペプチド及びガイドRNAは、溶液（例えば、緩衝生理食塩水）中で接触させて、RGNリボ核タンパク質複合体のインビトロアセンブリを可能にすることができる。

【0252】

VIII. 標的配列に結合するか、標的配列を切断するか、又は標的配列を修飾する方法
本開示は、目的の標的ヌクレオチド配列に結合する、それを切断する、及び／又はそれを修飾するための方法を提供する。方法は、少なくとも1つのガイドRNA又はそれをコードするポリヌクレオチド、及び少なくとも1つのRGNポリペプチド又はそれをコードするポリヌクレオチドを含む系を、標的配列、又は標的配列を含む細胞、小器官、若しくは胚に送達することを含む。これらの実施形態のうちのいくつかでは、RGNは、配列番号1～12として示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ、又はその活性バリエーション若しくは断片を含む。様々な実施形態では、ガイドRNAは、配列番号13～24として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか1つ、又はその活性バリエーション若しくは断片を含むCRISPR反復配列を含む。特定の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号25～36として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか1つを含むtracrRNA、又はその活性バリエーション若しくは断片を含む。系のガイドRNAは、シングルガイドRNA又はデュアルガイドRNAであり得る。

【0253】

系のRGNは、ヌクレアーゼ不活性型RGNであってもよく、ニッカーゼ活性を有してもよく、又は融合ポリペプチドであってもよい。いくつかの実施形態では、融合ポリペプチドは、塩基編集ポリペプチド、例えば、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼを含む。他の実施形態では、RGN融合タンパク質は、逆転写酵素を含む。他の実施形態では、RGN融合タンパク質は、ヌクレオチド切除修復（NER）又は転写結合ヌクレオチド切除修復（TC-NER）経路（Wei et al., 2015, PNAS USA 112 (27): E3495-504, Troelstra et al., 19

92, Cell 71:939-953, Marnef et al., 2017, J Mol Biol 429(9):1277-1288)のメンバーなどの機能的核酸修復複合体のメンバーを動員するポリペプチドを含み、これは、2020年1月27日に出版された米国仮出願第62/966,203号に記載され、その全体が参照により組み込まれる。いくつかの実施形態では、RGN融合タンパク質は、TC-NER(ヌクレオチド切除修復)経路のメンバーであり、他のメンバーの動員において機能するCSB(vanden Boom et al., 2004, J Cell Biol 166(1):27-36, van Gool et al., 1997, EMBO J 16(19):5955-65、その例は、配列番号324として示されている)を含む。更なる実施形態では、RGN融合タンパク質は、配列番号324のアミノ酸残基356~394を含むCSBの酸性ドメインなどのCSBの活性ドメインを含む(Teng et al., 2018, Nat Commun 9(1):4115)。

10

【0254】

特定の実施形態では、RGN及び／又はガイドRNAは、RGN及び／又はガイドRNA(又はRGN及びガイドRNAのうちの少なくとも1つをコードするポリヌクレオチド(複数可))が導入される細胞、小器官、又は胚に対して異種である。

【0255】

本方法がガイドRNA及び／又はRGNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを送達することを含むそれらの実施形態では、次に、細胞又は胚を、ガイドRNA及び／又はRGNポリペプチドが発現される条件下で培養することができる。様々な実施形態では、方法は、標的配列をRGNリボ核タンパク質複合体と接触させることを含む。RGNリボ核タンパク質複合体は、ヌクレアーゼ不活性型であるか、又はニックアーゼ活性を有するRGNを含み得る。いくつかの実施形態では、リボ核タンパク質複合体のRGNは、塩基編集ポリペプチドを含む融合ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、方法は、標的配列を含む細胞、小器官、又は胚に、RGNリボ核タンパク質複合体を導入することを含む。RGNリボ核タンパク質複合体は、本明細書に記載されるように、生体試料から精製された複合体、組換え的に産生され、その後精製された複合体、又はインビトロで組み立てられた複合体であり得る。標的配列又は細胞小器官又は胚と接触するRGNリボ核タンパク質複合体がインビトロで組み立てられているそれらの実施形態では、方法は、標的配列、細胞、小器官、又は胚と接触する前に、複合体のインビトロアセンブリを更に行うことができる。

20

30

【0256】

エレクトロポレーションを含むが、これらに限定されない、当該技術分野で公知の任意の方法を使用して、精製された、又はインビトロで組み立てられたRGNリボ核タンパク質複合体を、細胞、小器官、又は胚に導入することができる。代替的に、ガイドRNAをコードするか、又はそれを含むRGNポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを、当該技術分野で知られている任意の方法(例えば、エレクトロポレーション)を使用して、細胞、小器官、又は胚に導入することができる。

【0257】

標的配列又は標的配列を含む細胞、小器官、又は胚に送達するか、又はそれらと接触すると、ガイドRNAは、配列特異的に標的配列に結合するようにRGNを導く。RGNがヌクレアーゼ活性を有するそれらの実施形態では、RGNポリペプチドは、結合時に目的の標的配列を切断する。標的配列は、その後、非相同末端結合、又は提供されたドナーポリヌクレオチドによる相同性指向修復などの内因性修復機構を介して修飾されてもよい。

40

【0258】

RGNポリペプチドの標的配列への結合を測定する方法は、当該技術分野で既知であり、クロマチン免疫沈降アッセイ、ゲルモビリティシフトアッセイ、DNAプルダウンアッセイ、レポーターアッセイ、マイクロプレートキャプチャ及び検出アッセイを含む。同様に、標的配列の切断又は修飾を測定する方法は、当該技術分野で既知であり、分解生成物の検出を容易にするために、適切な標識(例えば、放射性同位体、蛍光物質)を標的配列

50

に付着させて、又は付着させずに、PCR、配列決定、又はゲル電気泳動を使用して切断が確認される、インビトロ又はインビボ切断アッセイを含む。代替的に、ニッキング誘発指数増幅反応 (NTEXPAR) アッセイを使用することができる (例えば、Zhang et al. (2016) Chem. Sci. 7: 4951-4957 を参照されたい)。インビボ切断は、サーベイヤアッセイ (Guschin et al. (2010) Methods Mol Biol 649: 247-256) を使用して評価することができる。

【0259】

いくつかの実施形態では、方法は、2つ以上のガイドRNAと複合体化された単一のタイプのRGNの使用を伴う。2つ以上のガイドRNAは、1つの遺伝子の異なる領域を標的化することができるか、又は複数の遺伝子を標的化することができる。

10

【0260】

ドナーポリヌクレオチドが提供されないそれらの実施形態では、RGNポリペプチドによって導入された二本鎖切断は、非相同末端結合 (NHEJ) 修復プロセスによって修復することができる。NHEJのエラーが発生しやすい性質のために、二本鎖切断の修復は、標的配列の修飾をもたらし得る。本明細書で使用される場合、核酸分子に関する「修飾」は、核酸分子のヌクレオチド配列の変化を指し、これは、1つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入、又は置換、又はそれらの組み合わせであり得る。標的配列の修飾は、変化させたタンパク質産物の発現又はコード配列の不活性化をもたらし得る。

【0261】

ドナーポリヌクレオチドが存在するこれらの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドのドナー配列は、導入された二本鎖切断の修復の過程で標的ヌクレオチド配列に組み込まれるか、又は標的ヌクレオチド配列と交換され得、外因性ドナー配列の導入をもたらす。したがって、ドナーポリヌクレオチドは、目的の標的配列に導入されることが望まれるドナー配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー配列は、新しく組み込まれたドナー配列がRGNによって認識及び切断されないように、元の標的ヌクレオチド配列を変更する。ドナー配列の組み込みは、ドナーポリヌクレオチド内に、標的ヌクレオチド配列に隣接する配列と実質的な配列同一性を有する「相同性アーム」と本明細書において称される隣接配列を含めることによって強化することができ、相同性指向修復プロセスを可能にする。いくつかの実施形態では、相同性アームは、少なくとも50塩基対、少なくとも100塩基対、及び最大2000塩基対、又は以上の長さを有し、標的ヌクレオチド配列内のそれらの対応する配列と少なくとも90%、少なくとも95%、又はそれ以上の配列同一性を有する。

20

30

【0262】

RGNポリペプチドが二本鎖交錯切断を導入するこれらの実施形態では、ドナーポリヌクレオチドは、適合性オーバーハングに隣接するドナー配列を含み、二本鎖切断の修復中の非相同修復プロセスによるオーバーハングを含む切断された標的ヌクレオチド配列へのドナー配列の直接ライゲーションを可能にすることができる。

【0263】

方法が、ニッカーゼであるRGNの使用を伴う (すなわち、二本鎖ポリヌクレオチドの一本鎖のみを切断することができる) これらの実施形態では、方法は、同一又は重複する標的配列を標的とし、ポリヌクレオチドの異なる鎖を切断する2つのRGNニッカーゼを導入することを含むことができる。例えば、二本鎖ポリヌクレオチドの正の (+) 鎖のみを切断するRGNニッカーゼを、二本鎖ポリヌクレオチドの負の (-) 鎖のみを切断する第2のRGNニッカーゼとともに導入することができる。

40

【0264】

様々な実施形態では、標的ヌクレオチド配列に結合し、標的配列を検出するための方法が提供され、この方法は、細胞、小器官、又は胚に、少なくとも1つのガイドRNA、又はそれをコードするポリヌクレオチド、及び少なくとも1つのRGNポリペプチド、又はそれをコードするポリヌクレオチドを導入することと、ガイドRNA及び／又はRGNポ

50

リペプチドを発現することと（コード配列が導入される場合）とを含み、RGNポリペプチドは、ヌクレアーゼ不活性型RGNであり、検出可能な標識を更に含み、この方法は、検出可能な標識を検出することを更に含む。検出可能な標識は、融合タンパク質（例えば、蛍光タンパク質）としてRGNに融合されてもよく、又は視覚的に又は他の手段によって検出することができるRGNポリペプチドにコンジュゲートされたか、その中に組み込まれた小分子であってもよい。

【0265】

また、本明細書では、標的配列又は目的の遺伝子の発現を標的配列の調節下で調節するための方法も提供される。方法は、少なくとも1つのガイドRNA又はそれをコードするポリヌクレオチド、及び少なくとも1つのRGNポリペプチド又はそれをコードするポリヌクレオチドを細胞、小器官、又は胚に導入することと、ガイドRNA及び／又はRGNポリペプチドを発現すること（コード配列が導入される場合）と、を含み、RGNポリペプチドは、ヌクレアーゼ不活性型RGNである。これらの実施形態のいくつかでは、ヌクレアーゼ不活性型RGNは、本明細書に記載の発現調節因子ドメイン（すなわち、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、又は転写抑制ドメイン）を含む融合タンパク質である。

10

【0266】

本開示はまた、目的の標的ヌクレオチド配列に結合する及び／又はそれを修飾するための方法を提供する。方法は、少なくとも1つのガイドRNA又はそれをコードするポリヌクレオチドを含む系を送達することを含み、少なくとも1つの融合ポリペプチドは、標的配列又は標的配列を含む細胞、小器官、若しくは胚に、本発明のRGN及び塩基編集ポリペプチド、例えば、シトシンデアミナーゼ若しくはアデニンデアミナーゼ、又は融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

20

【0267】

当業者は、本開示の方法のいずれかを使用して、単一の標的配列又は複数の標的配列を標的化できることを理解するであろう。したがって、方法は、単一の遺伝子及び／又は複数の遺伝子内の複数の異なる配列を標的とすることができる、複数の異なるガイドRNAと組み合わせた単一のRGNポリペプチドの使用を含む。複数の異なるガイドRNAが、複数の異なるRGNポリペプチドと組み合わせて導入される方法も本明細書に包含される。これらのガイドRNA及びガイドRNA／RGNポリペプチド系は、単一の遺伝子及び／又は複数の遺伝子内の複数の異なる配列を標的とすることができる。

30

【0268】

一態様では、本発明は、上記の方法及び組成物において開示されるエレメントのうちのいずれか1つ以上を含有する、キットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、ベクター系と、キットを使用するための説明書と、を含む。いくつかの実施形態では、ベクター系は、（a）crRNA配列をコードするDNA配列に作動可能に連結した第1の調節エレメント、及びコードされたcrRNA配列の上流にガイド配列を挿入するための1つ以上の挿入部位であって、発現されると、ガイド配列が、真核細胞における標的配列へのRGN複合体の配列特異的結合を導き、RGN複合体が、ガイドRNAポリヌクレオチドと複合体化されたRGN酵素を含む、第1の調節エレメント及び挿入部位、並びに／又は（b）核局在化配列を含む当該RGN酵素をコードする酵素に作動可能に連結した第2の調節エレメントを含む。エレメントは、個別に又は組み合わせて提供され得、バイアル、ボトル、又はチューブなどの、任意の好適な容器で提供され得る。

40

【0269】

いくつかの実施形態では、キットは、1つ以上の言語での説明書を含む。一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載のエレメントのうちの1つ以上を利用するプロセスで使用するための1つ以上の試薬を含む。試薬は、任意の好適な容器に提供され得る。例えば、キットは、1つ以上の反応又は保管緩衝液を提供し得る。試薬は、特定のアッセイにおいて使用可能な形態、又は使用前に1つ以上の他の成分の添加を必要とする形態（例えば、濃縮物又は凍結乾燥形態）で提供され得る。緩衝液は、炭酸ナトリウム緩衝液、重炭

50

酸ナトリウム緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、T r i s緩衝液、M O P S緩衝液、H E P E S緩衝液、及びそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない、任意の緩衝液であり得る。一部の実施形態では、緩衝液は、アルカリ性である。一部の実施形態では、緩衝液は、p Hが、約7～約10である。

【0270】

一部の実施形態では、キットは、ガイド配列及び調節エレメントを作動可能に連結するように、ベクターに挿入するためのガイド配列に対応する1つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、キットは、相同組換えテンプレートポリヌクレオチドを含む。一態様では、本発明は、R G N系の1つ以上のエレメントを使用するための方法を提供する。本発明のR G N系は、標的ポリヌクレオチドを修飾するための有効な手段を提供する。本発明のR G N系は、複数の細胞型における標的ポリヌクレオチドの修飾（例えば、欠失、挿入、トランスロケーション、不活性化、活性化、塩基編集）を含む多種多様な有用性を有する。そのため、本発明のR G N系は、例えば、遺伝子治療、薬物スクリーニング、疾患診断、及び予後における幅広い用途を有する。例示的なR G N系、又はR G N複合体は、標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズされたガイド配列と複合体化されたR G N酵素を含む。

10

【0271】

I X . 標的ポリヌクレオチド

一態様では、本発明は、インビボ、エクスピボ、又はインビトロであり得る、真核細胞中の標的ポリヌクレオチドを修飾する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、ヒト若しくは非ヒト動物又は植物（微細藻類を含む）から細胞又は細胞集団をサンプリングすることと、細胞又は複数の細胞を修飾することと、を含む。培養することは、任意の段階においてエクスピボで生じ得る。細胞は、非ヒト動物又は植物（微細藻類を含む）に再導入されてもよい。

20

【0272】

自然な変動性を使用して、植物ブリーダーは、収量、品質、均一性、耐久性、及び害虫に対する耐性などの望ましい品質のために最も有用な遺伝子を組み合わせる。これらの望ましい品質はまた、成長、日の長さの好み、温度要件、花又は生殖発達の開始日、脂肪酸含有量、昆虫耐性、疾患耐性、線虫耐性、真菌耐性、除草剤耐性、干ばつ、暑さ、湿潤、寒さ、風、及び高塩分を含む有害な土壌条件を含む様々な環境要因に対する耐性を含むこれらの有用な遺伝子の源には、天然又は外来品種、エアルーム品種（h e i r l o o m v a r i e t i e s）、野生植物近縁種、及び誘導変異、例えば、変異誘発剤で植物材料を処理することが含まれる。本発明を使用して、植物ブリーダーは、変異を誘導するための新しいツールを提供される。したがって、当業者は、有用な遺伝子の供給源についてゲノムを分析することができ、所望の特性又は形質を有する品種では、以前の変異誘発剤よりも高い精度で有用な遺伝子の増加を誘導するために本発明を使用し、したがって植物育種プログラムを加速及び改善する。

30

【0273】

R G N系の標的ポリヌクレオチドは、真核生物細胞に対して内因性又は外因性の任意のポリヌクレオチドであり得る。例えば、標的ポリヌクレオチドは、真核細胞の核内に存在するポリヌクレオチドであり得る。標的ポリヌクレオチドは、遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードする配列又はノンコーディング配列（例えば、調節ポリヌクレオチド又はジャンクDNA）であり得る。理論に拘束されることを望むことなく、標的配列は、P A M（プロトスペーサー隣接モチーフ）、すなわち、R G N系によって認識される短い配列と会合するべきである。P A Mの正確な配列及び長さの要件は、使用されるR G Nに応じて異なるが、P A Mは、典型的には、プロトスペーサー（すなわち、標的配列）に隣接する2～7塩基対配列である。

40

【0274】

R G N系の標的ポリヌクレオチドは、多数の疾患関連遺伝子及びポリヌクレオチド、並びにシグナル伝達生化学的経路関連遺伝子及びポリヌクレオチドを含み得る。標的ポリヌ

50

クレオチドの例としては、シグナル伝達生化学経路と関連する配列、例えば、シグナル伝達生化学経路関連遺伝子又はポリヌクレオチドが挙げられる。標的ポリヌクレオチドの例には、疾患関連遺伝子又はポリヌクレオチドが含まれる。「疾患関連」遺伝子又はポリヌクレオチドとは、非疾患対照の組織又は細胞と比較して、疾患発症組織に由来する細胞において異常なレベル又は異常な形態で転写又は翻訳産物を産生する任意の遺伝子又はポリヌクレオチドを指す。それは、異常に高いレベルで発現されるようになる遺伝子であり得、それは、異常に低いレベルで発現されるようになる遺伝子であり得、発現の変化は、疾患の発生及び／又は進行と関連する。疾患関連遺伝子はまた、疾患の病因（例えば、原因となる変異）に關与する遺伝子（複数可）に直接關与するか、又はそれと連鎖不均衡にある変異（複数可）又は遺伝的バリエーションを所有する遺伝子を指す。原因となる変異は、転写されたmRNAの不安定性、スプライシングの変化、又は活性が低下した翻訳産物若しくは翻訳産物の不安定性をもたらす拡大反復（正常な個体に比べて高い数で存在する）であり得る。転写又は翻訳された産物は、既知又は未知であり、更に、正常又は異常なレベルであり得る。いくつかの実施形態では、疾患は、動物疾患であってもよい。いくつかの実施形態では、疾患は、鳥類疾患であってもよい。他の実施形態では、疾患は、哺乳動物疾患であってもよい。更なる実施形態では、疾患は、ヒト疾患であり得る。ヒトにおける疾患関連遺伝子及びポリヌクレオチドの例は、表6に示されており、World Wide Web上で入手可能な、McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.) 及びNational Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.) から入手可能である。

10

20

30

40

50

【0275】

RGN系は、目的のゲノム配列を標的とすることにおいて相対的に容易であるために特に有用であるが、原因となる変異に対処するためにRGNが何をすることができるかについての問題が依然として存在する。1つのアプローチは、RGN（好ましくは、RGNの不活性又はニックーゼバリエーション）と塩基編集酵素又は塩基編集酵素の活性ドメイン、例えば、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼ塩基エディタ（米国特許第9,840,699号、参照により本明細書に組み込まれる）との間の融合タンパク質を産生することである。いくつかの実施形態では、本方法は、DNA分子を、(a) 本発明のRGN又はそのニックーゼバリエーションと、デアミナーゼなどの塩基編集ポリペプチドと、を含む融合タンパク質、及び(b) (a)の融合タンパク質をDNA鎖の標的ヌクレオチド配列に標的化するgRNAと接触させることを含み、DNA分子は、核酸塩基の脱アミノ化に有効な量及びそれに好適な条件下で、融合タンパク質及びgRNAと接触する。いくつかの実施形態では、標的DNA配列は、疾患又は障害と関連する配列を含み、核酸塩基の脱アミノ化は、疾患又は障害に関連しない配列をもたらす。いくつかの実施形態では、標的DNA配列は、作物植物の対立遺伝子に存在し、目的の形質の特定の対立遺伝子は、より低い農学的価値の植物をもたらす。核酸塩基の脱アミノ化は、形質を改善し、植物の農学的価値を増大させる対立遺伝子をもたらす。

【0276】

いくつかの実施形態では、DNA配列は、疾患又は障害と関連するT→C又はA→G点変異を含み、変異型C又はG塩基の脱アミノ化は、疾患又は障害に関連しない配列をもたらす。いくつかの実施形態では、脱アミノ化は、疾患又は障害と関連する配列における点変異を修正する。

【0277】

いくつかの実施形態では、疾患又は障害と関連する配列は、タンパク質をコードし、脱アミノ化は、疾患又は障害と関連する配列に停止コドンを導入し、コードされたタンパク質の切断をもたらす。いくつかの実施形態では、接触させることは、疾患又は障害を有する疑いがあるか、疾患又は障害を有するか、又は疾患又は障害と診断される対象においてインビボで実行される。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、ゲノムにおける点変

異又は単塩基変異と関連する疾患である。いくつかの実施形態では、疾患は、遺伝性疾患、がん、代謝性疾患、又はリソソーム蓄積疾患である。

【0278】

X. 薬学的組成物及び治療方法

本開示のRGNポリペプチド及びその活性バリエーション及び断片、並びにそれらをコードするポリヌクレオチド、本開示のgRNA又はそれをコードするポリヌクレオチド、本開示の系、又はRGNポリペプチド若しくはRGNをコードするポリヌクレオチド、gRNA若しくはgRNAをコードするポリヌクレオチド、若しくはRGN系のうちのいずれかを含む細胞、並びに薬学的に許容可能な担体を含む、薬学的組成物が提供される。

【0279】

薬学的組成物は、活性成分（すなわち、RGNポリペプチド、RGNコードポリヌクレオチド、gRNA、gRNAコードポリヌクレオチド、RGN系、又はこれらのうちのいずれか1つを含む細胞）と、薬学的に許容される担体と、を含む、標的狀態又は疾患を予防、その強度を低減、治療、又は他の方法で治療するために使用される組成物である。

【0280】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」とは、生物に著しい刺激を引き起こさず、活性成分（すなわち、RGNポリペプチド、RGNコードポリヌクレオチド、gRNA、gRNAコードポリヌクレオチド、RGN系、又はこれらのうちのいずれかを含む細胞）の活性及び特性を阻害しない材料を指す。担体は、治療される対象への投与に好適となるように、十分に高い純度及び十分に低い毒性でなければならない。担体は、不活性であり得るか、又は薬学的利益を有することができる。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される担体は、ヒト又は他の脊椎動物への投与に好適である、1つ以上の適合性の固体又は液体充填剤、希釈剤、又はカプセル化物質を含む。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される担体は、天然に存在しない。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される担体及び活性成分は、天然に一緒に見出されない。

【0281】

本開示の方法で使用される薬学的組成物は、好適な担体、賦形剤、及び好適な移動、送達、耐容性などをもたらす他の薬剤とともに製剤化され得る。多数の適切な製剤は、当業者に既知である。例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (21st ed., 2005)を参照されたい。好適な製剤としては、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油、脂質、脂質（カチオン性又はアニオン性）含有ベシクル（LIPOFECTIN小胞など）、脂質ナノ粒子、DNA複合体、無水吸収ペースト、水中油エマルジョン及び油中水エマルジョン、エマルジョンカーボワックス（様々な分子量のポリエチレングリコール）、半固体ゲル、並びにカーボワックスを含有する半固体混合物が挙げられる。経口又は非経口での使用のための薬学的組成物は、有効成分の用量に適合するために好適な単位用量の投薬形態へと調製され得る。単位用量におけるかかる剤形には、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル剤）、坐剤などが含まれる。

【0282】

本開示のRGN、gRNA、RGN系、若しくはそれをコードするポリヌクレオチドを含むか、又はそれで修飾された細胞が対象に投与されるいくつかの実施形態では、細胞は、薬学的に許容される担体を有する懸濁液として投与される。当業者は、細胞組成物中で使用される薬学的に許容される担体が、対象に送達される細胞の生存率を実質的に干渉する量の緩衝液、化合物、凍結保存剤、防腐剤、又は他の薬剤を含まないことを認識するであろう。細胞を含む製剤は、例えば、細胞膜の完全性を維持することを可能にする浸透圧緩衝液と、任意選択的に、投与時に細胞の生存率を維持するか、又は生着を増強するための栄養素とを含むことができる。かかる製剤及び懸濁液は、当業者に既知であり、及び／又は定期的な実験を使用して、本明細書に記載される細胞とともに使用するように適合させることができる。

【0283】

細胞組成物はまた、乳化手順が細胞生存率に悪影響を及ぼさないことを条件として、リポソーム組成物として乳化又は提示することができる。細胞及び任意の他の活性成分は、薬学的に許容され、活性成分と適合性であり、本明細書に記載の治療方法に使用するのに好適な量の賦形剤と混合され得る。

【0284】

細胞組成物に含まれる追加の薬剤は、その中の成分の薬学的に許容される塩を含むことができる。薬学的に許容される塩としては、無機酸、例えば、塩酸若しくはリン酸、又は酢酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸を用いて形成される酸付加塩（ポリペプチドの遊離アミノ基を用いて形成される）が挙げられる。遊離カルボキシル基を用いて形成される塩はまた、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は水酸化第二鉄などの無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基に由来し得る。

10

【0285】

生理学的に許容され、かつ薬学的に許容される担体は、当該技術分野で周知である。例示的な液体担体は、活性成分及び水に加えて材料を含有しない、又は生理学的 pH 値でのリン酸ナトリウム、生理学的生理食塩水、又はその両方、例えばリン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液を含有する滅菌水溶液である。更に、水性担体は、2つ以上の緩衝塩、並びに塩化ナトリウム及び塩化カリウム、デキストロース、ポリエチレングリコール、及び他の溶質などの塩を含有することができる。液体組成物はまた、水に加えて、及び水を除外して、液相を含み得る。そのような追加の液相の例は、グリセリン、綿実油などの植物油、及び水-油エマルションである。特定の障害又は状態の治療に有効である細胞組成物中で使用される活性化合物の量は、障害又は状態の性質に依存することができ、標準的な臨床技術によって決定することができる。

20

【0286】

本開示の RGN ポリペプチド、ガイド RNA、RGN 系、又はそれをコードするポリヌクレオチドは、特定の投与様式及び剤形に応じて、担体、溶媒、安定化剤、アジュバント、希釈剤などの薬学的に許容される賦形剤とともに製剤化することができる。いくつかの実施形態では、これらの薬学的組成物は、生理学的に適合性のある pH を達成するように製剤化され、製剤及び投与経路に応じて、約 pH 3 ~ 約 pH 11、約 pH 3 ~ 約 pH 7 の範囲である。いくつかの実施形態では、緩衝液は、pH が、約 pH 5.0 ~ 約 pH 8 である。いくつかの実施形態では、組成物は、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤とともに、治療有効量の明細書に記載される少なくとも1つの化合物を含むことができる。いくつかの実施形態では、組成物は、明細書に記載の化合物の組み合わせを含むか、又は細菌の増殖の治療若しくは予防に有用な第2の活性成分（例えば、限定されないが、抗菌剤若しくは抗菌剤）を含むか、又は本開示の試薬の組み合わせを含む。

30

【0287】

好適な賦形剤には、例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマー、及び不活性ウイルス粒子などの大きな、ゆっくりと代謝される高分子を含む担体分子が含まれる。他の例示的な賦形剤としては、酸化防止剤（例えば、限定されないが、アスコルビン酸）、キレート剤（例えば、限定されないが、EDTA）、炭水化物（例えば、限定されないが、デキストリン、ヒドロキシアルキルセルロース、及びヒドロキシアルキルメチルセルロース）、ステアリン酸、液体（例えば、限定されないが、油、水、生理食塩水、グリセロール、及びエタノール）、湿潤剤又は乳化剤、pH 緩衝物質などが挙げられる。

40

【0288】

いくつかの実施形態では、製剤は、単位用量又は複数用量の容器、例えば、密封されたアンプル及びバイアル内に提供され、使用の直前に、無菌液体担体、例えば、食塩水、注射用水、半液体フォーム、又はゲルの添加を必要とする凍結乾燥（freeze-dried）（凍結乾燥（lyophilized））条件下で保管されてもよい。臨時注射液及び懸濁液は、前述の種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製してもよい。いくつかの

50

実施形態では、活性成分は、単位用量又は複数用量の容器内で凍結され、後に注射のために解凍されるか、又は使用するまで冷凍下で保持／安定化される緩衝液体溶液中に溶解される。

【0289】

治療剤（複数可）は、制御された放出系に含まれてもよい。薬物の効果を延長するために、皮下注射、髄腔内注射又は筋肉内注射からの薬物の吸収を遅らせることが望ましい場合が多い。これは、難水溶性である結晶性又は非晶質の液体懸濁液を使用することにより達成され得る。次いで、薬物の吸収速度は、その溶解速度に依存し、次いで、その溶解速度は、結晶サイズ及び結晶形態に依存し得る。代替的に、非経口投与された薬物形態の遅延吸収は、薬物を油性ビヒクルに溶解又は懸濁することによって達成される。いくつかの実施形態では、長期徐放性インプラントの使用は、慢性疾患の治療に特に好適であり得る。長期徐放性インプラントは、当業者に周知である。

【0290】

疾患の治療を必要とする対象において疾患を治療する方法が、本明細書に提供される。本方法は、それを必要とする対象に、有効量の本開示のRGNポリペプチド又はその活性バリエーション若しくは断片又はそれをコードするポリヌクレオチド、本開示のgRNA若しくはそれをコードするポリヌクレオチド、本開示のRGN系、あるいはこれらの組成物のうちのいずれか1つによって修飾された細胞又はそれらを含む細胞を投与することを含む。

【0291】

いくつかの実施形態では、治療は、本開示のRGNポリペプチド、gRNA、若しくはRGN系、又はそれをコードするポリヌクレオチド（複数可）を投与することによるインビボ遺伝子編集を含む。いくつかの実施形態では、治療は、エクスピボ遺伝子編集を含み、細胞は、本開示のRGNポリペプチド、gRNA、若しくはRGN系、又はそれをコードするポリヌクレオチド（複数可）を用いてエクスピボで遺伝子修飾され、次いで修飾された細胞は、対象に投与される。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾された細胞は、次いで修飾された細胞を投与される対象に由来し、移植された細胞は、本明細書において自己と称される。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾細胞は、修飾細胞（すなわち、レシピエント）を投与される対象と同じ種内の異なる対象（すなわち、ドナー）に由来し、移植された細胞は、本明細書で同種異系と称される。本明細書に記載されるいくつかの例では、細胞は、それを必要とする対象に投与される前に培養で増殖させることができる。

【0292】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物で治療される疾患は、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞などの免疫療法で治療することができる疾患である。かかる疾患としては、がんが挙げられるが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、本開示の組成物で治療される疾患は、原因となる変異と関連する。本明細書で使用される場合、「原因となる変異」は、対象における疾患又は障害の重症度又は存在に寄与するゲノム内の特定のヌクレオチド、複数のヌクレオチド、又はヌクレオチド配列を指す。原因となる変異の修正は、疾患又は障害に起因する少なくとも1つの症状の改善につながる。いくつかの実施形態では、原因となる変異は、本明細書に開示されるRGNによって認識されるPAM部位に隣接する。原因となる変異は、本開示のRGN又は本開示のRGN及び塩基編集ポリペプチド（すなわち、塩基エディタ）を含む融合ポリペプチドで修正することができる。原因となる変異と関連する疾患の非限定的な例としては、嚢胞性線維症、ハーラー症候群、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、及び鎌状赤血球疾患が挙げられる。いくつかの実施形態では、本開示のRGNで治療される疾患は、表6に列挙される疾患である。疾患関連遺伝子及び変異の追加の非限定的な例は、McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.) 及び National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.) か

ら入手可能であり、World Wide Web上で入手可能である。

【0293】

本明細書で使用される場合、「治療」若しくは「治療すること」、又は「緩和すること」若しくは「改善すること」は、互換的に使用される。これらの用語は、治療的利益及び／又は予防的利益を含むが、これらに限定されない、有益な又は所望の結果を得るためのアプローチを指す。治療的利益とは、治療中の1つ以上の疾患、状態、又は症状における任意の治療的に関連する改善又は効果を意味する。予防的利益のために、組成物は、疾患、状態、又は症状がまだ現れていない場合でも、特定の疾患、状態、又は症状を発症するリスクを有する対象、又は疾患の生理学的症状のうちのうちの1つ以上を報告する対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、治療は、1つ以上の症状が発症した後、及び／又は疾患が診断された後に投与され得る。特定の実施形態では、治療は、例えば、症状の発症を予防若しくは遅延させるために、又は疾患の発症又は進行を阻害するために、症状のない状態で投与されてもよい。例えば、治療は、症状の発症前に（例えば、症状の既往に照らして、及び／又は遺伝的若しくは他の感受性因子に照らして）に感受性のある個体に投与され得る。また、症状が回復した後、例えば、その予防又は再発を予防又は遅延させるために、治療を続けてもよい。

10

【0294】

「有効量」又は「治療有効量」という用語は、有益な又は所望の結果をもたらすのに十分な薬剤の量を指す。治療有効量は、治療される対象及び疾患状態、対象の体重及び年齢、疾患状態の重症度、投与の様式などのうちの1つ以上に応じて変化し得、これらは、当業者によって容易に決定され得る。特定の用量は、選択される特定の薬剤、従うべき投与レジメン、それが他の化合物と組み合わせられて投与されるかどうか、投与のタイミング、及びそれが運ばれる送達系のうちの1つ以上に応じて変化し得る。

20

【0295】

「投与すること」という用語は、所望の効果（複数可）が生じるように、傷害又は修復の部位などの所望の部位で導入された活性成分の少なくとも部分的な局在をもたらす方法又は経路による、対象への活性成分の配置を指す。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載のRGNポリペプチド、核酸分子、リボ核タンパク質複合体、ベクター、薬学的組成物及び／又はgRNAのうちのいずれかを送達することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、かかる方法によって産生される細胞、及びかかる細胞を含むか、又はかかる細胞から産生される生物（動物又は植物など）を更に提供する。いくつかの実施形態では、ガイド配列と組み合わせ（及び任意選択的にそれと複合体化されて）、本明細書に記載のRGNポリペプチド及び／又は核酸分子を細胞に送達する。

30

【0296】

細胞が投与されるこれらの実施形態では、細胞は、移植された細胞又は細胞の成分の少なくとも一部が生存可能なままである対象における所望の位置への送達をもたらす任意の適切な経路によって投与され得る。対象への投与後の細胞の生存期間は、数時間（例えば、24時間）と短いものから数日まで、数年までと長い場合もあり、又は更には患者の生存期間（すなわち、長期移植）である場合もある。例えば、本明細書に記載されるいくつかの態様では、有効量の光受容体細胞又は網膜前駆細胞は、全身投与経路、例えば、腹腔内又は静脈内経路を介して投与される。

40

【0297】

いくつかの実施形態では、投与することは、ウイルス送達によって投与することを含む。本明細書に開示されるRGNポリペプチド、リボ核酸複合体、又はベクターをコードする核酸を含むウイルスベクターは、患者に直接（すなわち、インビボで）投与されてもよく、又はインビトロで細胞を処理するために使用されてもよく、修飾細胞は、任意選択的に（すなわち、エクスピボで）患者に投与され得る。従来のウイルスベースの系は、限定されないが、遺伝子導入用のレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、及び単純ヘルペスウイルスのベクターを含み得る。宿主ゲノムにおける組

50

み込みは、レトロウイルス、レンチウイルス及びアデノ随伴ウイルス遺伝子移入方法で可能であり、しばしば、挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらす。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入又は感染させることが可能なレトロウイルスベクターであり、典型的には、高いウイルス力価を生成する。一過的な発現が好ましい用途では、アデノウイルスベースの系を使用してもよい。アデノウイルスに基づくベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要としない。

【0298】

いくつかの実施形態では、投与することは、核酸の他の非ウイルス送達によって投与することを含む。例示的な非ウイルス送達方法は、限定されないが、RNP複合体、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ウィロゾーム、リボソーム、免疫リボソーム、ポリカチオン又は脂質核酸 (lipid nucleic acid) 複合体、裸のDNA、人工ビリオン、及びDNAの薬剤強化された取り込みを含む。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号、及び同第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 (例えば、Transfectam (商標) 及びLipofectin (商標))。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好適なカチオン性及び中性脂質としては、Feigner、WO1991/17424、WO1991/16024のものが挙げられる。送達は、細胞 (例えば、インビボ若しくはエクスピボ投与) 又は標的組織 (例えば、インビボ投与) であり得る。

【0299】

いくつかの実施形態では、投与することは、静脈内、皮下、筋肉内、経口、直腸、エアロゾルによる、非経口、眼科、肺、経皮、膺、耳、鼻、及び局所投与による、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される方法によって投与することを含む。いくつかの実施形態では、細胞の送達のために、注射又は注入による投与が使用される。

【0300】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、診断、治療、又は療法が所望される任意の個体を指す。いくつかの実施形態では、対象は、動物である。いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。

【0301】

治療の有効性は、熟練した臨床医によって決定され得る。しかしながら、疾患若しくは障害の徴候若しくは症状のうちのいずれか1つ若しくは全てが有益な方法で変化する (例えば、少なくとも10%減少する) か、又は他の臨床的に許容される疾患の症状若しくはマーカーが改善 (improved) 若しくは改善 (ameliorated) される場合、治療は「有効な治療」とみなされる。有効性は、入院又は医療介入の必要性によって評価される、個体が悪化しない (例えば、疾患の進行が停止されるか、又は少なくとも減速される) ことによって測定することができる。これらの指標を測定する方法は、当業者に周知である。治療には以下が含まれる: (1) 疾患を阻害すること、例えば、症状の進行を阻止若しくは遅らせること、又は (2) 疾患を軽減すること、例えば、症状の退行を引き起こすこと、及び (3) 症状の発症の可能性を防止若しくは低減すること。

【0302】

本開示のRGNポリペプチド又はそれをコードするポリヌクレオチド、本開示のgRNA又はそれをコードするポリヌクレオチド、本開示の系、本開示のリボ核タンパク質複合体又はRGNポリペプチド若しくはRGNをコードするポリヌクレオチドのいずれかを含む細胞、gRNA若しくはgRNAをコードするポリヌクレオチド、又はその系と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物が提供される。

【0303】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、生物に著しい刺激を引き起こさず、活性成分 (例えば、RGNポリペプチド又はそれをコードする核酸分子) の活性及び特性を無効にしない材料を指す。担体は、治療される対象への投与に好適となるように、十分に高い純度及び十分に低い毒性でなければならない。担体は、不活性であり得

るか、又は薬学的利益を有することができる。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される担体は、ヒト又は他の脊椎動物への投与に好適である、1つ以上の適合性の固体又は液体充填剤、希釈剤、又はカプセル化物質を含む。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、天然に存在しない薬学的に許容される担体を含む。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される担体及び活性成分は、天然に一緒に見出されず、したがって、異種である。

【0304】

本開示の方法で使用される薬学的組成物は、好適な担体、賦形剤、及び好適な移動、送達、耐容性などをもたらす他の薬剤とともに製剤化され得る。多数の適切な製剤は、当業者に既知である。例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (21st ed., 2005) を参照されたい。非限定的な例としては、注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩などの緩衝液、並びに塩化ナトリウム又はデキストロースなどの張度調整のための薬剤が挙げられる。静脈内投与される場合、特定の担体は、生理食塩水又はリン酸緩衝食塩水（PBS）である。経口又は非経口での使用のための薬学的組成物は、有効成分の用量に適合するために好適な単位用量の投薬形態へと調製され得る。単位用量におけるこのような剤形としては、例えば、錠剤、ピル、カプセル、注射（アンプル）、坐薬などが挙げられる。これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤を含むアジュバントを含有してもよい。微生物の活動の予防は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの様々な抗菌剤及び抗真菌剤によって確実にし得る。等張剤、例えば、糖類、塩化ナトリウムなどを含むことも望ましい場合がある。注射可能な薬学的形態の吸収の延長は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの使用によってもたらされ得る。

【0305】

本開示の RGN、gRNA、系、若しくはそれをコードするポリヌクレオチドを含むか、又はそれで修飾された細胞が対象に投与されるいくつかの実施形態では、細胞は、薬学的に許容される担体を有する懸濁液として投与される。当業者は、細胞組成物中で使用される薬学的に許容される担体が、対象に送達される細胞の生存率を実質的に干渉する量の緩衝液、化合物、凍結保存剤、防腐剤、又は他の薬剤を含まないことを認識するであろう。細胞を含む製剤は、例えば、細胞膜の完全性を維持することを可能にする浸透圧緩衝液と、任意選択的に、投与時に細胞の生存率を維持するか、又は生着を増強するための栄養素とを含むことができる。かかる製剤及び懸濁液は、当業者に既知であり、及び／又は定期的な実験を使用して、本明細書に記載される細胞とともに使用するよう適合させることができる。

【0306】

細胞組成物はまた、乳化手順が細胞生存率に悪影響を及ぼさないことを条件として、リポソーム組成物として乳化又は提示することができる。細胞及び任意の他の活性成分は、薬学的に許容され、活性成分と適合性であり、本明細書に記載の治療方法に使用するのに好適な量の賦形剤と混合され得る。

【0307】

細胞組成物に含まれる追加の薬剤は、その中の成分の薬学的に許容される塩を含むことができる。薬学的に許容される塩としては、無機酸、例えば、塩酸若しくはリン酸、又は酢酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸を用いて形成される酸付加塩（ポリペプチドの遊離アミノ基を用いて形成される）が挙げられる。遊離カルボキシル基を用いて形成される塩はまた、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は水酸化第二鉄などの無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基に由来し得る。

【0308】

本明細書に記載の薬学的組成物を投与する好適な経路としては、局所、皮下、経皮、皮内、病巣内、関節内、腹腔内、膀胱内、経粘膜、歯肉、歯内、蝸牛内、鼓室内、臓器内、硬膜外、髄腔内、筋肉内、静脈内、血管内、骨内、眼周囲、腫瘍内、脳内、及び脳室内投与が挙げられるが、これらに限定されない。

【0309】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の薬学的組成物は、疾患部位（例えば、肺）に局所的に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の薬学的組成物は、注射によって、吸入（例えば、エアロゾルの）カテーテルによって、坐剤によって、又はインプラントによって、対象に投与され、インプラントは、シアラスティック（sialastic）膜又は繊維などの膜を含む、多孔性、非多孔性、又はゲル状物質のものである。一部の実施形態では、薬学的組成物は、例えば、遺伝子編集のために、対象への送達のために製剤化される。

10

【0310】

一部の実施形態では、薬学的組成物は、対象（例えば、ヒト）への静脈内又は皮下投与に適した組成物として、通常の手順に従って製剤化される。いくつかの実施形態では、注射による投与のための薬学的組成物は、滅菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要に応じて、医薬品は、注射部位の疼痛を緩和するために、可溶化剤及びリドカインなどの局所麻酔薬を含むこともできる。一般に、成分は、例えば、活性剤の量を示すアンプル又はサシエなどの密封容器中の乾燥した凍結乾燥粉末又は水を含まない濃縮物として、別々に又は一緒に混合されてのいずれかで供給される。医薬品が注入によって投与される場合、医薬品は、滅菌医薬品グレードの水又は生理食塩水を含む注入ボトルを用いて分注され得る。薬学的組成物が注射によって投与される場合、投与前に成分が混合され得るように、注射用の滅菌水又は生理食塩水のアンプルが提供され得る。

20

【0311】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、脂質粒子又は小胞（例えば、非経口投与にも好適なリポソーム又は微結晶）内に含まれ得る。

【0312】

本明細書に提供される薬学的組成物の説明は、主に、ヒトへの投与に好適である薬学的組成物を対象とするが、かかる組成物が一般に、あらゆる種類の動物又は生物への投与に好適であることが当業者によって理解されるであろう。

30

【0313】

A. 塩基編集を使用した原因となる変異の修飾

本発明のRGN塩基エディタ融合タンパク質に依存するアプローチを使用して修正され得る遺伝性疾患の例は、ハーラー症候群である。ハーラー症候群（MPS-1としても知られている）は、リソソーム中のデルマタン硫酸塩及びヘパラン硫酸塩の蓄積によって分子レベルで特徴付けられるリソソーム蓄積疾患をもたらす α -L-イズロニダーゼ（IDUA）の欠乏の結果である。この疾患は、一般に、 α -L-イズロニダーゼをコードするIDUA遺伝子における変異によって引き起こされる遺伝性遺伝子障害である。一般的なIDUA変異は、W402X及びQ70Xであり、両方ともナンセンス変異であり、翻訳の早期終了をもたらす。そのような変異は、例えば塩基編集アプローチによる単一ヌクレオチドの復帰が、野生型コード配列を復元し、遺伝子座の内因性調節機構によって制御されるタンパク質発現をもたらすため、正確なゲノム編集（PGE）アプローチによって十分に対処される。更に、ヘテロ接合体は無症候性であることが知られているため、これらの変異のうちの1つを標的とするPGE療法は、変異した対立遺伝子のうちの1つのみを修正する必要があるため、この疾患を有する患者の大部分に有用であろう（Bunge et al., (1994) Hum. Mol. Genet. 3 (6): 861-866、参照により本明細書に組み込まれる）。

40

【0314】

ハーラー症候群に対する現在の治療には、酵素補充療法及び骨髄移植が含まれる（V e

50

l l o d i e t a l . (1 9 9 7) A r c h . D i s . C h i l d . 7 6 (2) : 9 2 - 9 9 、 P e t e r s e t a l . (1 9 9 8) B l o o d 9 1 (7) : 2 6 0 1 - 2 6 0 8 、参照により本明細書に組み込まれる)。酵素補充療法は、ハーラー症候群患者の生存及び生活の質に劇的な影響を及ぼしているが、このアプローチは、高価で時間のかかる毎週の注入を必要とする。追加のアプローチには、発現ベクター上でのIDUA遺伝子の送達、又は血清アルブミンのものなどの高発現遺伝子座への遺伝子の挿入（米国特許第9,956,247号、参照により本明細書に組み込まれる）が含まれる。しかしながら、これらのアプローチは、元のIDUA遺伝子座を正しいコード配列に復元しない。ゲノム編集戦略は、最も顕著には、遺伝子発現の調節が健康な個体に存在する自然なメカニズムによって制御されるという多くの利点を有するであろう。更に、塩基編集を使用することは、二本鎖DNA切断を引き起こすことを必要とせず、これは、腫瘍抑制機構の破壊によって、大きな染色体再編成、細胞死、又はがん遺伝性をもたらす得る。一般的な戦略は、本発明のRGN塩基エディタ融合タンパク質、例えば、LPG10136、LPG10139、LPG10134、又はLPG10145を含むものを使用して、ヒトゲノムにおける、ある特定の疾患を引き起こす変異を標的とし、修正することに向けられ得る。塩基編集によって修正することができる標的疾患に対する同様のアプローチもまた追求され得ることが理解されるであろう。他の種、特に一般的な家庭用ペット又は家畜における疾患を引き起こす変異を標的とするための同様のアプローチも、本発明のRGNを使用して展開することができることを更に理解されたい。一般的な家庭用ペット及び家畜としては、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ニワトリ、ロバ、ヘビ、フェレット、並びにサーモン及びエビを含む魚が挙げられる。

10

20

【0315】

B. 標的欠失による原因となる変異の修飾

本発明のRGNは、原因となる変異がより複雑であるヒト治療アプローチにおいても有用であり得る。例えば、フリードライヒ運動失調症及びハンチントン病などのいくつかの疾患は、遺伝子の特定の領域における3つのヌクレオチドモチーフの反復の著しい増加の結果であり、これは、発現されたタンパク質が機能する能力又は発現する能力に影響を及ぼす。フリードライヒ運動失調症(FRDA)は、脊髄における神経組織の進行性変性をもたらす常染色体劣性疾患である。ミトコンドリア内のフラタキシン(FXN)タンパク質のレベルの低下は、細胞レベルで酸化的損傷及び鉄欠乏症を引き起こす。減少したFXN発現は、体細胞及び生殖細胞系FXN遺伝子のイントロン1内のGAAトリプレット拡大につながっている。FRDA患者では、GAA反復は、70超過、場合によっては1000超過（最も一般的には600～900）のトリプレットで構成されることが多いが、罹患していない個体は、約40以下の反復を有する(Pandolfo et al. (2012) Handbook of Clinical Neurology 103: 275-294、Campuzano et al. (1996) Science 271: 1423-1427、Pandolfo (2002) Adv. Exp. Med. Biol. 516: 99-118、全て本明細書に組み込まれる)。

30

【0316】

フリードライヒ運動失調症(FRDA)を引き起こすトリヌクレオチド反復配列の拡大は、FRDA不安定性領域と称される、FXN遺伝子内の定義された遺伝子座において生じる。RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)が、FRDA患者細胞内の不安定領域を切除するために使用され得る。このアプローチは、1) ヒトゲノム内の対立遺伝子を標的とするようにプログラムすることができるRGN及びガイドRNA配列、並びに2) RGN及びガイド配列に対する送達アプローチを必要とする。ゲノム編集に使用される多くのヌクレアーゼ、例えば、S. pyogenes由来の一般的に使用されるCas9ヌクレアーゼ(SpCas9)は、特に、機能発現カセットに必要な他の遺伝子要素に加えて、SpCas9遺伝子及びガイドRNAの長さを考慮する場合、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターにパッケージングするには大きすぎる。それにより、SpCas9を使用するアプローチがより困難になる。

40

50

【0317】

本発明のある特定のRNA誘導型ヌクレアーゼ、例えば、LPG10134、LPG10145、LPG10136、及びLPG10139は、ガイドRNAとともにAAVベクターにパッケージングするのに十分に適している。本発明は、ゲノム不安定性領域が除去される本発明のRGNを使用する戦略を包含する。そのような戦略は、ハンチントン病などの類似の遺伝的基礎を有する他の疾患及び障害に適用可能である。本発明のRGNを使用する同様の戦略は、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ニワトリ、ロバ、ヘビ、フェレット、並びにサーモン及びエビを含む魚を含む、農学的又は経済的に重要な非ヒト動物における同様の疾患及び障害にも適用可能であり得る。

【0318】

C. 標的変異誘発による原因となる変異の修飾

本発明のRGNはまた、有益な効果をもたらし得る破壊的変異を導入することであり得る。ヘモグロビンをコードする遺伝子、特にベータグロビン鎖（HBB遺伝子）の遺伝的欠陥は、鎌状赤血球貧血及びサラセミアを含む異常ヘモグロビン症として知られるいくつかの疾患の原因となり得る。

【0319】

成人ヒトにおいて、ヘモグロビンは、2つのアルファ（ α ）様グロビン鎖及び2つのベータ（ β ）様グロビン鎖及び4つのヘム基を含むヘテロ四量体である。成人において、 $\alpha 2 \beta 2$ 四量体は、ヘモグロビンA（HbA）又は成人ヘモグロビンと呼ばれる。典型的には、アルファ及びベータグロビン鎖は、およそ1：1の比で合成され、この比は、ヘモグロビン及び赤血球（RBC）の安定化の点で重要であるように思われる。発達中の胎児では、異なる形態のヘモグロビンである胎児ヘモグロビン（HbF）が産生され、これはヘモグロビンAよりも高い酸素結合親和性を有するため、酸素は母親の血流を介して乳児の系に送達することができる。胎児ヘモグロビンはまた、2つの α グロビン鎖を含むが、成人 β グロビン鎖の代わりに、2つの胎児ガンマ（ γ ）グロビン鎖を有する（すなわち、胎児ヘモグロビンは $\alpha 2 \gamma 2$ である）。ガンマグロビン産生からベータグロビン産生への切り替えの調節は非常に複雑であり、主にベータグロビン転写の同時上方調節を伴うガンマグロビン転写の下方調節を伴う。妊娠約30週間で、胎児におけるガンマグロビンの合成は低下し始め、一方でベータグロビンの産生は増加する。約10ヶ月齢までに、新生児のヘモグロビンはほぼ全て $\alpha 2 \beta 2$ であるが、一部のHbFは成人期まで持続する（総ヘモグロビンの約1～3%）。異常ヘモグロビン症の患者の大部分では、ガンマグロビンをコードする遺伝子が存在するが、上記のように分娩前後に発生する正常な遺伝子抑制のため、発現は比較的低い。

【0320】

鎌状赤血球症は、 β グロビン遺伝子（HBB）のV6E変異（DNAレベルでGTGへのGAG）によって引き起こされ、得られたヘモグロビンは、「ヘモグロビンS」又は「HbS」と称される。低酸素条件下では、HbS分子が凝集し、繊維性沈殿物を形成する。これらの凝集体は、RBCの異常又は「鎌状赤血球」を引き起こし、細胞の柔軟性の喪失をもたらす。鎌状RBCは、もはや毛細血管床に絞り込むことができず、鎌状赤血球患者に血管閉塞性の危機をもたらす可能性がある。加えて、鎌状RBCは、通常の赤血球よりも脆弱であり、溶血に向かう傾向があり、最終的に患者の貧血につながる。

【0321】

鎌状赤血球患者の治療及び管理は、抗生物質治療、疼痛管理、及び急性エピソード中の輸血を含む生涯にわたる命題である。1つのアプローチは、ガンマグロビンの産生を増加させることによってその効果を一部発揮するヒドロキシ尿素の使用である。しかしながら、慢性ヒドロキシ尿素療法 of 長期的な副作用は依然として不明であり、治療は望ましくない副作用をもたらす、患者ごとに異なる有効性を有する可能性がある。鎌状赤血球治療の有効性の増加にもかかわらず、患者の平均余命は依然として50代半ばから後半であり、疾患の関連する罹患率は、患者の生活の質に大きな影響を与える。

【0322】

サラセミア（アルファサラセミア及びベータサラセミア）もまた、ヘモグロビンと関連する疾患であり、典型的には、グロビン鎖の発現の低下を伴う。これは、遺伝子の調節領域における変異、又は発現の低減若しくはレベル若しくは機能的グロビタンパク質の低減をもたらすグロビンコード配列における変異から生じ得る。サラセミアの治療には、通常、輸血と鉄キレート療法が含まれる。骨髄移植は、適切なドナーを同定できる場合、重度のサラセミアを有する人々の治療にも使用されているが、この手順には重大なリスクを有する可能性がある。

【0323】

鎌状赤血球症（SCD）及びベータサラセミアの両方の治療のために提案されている1つのアプローチは、HbFが異常な成人ヘモグロビンを機能的に置き換えるように、ガンマグロビンの発現を増加させることである。上述のように、ヒドロキシ尿素によるSCD患者の治療は、ガンマグロビン発現の増加に対するその効果に部分的に成功していると考えられている（DeSimone（1982）Proc Nat'l Acad Sci USA 79（14）：4428-31、Ley, et al.,（1982）N. Engl. J. Medicine, 307：1469-1475、Ley, et al.,（1983）Blood 62：370-380、Constantoulakis et al.,（1988）Blood 72（6）：1961-1967、全て参照により本明細書に組み込まれる）。HbFの発現を増加させることは、その産物がガンマグロビン発現の調節において役割を果たす遺伝子の同定を伴う。1つのそのような遺伝子は、BCL11Aである。BCL11Aは、成体赤血球前駆細胞において発現するジンクフィンガータンパク質をコードし、その発現の下方調節は、ガンマグロビン発現の増加をもたらす（Sankaran et al（2008）Science 322：1839、参照により本明細書に組み込まれる）。BCL11A遺伝子を標的とする阻害性RNAの使用が提案されている（例えば、米国特許公開第2011/0182867号、参照により本明細書に組み込まれる）が、この技術は、完全なノックダウンが達成されない可能性があること、そのようなRNAの送達が問題となる可能性があること、及びRNAが連続的に存在しなければならず、生涯にわたって複数の治療を必要とすることを含む、いくつかの潜在的な欠点を有する。

【0324】

本発明のRGN、例えばLPG10134、LPG10145、LPG10136、又はLPG10139を使用して、BCL11Aエンハンサー領域を標的としてBCL11Aの発現を阻害し、それによってガンマグロビン発現を増加させてもよい。この標的化破壊は、非相同末端結合（NHEJ）によって達成することができ、それにより、本発明のRGNは、BCL11Aエンハンサー領域内の特定の配列を標的とし、二本鎖切断を行い、細胞の機構が切断を修復し、典型的には有害な変異を同時に導入する。他の疾患標的について記載されているものと同様に、本発明のRGNは、それらの比較的小さいサイズのために、他の既知のRGNよりも利点を有し得、これは、RGN及びそのガイドRNAのための発現カセットを、インビボ送達のための単一のAAVベクターにパッケージングすることを可能にする。本発明のRGNを使用する同様の戦略はまた、ヒト及び農学的又は経済的に重要な非ヒト動物の両方における同様の疾患及び障害にも適用可能であり得る。

【0325】

XI. 遺伝子組換えを含む細胞

本明細書に提供されるのは、本明細書に記載されるRGN、crRNA、及び／又はtracrRNAによって媒介されるプロセスを使用して修飾された目的の標的配列を含む、細胞及び生物である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、RGNは、配列番号1～12として示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ、又はその活性バリエーション若しくは断片を含む。様々な実施形態では、ガイドRNAは、配列番号13～24として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか1つ、又はその活性バリエーション若しくは断片を含むCRISPR反復配列を含む。特定の実施形態では、ガイドRNAは、配列番号25～36として示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか1つを含むtracrRNA、又

はその活性バリエーション若しくは断片を含む。系のガイドRNAは、シングルガイドRNA又はデュアルガイドRNAであり得る。

【0326】

修飾された細胞は、真核生物（例えば、哺乳動物、植物、昆虫、鳥類細胞）又は原核生物であってもよい。また、本明細書に記載のRGN、crRNA、及び／又はtracrRNAを利用するプロセスによって修飾された少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む、小器官及び胚も提供される。遺伝子修飾された細胞、生物、小器官、及び胚は、修飾されたヌクレオチド配列に対してヘテロ接合性又はホモ接合性であり得る。

【0327】

細胞、生物、小器官、又は胚の染色体修飾は、発現の変化（上方調節若しくは下方調節）、不活性化、又は変化したタンパク質産物若しくは組み込まれた配列の発現をもたらす得る。染色体修飾が遺伝子の不活性化又は非機能性タンパク質産物の発現のいずれかをもたらすこれらの実施形態では、遺伝子修飾された細胞、生物、小器官、又は胚は、「ノックアウト」と称される。ノックアウト表現型は、欠失変異（すなわち、少なくとも1つのヌクレオチドの欠失）、挿入変異（すなわち、少なくとも1つのヌクレオチドの挿入）、又はナンセンス変異（すなわち、終止コドンが導入されるような少なくとも1つのヌクレオチドの置換）の結果であり得る。

【0328】

代替的に、細胞、生物、小器官、又は胚の染色体修飾は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列の染色体組み込みから生じる「ノックイン」を生成することができる。これらの実施形態のいくつかでは、コード配列は、野生型タンパク質をコードする染色体配列が不活性化されるが、外因性に導入されたタンパク質が発現されるように染色体に組み込まれる。

【0329】

他の実施形態では、染色体修飾は、バリエーションタンパク質産物の産生をもたらす。発現されたバリエーションタンパク質産物は、少なくとも1つのアミノ酸置換及び／若しくは少なくとも1つのアミノ酸の付加又は欠失を有することができる。変化した染色体配列によってコードされるバリエーションタンパク質産物は、変化した酵素活性又は基質特異性を含むが、これらに限定されない、野生型タンパク質と比較した場合に、修飾された特性又は活性を示すことができる。

【0330】

更に他の実施形態では、染色体修飾は、タンパク質の変化した発現パターンをもたらす得る。非限定的な例として、タンパク質産物の発現を制御する調節領域における染色体変化は、タンパク質産物の過剰発現若しくは下方調節、又は組織若しくは時間的発現パターンの変化をもたらす得る。

【0331】

修飾された細胞は、従来の方​​法に従って、植物などの生物に成長させることができる。例えば、McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5: 81-84を参照されたい。次いで、これらの植物を成長させ、同じ修飾株又は異なる株のいずれかで受粉させ、結果として生じるハイブリッドは、遺伝子修飾を有し得る。本発明は、遺伝子修飾された種子を提供する。再生された植物の子孫、バリエーション、及び変異体も、これらの部分が遺伝子修飾を含むことを条件として、本発明の範囲内に含まれる。例えば、大豆粕を含む、本遺伝子修飾を保持する加工された植物産物又は副産物が更に提供される。

【0332】

本明細書で提供される方法は、単子葉植物又は双子葉植物を含むがこれらに限定されない、任意の植物種の修飾のために使用され得る。目的の植物の例としては、限定されないが、コーン（トウモロコシ）、ソルガム、小麦、ヒマワリ、トマト、十字花科植物、コショウ、ジャガイモ、綿、コメ、大豆、テンサイ、サトウキビ、タバコ、大麦及びアブラナ、Brassica sp.、アルファルファ、ライ麦、キビ、サフラワー、ピーナッツ

、サツマイモ、キャッサバ、コーヒー、ココナッツ、パイナップル、柑橘類の木、ココア、茶、バナナ、アボカド、イチジク、グアバ、マンゴー、オリーブ、パパイヤ、カシュー、マカダミア、アーモンド、オート麦、野菜、観賞植物、並びに針葉樹が挙げられる。

【0333】

野菜には、トマト、レタス、サヤインゲン、ライ豆、エンドウ豆、並びにキュウリ、カンタロップ、及びマスキメロンなどの *Curcumis* 属のメンバーが含まれるが、これらに限定されない。観賞植物には、ツツジ、アジサイ、ハイビスカス、バラ、チューリップ、ラッパズイセン、ペチュニア、カーネーション、ポインセチア、及び菊が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明の植物は、作物植物（例えば、トウモロコシ、ソルガム、小麦、ヒマワリ、トマト、十字花科植物、コショウ、ジャガイモ、綿、コメ、大豆、テンサイ、サトウキビ、タバコ、大麦、アブラナなど）である。

10

【0334】

また、本明細書に提供される方法を使用して、古細菌及び細菌（例えば、*Bacillus* sp.、*Klebsiella* sp.、*Streptomyces* sp.、*Rhizobium* sp.、*Escherichia* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Salmonella* sp.、*Shigella* sp.、*Vibrio* sp.、*Yersinia* sp.、*Mycoplasma* sp.、*Agrobacterium*、*Lactobacillus* sp.）を含むが、これらに限定されない任意の原核生物種を遺伝子修飾することもできる。

【0335】

本明細書に提供される方法は、動物（例えば、哺乳動物、昆虫、魚、鳥、及び爬虫類）、真菌、アメーバ、藻類、及び酵母を含むがこれらに限定されない、任意の真核生物種又はそれらからの細胞を、遺伝子修飾するために使用することができる。いくつかの実施形態では、本開示の方法によって修飾される細胞は、限定されないが、B細胞、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、キメラ抗原受容体T（CAR-T）細胞、単球、マクロファージ、及び樹状細胞を含む免疫系の細胞などの造血起源の細胞を含む。

20

【0336】

修飾された細胞は、生物に導入され得る。これらの細胞は、自己細胞移植の場合、同じ生物（例えば、人）に由来し得、細胞は、エキスピボアプローチで修飾される。代替的に、同種異系細胞移植の場合には、細胞は、同じ種内の別の生物（例えば、別の人）に由来する。

30

【0337】

XII. キット

本開示のいくつかの態様は、本発明のRGNポリペプチドを含む、キットを提供する。加えて、いくつかの実施形態では、キットは、例えば、インビトロ又はインビボDNA又はRNA編集のために、RGNポリペプチドを使用するための好適な試薬、緩衝液、及び／又は説明書を含む。いくつかの実施形態では、キットは、核酸配列の標的編集に好適なgRNAの設計及び使用に関する説明書を含む。

【0338】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、薬学的キットとして提供され得、キットは、（a）凍結乾燥形態の本開示の組成物を含む容器と、（b）注射用の薬学的に許容される希釈剤（例えば、滅菌水）を含む第2の容器と、を含む。薬学的に許容される希釈剤は、本開示の凍結乾燥化合物の再構築又は希釈に使用することができる。任意選択的に、医薬品又は生物学的製品の製造、使用、又は販売を規制する政府機関によって規定される形式の通知が、かかる容器（複数可）に付随してもよく、通知は、ヒト投与のための製造、使用、又は販売の機関による承認を反映する。

40

【0339】

「a」及び「an」という冠詞は、冠詞の文法的目的語のうちの1つ又は2つ以上（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書で使

50

ド」は、1つ以上のポリペプチドを意味する。

【0340】

本明細書に述べられる全ての刊行物及び特許出願は、本開示が関連する技術分野の当業者のレベルの指標である。全ての刊行物及び特許出願は、各個々の刊行物又は特許出願が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されたときと同じ程度に、本明細書において参照により組み込まれる。

【0341】

前述の発明は、理解の明確化の目的のために説明及び例によっていくつかの詳細が記載されているが、添付の実施形態の範囲内で特定の変更及び修正を実施することができることは明らかであろう。

【0342】

非限定的な実施形態としては、以下のものが挙げられる。

1. RNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子であって、当該ポリヌクレオチドが、配列番号1~12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むRGNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、

当該RGNポリペプチドが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができるガイドRNA (gRNA) に結合したときに、RNA誘導型配列特異的に当該標的DNA配列と結合することができる、核酸分子。

【0343】

2. RGNポリペプチドをコードする当該ポリヌクレオチドが、当該ポリヌクレオチドに対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態1の核酸分子。

【0344】

3. 当該RGNポリペプチドが、配列番号1~12のうちのいずれか1つと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態1又は2の核酸分子。

【0345】

4. 当該RGNポリペプチドが、配列番号1~12のうちのいずれか1つと100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態1又は2の核酸分子。

【0346】

5. 当該RGNポリペプチドが、結合時に当該標的DNA配列を切断することができる、実施形態1~4のうちのいずれか1つの核酸分子。

【0347】

6. 当該RGNポリペプチドが、二本鎖切断を生成することができる、実施形態5の核酸分子。

【0348】

7. 当該RGNポリペプチドが、一本鎖切断を生成することができる、実施形態5の核酸分子。

【0349】

8. 当該RGNポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである、実施形態1~4のうちのいずれか1つの核酸分子。

【0350】

9. RGNポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態1~5、7及び8のうちのいずれか1つの核酸分子。

【0351】

10. 当該プライム編集ポリペプチドが、DNAポリメラーゼを含む、実施形態9の核酸分子。

【0352】

11. 当該プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態9の核酸分子。

【0353】

12. RGNポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実

10

20

30

40

50

施形態 1～8 のうちのいずれか 1 つの核酸分子。

【0354】

13. 塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、実施形態 12 の核酸分子。

【0355】

14. デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態 13 の核酸分子。

【0356】

15. デアミナーゼが、配列番号 377～448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する、実施形態 13 の核酸分子。

【0357】

16. デアミナーゼが、配列番号 377～448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と 100% の配列同一性を有する、実施形態 13 の核酸分子。

【0358】

17. RGN ポリペプチドが、1 つ以上の核局在化シグナルを含む、実施形態 1～16 のうちのいずれか 1 つの核酸分子。

【0359】

18. RGN ポリペプチドが、真核生物細胞における発現のためにコドン最適化されている、実施形態 1～17 のうちのいずれか 1 つの核酸分子。

【0360】

19. 当該標的 DNA 配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) に隣接して位置する、実施形態 1～18 のうちのいずれか 1 つの核酸分子。

【0361】

20. 実施形態 1～19 のうちのいずれか 1 つの核酸分子を含む、ベクター。

【0362】

21. 当該標的 DNA 配列にハイブリダイズすることができる当該 gRNA をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を更に含む、実施形態 20 のベクター。

【0363】

22. ガイド RNA が、

a)

i) 配列番号 13 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、CRISPR RNA と、

ii) 配列番号 25 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、ガイド RNA であって、

当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 1 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、

b)

i) 配列番号 14 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、CRISPR RNA と、

ii) 配列番号 26 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、ガイド RNA であって、

当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 2 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、

c)

i) 配列番号 15 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、CRISPR RNA と、

ii) 配列番号 27 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、ガイド RNA であって、

当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 3 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイド RNA、

d)

10

20

30

40

50

i) 配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

e)

i) 配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

f)

i) 配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

g)

i) 配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

h)

i) 配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

i)

i) 配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

j)

i) 配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

k)

i) 配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を

10

20

30

40

50

含む、C R I S P R RNAと、

i i) 配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を有するt r a c r RNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

当該R G Nポリペプチドが、配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有する
アミノ酸配列を含む、ガイドRNA、及び

l)

i) 配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を有するC R I S P R反復配列を
含む、C R I S P R RNAと、

i i) 配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を有するt r a c r RNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

当該R G Nポリペプチドが、配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を有する
アミノ酸配列を含む、ガイドRNA、からなる群から選択される、実施形態21のベクタ
ー。

【0364】

23. ガイドRNAが、

a)

i) 配列番号13と少なくとも95%の配列同一性を有するC R I S P R反復配列を
含む、C R I S P R RNAと、

i i) 配列番号25と少なくとも95%の配列同一性を有するt r a c r RNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

当該R G Nポリペプチドが、配列番号1と少なくとも95%の配列同一性を有するア
ミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

b)

i) 配列番号14と少なくとも95%の配列同一性を有するC R I S P R反復配列を
含む、C R I S P R RNAと、

i i) 配列番号26と少なくとも95%の配列同一性を有するt r a c r RNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

当該R G Nポリペプチドが、配列番号2と少なくとも95%の配列同一性を有するア
ミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

c)

i) 配列番号15と少なくとも95%の配列同一性を有するC R I S P R反復配列を
含む、C R I S P R RNAと、

i i) 配列番号27と少なくとも95%の配列同一性を有するt r a c r RNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

当該R G Nポリペプチドが、配列番号3と少なくとも95%の配列同一性を有するア
ミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

d)

i) 配列番号16と少なくとも95%の配列同一性を有するC R I S P R反復配列を
含む、C R I S P R RNAと、

i i) 配列番号28と少なくとも95%の配列同一性を有するt r a c r RNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

当該R G Nポリペプチドが、配列番号4と少なくとも95%の配列同一性を有するア
ミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

e)

i) 配列番号17と少なくとも95%の配列同一性を有するC R I S P R反復配列を
含む、C R I S P R RNAと、

i i) 配列番号29と少なくとも95%の配列同一性を有するt r a c r RNAと、
を含む、ガイドRNAであって、

当該R G Nポリペプチドが、配列番号5と少なくとも95%の配列同一性を有するア
ミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

10

20

30

40

50

f)

i) 配列番号18と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号30と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

g)

i) 配列番号19と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号31と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号7と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

h)

i) 配列番号20と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号32と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号8と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

i)

i) 配列番号21と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号33と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号9と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

j)

i) 配列番号22と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号34と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号10と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

k)

i) 配列番号23と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号35と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号11と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、及び

l)

i) 配列番号24と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号36と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号12と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、からなる群から選択される、実施形態21のベクター。

10

20

30

40

50

【0365】

24. ガイドRNAが、

a)

i) 配列番号13と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号25と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号1と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

b)

i) 配列番号14と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号26と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号2と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

c)

i) 配列番号15と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号27と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号3と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

d)

i) 配列番号16と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号28と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号4と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

e)

i) 配列番号17と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号29と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号5と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

f)

i) 配列番号18と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号30と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号6と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

g)

i) 配列番号19と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号31と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号7と100%の配列同一性を有するアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を含む、ガイドRNA、
h)

i) 配列番号20と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号32と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号8と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

i)

i) 配列番号21と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号33と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号9と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

j)

i) 配列番号22と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号34と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号10と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、

k)

i) 配列番号23と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号35と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号11と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、及び

l)

i) 配列番号24と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

ii) 配列番号36と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、ガイドRNAであって、

当該RGNポリペプチドが、配列番号12と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ガイドRNA、からなる群から選択される、実施形態21のベクター。

【0366】

25. 当該gRNAが、シングルガイドRNA (sgRNA) である、実施形態21～24のうちのいずれか1つのベクター。

【0367】

26. 当該sgRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を更に含む、実施形態25のベクター。

【0368】

27. 当該gRNAが、デュアルガイドRNAである、実施形態21～24のうちのいずれか1つのベクター。

【0369】

28. 実施形態1～19のうちのいずれか1つの核酸分子又は実施形態20～27のうちのいずれか1つのベクターを含む、細胞。

【0370】

29. 細胞が、原核細胞である、実施形態28の細胞。

10

20

30

40

50

【0371】

30. 細胞が、真核細胞である、実施形態28の細胞。

【0372】

31. 真核細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態30の細胞。

【0373】

32. 哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、実施形態31の細胞。

【0374】

33. ヒト細胞が、免疫細胞である、実施形態32の細胞。

【0375】

34. 免疫細胞が、幹細胞である、実施形態33の細胞。

10

【0376】

35. 幹細胞が、人工多能性幹細胞である、実施形態34の細胞。

【0377】

36. 真核細胞が、昆虫又は鳥類細胞である、実施形態30の細胞。

【0378】

37. 真核細胞が、真菌細胞である、実施形態30の細胞。

【0379】

38. 真核細胞が、植物細胞である、実施形態30の細胞。

【0380】

39. 実施形態38の細胞を含む、植物。

20

【0381】

40. 実施形態38の細胞を含む、種子。

【0382】

41. RGNポリペプチドを作製するための方法であって、実施形態28～38のうちのいずれか1つの細胞を、RGNポリペプチドが発現される条件下で培養することを含む、方法。

【0383】

42. RGNポリペプチドを作製するための方法であって、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むRNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む異種核酸分子を細胞に導入することであって、

30

当該RGNポリペプチドが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができるガイドRNA(gRNA)に結合したときに、RNA誘導型配列特異的に当該標的DNA配列と結合することができる、導入することと、

当該細胞を、RGNポリペプチドが発現される条件下で培養することと、を含む、方法。

【0384】

43. 当該RGNポリペプチドが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態42の方法。

【0385】

44. 当該RGNポリペプチドが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態42の方法。

40

【0386】

45. 当該RGNポリペプチドを精製することを更に含む、実施形態41～44のうちのいずれか1つの方法。

【0387】

46. 当該細胞が、当該RGNポリペプチドに結合して、RGNリボ核タンパク質複合体を形成することができる1つ以上のガイドRNAを更に発現する、実施形態41～44のうちのいずれか1つの方法。

【0388】

50

47. 当該 R G N リボ核タンパク質複合体を精製することを更に含む、実施形態 46 の方法。

【0389】

48. R N A 誘導型ヌクレアーゼ (R G N) ポリペプチドであって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

当該 R G N ポリペプチドが、標的 D N A 配列にハイブリダイズすることができるガイド R N A (g R N A) に結合したときに、R N A 誘導型配列特異的に D N A 分子の当該標的 D N A 配列と結合することができる、R N A 誘導型ヌクレアーゼ (R G N) ポリペプチド。

10

【0390】

49. 当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 48 の R G N ポリペプチド。

【0391】

50. 当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 12 のうちのいずれか 1 つと 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 48 の R G N ポリペプチド。

【0392】

51. 当該 R G N ポリペプチドが、単離された R G N ポリペプチドである、実施形態 48 ~ 50 のうちのいずれか 1 つの R G N ポリペプチド。

20

【0393】

52. 当該 R G N ポリペプチドが、結合時に当該標的 D N A 配列を切断することができる、実施形態 48 ~ 51 のうちのいずれか 1 つの R G N ポリペプチド。

【0394】

53. 当該 R G N ポリペプチドによる切断が、二本鎖切断を生成する、実施形態 52 の R G N ポリペプチド。

【0395】

54. 当該 R G N ポリペプチドによる切断が、一本鎖切断を生成する、実施形態 52 の R G N ポリペプチド。

【0396】

55. 当該 R G N ポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである、実施形態 48 ~ 51 のうちのいずれか 1 つの R G N ポリペプチド。

30

【0397】

56. R G N ポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態 48 ~ 52、54 及び 55 のうちのいずれか 1 つの R G N ポリペプチド。

【0398】

57. 当該プライム編集ポリペプチドが、D N A ポリメラーゼを含む、実施形態 56 の R G N ポリペプチド。

【0399】

58. 当該プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態 56 の R G N ポリペプチド。

40

【0400】

59. R G N ポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態 48 ~ 55 のうちのいずれか 1 つの R G N ポリペプチド。

【0401】

60. 塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、実施形態 59 の R G N ポリペプチド。

【0402】

61. デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態 60 の R G N ポリペプチド。

50

【0403】

62. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態60のRGNポリペプチド。

【0404】

63. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と100%の配列同一性を有する、実施形態60のRGNポリペプチド。

【0405】

64. 当該標的DNA配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に隣接して位置する、実施形態48～63のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド。

【0406】

65. RGNポリペプチドが、1つ以上の核局在化シグナルを含む、実施形態48～64のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド。

【0407】

66. 実施形態48～65のうちのいずれか1つのRGNポリペプチドと、RGNポリペプチドに結合したガイドRNA(gRNA)と、を含む、リボ核タンパク質(RNP)複合体。

【0408】

67. 当該gRNAが、シングルガイドRNA(sgRNA)である、実施形態66のRNP複合体。

【0409】

68. 当該gRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む、実施形態67のRNP複合体。

【0410】

69. CRISPR RNA(crRNA)又はcrRNAをコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子であって、当該crRNAが、スペーサー配列及びCRISPR反復配列を含み、当該CRISPR反復配列が、配列番号13～24のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、

a) 当該crRNAと、

b) 当該crRNAの当該CRISPR反復配列にハイブリダイズしたトランス活性化CRISPR RNA(tracrRNA)と、を含むガイドRNAが、

当該ガイドRNAがRNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドに結合したときに、当該crRNAのスペーサー配列を介して配列特異的に標的DNA配列にハイブリダイズすることができる、核酸分子。

【0411】

70. crRNAをコードする当該ポリヌクレオチドが、当該ポリヌクレオチドに対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態69の核酸分子。

【0412】

71. 当該CRISPR反復配列が、配列番号13～24のうちのいずれか1つと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態69又は70の核酸分子。

【0413】

72. 当該CRISPR反復配列が、配列番号13～24のうちのいずれか1つと100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態69又は70の核酸分子。

【0414】

73. 当該crRNAをコードする当該ポリヌクレオチドを含む実施形態69～72のうちのいずれか1つの核酸分子を含む、ベクター。

【0415】

74. 当該ベクターが、当該tracrRNAをコードするポリヌクレオチドを更に含む、実施形態73のベクター。

【0416】

10

20

30

40

50

75. 当該 *tracrRNA* が、

- a) 配列番号 25 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 13 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- b) 配列番号 26 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 14 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- c) 配列番号 27 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 15 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- d) 配列番号 28 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 16 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- e) 配列番号 29 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 17 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- f) 配列番号 30 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 18 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- g) 配列番号 31 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 19 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- h) 配列番号 32 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 20 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- i) 配列番号 33 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 21 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- j) 配列番号 34 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 22 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- k) 配列番号 35 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 23 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、及び
- l) 配列番号 36 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 24 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、からなる群から選択される、実施形態 74 のベクター。

【0417】

76. 当該 *tracrRNA* が、

- a) 配列番号 25 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 13 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- b) 配列番号 26 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 14 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- c) 配列番号 27 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 15 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA*、
- d) 配列番号 28 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* であって、当該 *CRISPR* 反復配列が、配列番号 16 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する

- 、 *t r a c r R N A*、
- e) 配列番号 29 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 17 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- f) 配列番号 30 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 18 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- g) 配列番号 31 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 19 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- h) 配列番号 32 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 20 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- i) 配列番号 33 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 21 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- j) 配列番号 34 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 22 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- k) 配列番号 35 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 23 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、及び
- l) 配列番号 36 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 24 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、からなる群から選択される、実施形態 74 のベクター。

10

20

【0418】

77. 当該 *t r a c r R N A* が、

- a) 配列番号 25 と 100 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 13 と 100 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- b) 配列番号 26 と 100 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 14 と 100 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- c) 配列番号 27 と 100 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 15 と 100 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- d) 配列番号 28 と 100 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 16 と 100 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- e) 配列番号 29 と 100 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 17 と 100 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- f) 配列番号 30 と 100 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 18 と 100 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- g) 配列番号 31 と 100 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 19 と 100 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*、
- h) 配列番号 32 と 100 % の配列同一性を有する *t r a c r R N A* であって、当該 *C R I S P R* 反復配列が、配列番号 20 と 100 % の配列同一性を有する、 *t r a c r R N A*

30

40

50

A、

i) 配列番号33と100%の配列同一性を有するtracrRNAであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号21と100%の配列同一性を有する、tracrRNA、

j) 配列番号34と100%の配列同一性を有するtracrRNAであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号22と100%の配列同一性を有する、tracrRNA、

k) 配列番号35と100%の配列同一性を有するtracrRNAであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号23と100%の配列同一性を有する、tracrRNA、及び

l) 配列番号36と100%の配列同一性を有するtracrRNAであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号24と100%の配列同一性を有する、tracrRNA、からなる群から選択される、実施形態74のベクター。

【0419】

78. 当該crRNAをコードする当該ポリヌクレオチドと、当該tracrRNAをコードする当該ポリヌクレオチドとが、同じプロモーターに作動可能に連結されており、シングルガイドRNA (sgRNA) としてコードされる、実施形態74~77のうちのいずれか1つのベクター。

【0420】

79. 当該sgRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む、実施形態78のベクター。

【0421】

80. 当該crRNAをコードする当該ポリヌクレオチドと、当該tracrRNAをコードする当該ポリヌクレオチドとが、別個のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態74~77のうちのいずれか1つのベクター。

【0422】

81. 当該ベクターが、当該RGNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に含む、実施形態74~80のうちのいずれか1つのベクター。

【0423】

82. 当該RGNポリペプチドが、

a) 配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

b) 配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

c) 配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

d) 配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

e) 配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

10

20

30

40

50

f) 配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

g) 配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

h) 配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

i) 配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

j) 配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

k) 配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、及び

l) 配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、からなる群から選択される、実施形態81のベクター。

【0424】

83. 当該RGNポリペプチドが、

a) 配列番号1と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号13と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号25と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

b) 配列番号2と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号14と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号26と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

c) 配列番号3と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号15と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号27と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

d) 配列番号4と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号16と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号28と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

e) 配列番号5と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号17と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号29と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

f) 配列番号6と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号18と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号30と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

g) 配列番号7と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号19と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号31と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

h) 配列番号8と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号20と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号32と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

i) 配列番号9と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号21と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号33と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

j) 配列番号10と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号22と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号34と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

k) 配列番号11と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号23と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号35と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、及び

l) 配列番号12と少なくとも95%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号24と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号36と少なくとも95%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、からなる群から選択される、実施形態81のベクター。

【0425】

84. 当該RGNポリペプチドが、

a) 配列番号1と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号13と100%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号25と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

b) 配列番号2と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号14と100%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号26と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

c) 配列番号3と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号15と100%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号27と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

d) 配列番号4と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号16と100%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号28と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

e) 配列番号5と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号17と100%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号29と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

f) 配列番号6と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号18と100%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号30と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

g) 配列番号7と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該CRISPR反復配列が、配列番号19と100%の配列同一性を有し、当該tracrRNA

10

20

30

40

50

NA が、配列番号 31 と 100% の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

h) 配列番号 8 と 100% の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 CRISPR 反復配列が、配列番号 20 と 100% の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 32 と 100% の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

i) 配列番号 9 と 100% の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 CRISPR 反復配列が、配列番号 21 と 100% の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 33 と 100% の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

j) 配列番号 10 と 100% の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 CRISPR 反復配列が、配列番号 22 と 100% の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 34 と 100% の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

k) 配列番号 11 と 100% の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 CRISPR 反復配列が、配列番号 23 と 100% の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 35 と 100% の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、及び

l) 配列番号 12 と 100% の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 CRISPR 反復配列が、配列番号 24 と 100% の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 36 と 100% の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、からなる群から選択される、実施形態 81 のベクター。

【0426】

85. 配列番号 25 ～ 36 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むトランス活性化 CRISPR RNA (*tracrRNA*) 又は *tracrRNA* をコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子であって、

a) 当該 *tracrRNA* と、

b) スペース配列及び CRISPR 反復配列を含む *crRNA* であって、当該 *tracrRNA* が、当該 *crRNA* の当該 CRISPR 反復配列とハイブリダイズする、*crRNA* と、を含むガイド RNA が、

当該ガイド RNA が RNA 誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドに結合したときに、当該 *crRNA* のスペース配列を介して配列特異的に標的 DNA 配列にハイブリダイズすることができる、核酸分子。

【0427】

86. *tracrRNA* をコードする当該ポリヌクレオチドが、当該ポリヌクレオチドに対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態 85 の核酸分子。

【0428】

87. 当該 *tracrRNA* が、配列番号 25 ～ 36 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 95% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態 85 又は 86 の核酸分子。

【0429】

88. 当該 *tracrRNA* が、配列番号 25 ～ 36 のうちのいずれか 1 つと 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施形態 85 又は 86 の核酸分子。

【0430】

89. 当該 *tracrRNA* をコードする当該ポリヌクレオチドを含む実施形態 85 ～ 88 のうちのいずれか 1 つの核酸分子を含む、ベクター。

【0431】

90. 当該ベクターが、当該 *crRNA* をコードするポリヌクレオチドを更に含む、実施形態 89 のベクター。

【0432】

91. 当該 *crRNA* が、

a) 配列番号 13 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 25 と少なくとも 90% の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

b) 配列番号 14 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であ

10

20

30

40

50

って、当該 *tracrRNA* が、配列番号 26 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

c) 配列番号 15 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 27 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

d) 配列番号 16 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 28 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

e) 配列番号 17 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 29 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

f) 配列番号 18 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 30 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

g) 配列番号 19 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 31 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

h) 配列番号 20 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 32 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

i) 配列番号 21 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 33 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

j) 配列番号 22 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 34 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

k) 配列番号 23 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 35 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

l) 配列番号 24 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 36 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、からなる群から選択される CRISPR 反復配列を含む、実施形態 90 のベクター。

【0433】

92. 当該 *crRNA* が、

a) 配列番号 13 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 25 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

b) 配列番号 14 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 26 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

c) 配列番号 15 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 27 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

d) 配列番号 16 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 28 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

e) 配列番号 17 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列であって、当該 *tracrRNA* が、配列番号 29 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、CRISPR 反復配列、

10

20

30

40

50

f) 配列番号18と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号30と少なくとも95%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

g) 配列番号19と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号31と少なくとも95%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

h) 配列番号20と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号32と少なくとも95%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

i) 配列番号21と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号33と少なくとも95%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

j) 配列番号22と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号34と少なくとも95%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

k) 配列番号23と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号35と少なくとも95%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、及び

l) 配列番号24と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号36と少なくとも95%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、からなる群から選択されるCRISPR反復配列を含む、実施形態90のベクター。

【0434】

93. 当該crRNAが、

a) 配列番号13と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号25と100%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

b) 配列番号14と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号26と100%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

c) 配列番号15と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号27と100%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

d) 配列番号16と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号28と100%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

e) 配列番号17と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号29と100%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

f) 配列番号18と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号30と100%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

g) 配列番号19と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号31と100%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

h) 配列番号20と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号32と100%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

i) 配列番号21と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号33と100%の配列同一性を有する、CRISPR反

10

20

30

40

50

復配列、

j) 配列番号22と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号34と100%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、

k) 配列番号23と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号35と100%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、及び

l) 配列番号24と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列であって、当該tracrRNAが、配列番号36と100%の配列同一性を有する、CRISPR反復配列、からなる群から選択されるCRISPR反復配列を含む、実施形態90のベクター。

10

【0435】

94. 当該crRNAをコードする当該ポリヌクレオチドと、当該tracrRNAをコードする当該ポリヌクレオチドとが、同じプロモーターに作動可能に連結されており、シングルガイドRNA (sgRNA) としてコードされる、実施形態90~93のうちのいずれか1つのベクター。

【0436】

95. 当該sgRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む、実施形態94のベクター。

【0437】

96. 当該crRNAをコードする当該ポリヌクレオチドと、当該tracrRNAをコードする当該ポリヌクレオチドとが、別個のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態90~93のうちのいずれか1つのベクター。

20

【0438】

97. 当該ベクターが、当該RGNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に含む、実施形態90~96のうちのいずれか1つのベクター。

【0439】

98. 当該RGNポリペプチドが、

a) 配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含み、当該tracrRNAが、配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

30

b) 配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含み、当該tracrRNAが、配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

c) 配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含み、当該tracrRNAが、配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

40

d) 配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、RGNポリペプチド、

e) 配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該tracrRNAが、配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、RGNポリペプチド、

f) 配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISP

50

R 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 30 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

g) 配列番号 7 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 19 と少なくとも 90 % の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 31 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、RGN ポリペプチド、

h) 配列番号 8 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 20 と少なくとも 90 % の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 32 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、RGN ポリペプチド、

i) 配列番号 9 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 21 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 33 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

j) 配列番号 10 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 22 と少なくとも 90 % の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 34 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、RGN ポリペプチド、

k) 配列番号 11 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 23 と少なくとも 90 % の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 35 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、RGN ポリペプチド、及び

l) 配列番号 12 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 24 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 36 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、からなる群から選択される、実施形態 97 のベクター。

【0440】

99. 当該 RGN ポリペプチドが、

a) 配列番号 1 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 13 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 25 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

b) 配列番号 2 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 14 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 26 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

c) 配列番号 3 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 15 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 27 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

d) 配列番号 4 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 16 と少なくとも 95 % の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 28 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、RGN ポリペプチド、

e) 配列番号 5 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 17 と少なくとも 95 % の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 29 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、RGN ポリペプチド、

f) 配列番号 6 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって

10

20

30

40

50

、当該 *crRNA* が、配列番号 18 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 30 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

g) 配列番号 7 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 19 と少なくとも 95 % の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 31 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、RGN ポリペプチド、

h) 配列番号 8 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 20 と少なくとも 95 % の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 32 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、RGN ポリペプチド、

i) 配列番号 9 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 21 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 33 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

j) 配列番号 10 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 22 と少なくとも 95 % の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 34 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、RGN ポリペプチド、

k) 配列番号 11 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 23 と少なくとも 95 % の配列同一性を有し、当該 *tracrRNA* が、配列番号 35 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含む、RGN ポリペプチド、及び

l) 配列番号 12 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 24 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 36 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、からなる群から選択される、実施形態 97 のベクター。

【0441】

100. 当該 RGN ポリペプチドが、

a) 配列番号 1 と 100 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 13 と 100 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 25 と 100 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

b) 配列番号 2 と 100 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 14 と 100 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 26 と 100 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

c) 配列番号 3 と 100 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 15 と 100 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 27 と 100 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

d) 配列番号 4 と 100 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 16 と 100 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 28 と 100 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

e) 配列番号 5 と 100 % の配列同一性を有する RGN ポリペプチドであって、当該 *crRNA* が、配列番号 17 と 100 % の配列同一性を有する CRISPR 反復配列を含み、当該 *tracrRNA* が、配列番号 29 と 100 % の配列同一性を有する、RGN ポリペプチド、

10

20

30

40

50

f) 配列番号6と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号18と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含み、当該tracrRNAが、配列番号30と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

g) 配列番号7と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号19と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含み、当該tracrRNAが、配列番号31と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

h) 配列番号8と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号20と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含み、当該tracrRNAが、配列番号32と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

i) 配列番号9と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号21と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含み、当該tracrRNAが、配列番号33と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

j) 配列番号10と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号22と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含み、当該tracrRNAが、配列番号34と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、

k) 配列番号11と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号23と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含み、当該tracrRNAが、配列番号35と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、及び

l) 配列番号12と100%の配列同一性を有するRGNポリペプチドであって、当該crRNAが、配列番号24と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含み、当該tracrRNAが、配列番号36と100%の配列同一性を有する、RGNポリペプチド、からなる群から選択される、実施形態97のベクター。

【0442】

101. 実施形態69~72及び85~88のうちのいずれか1つの核酸分子、実施形態73~84及び89~100のうちのいずれか1つのベクター、実施形態274若しくは275のシングルガイドRNA、又は実施形態276のダブルガイドRNAを含む、細胞。

【0443】

102. 細胞が、原核細胞である、実施形態101の細胞。

【0444】

103. 細胞が、真核細胞である、実施形態101の細胞。

【0445】

104. 真核細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態103の細胞。

【0446】

105. 哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、実施形態104の細胞。

【0447】

106. ヒト細胞が、免疫細胞である、実施形態105の細胞。

【0448】

107. 免疫細胞が、幹細胞である、実施形態106の細胞。

【0449】

108. 幹細胞が、人工多能性幹細胞である、実施形態107の細胞。

【0450】

109. 真核細胞が、昆虫又は鳥類細胞である、実施形態103の細胞。

【0451】

10

20

30

40

50

110. 真核細胞が、真菌細胞である、実施形態103の細胞。

【0452】

111. 真核細胞が、植物細胞である、実施形態103の細胞。

【0453】

112. 実施形態111の細胞を含む、植物。

【0454】

113. 実施形態111の細胞を含む、種子。

【0455】

114. DNA分子の標的DNA配列に結合するための系であって、当該系が、

a) 当該標的DNA配列にハイブリダイズすることができる1つ以上のガイドRNA、又は1つ以上のガイドRNA (gRNA) をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドと、

b) 配列番号1~12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むRNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチド、又はRGNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、を含み、

1つ以上のガイドRNAが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができ、

1つ以上のガイドRNAが、DNA分子の当該標的DNA配列に結合するように当該RGNポリペプチドを導くために、RGNポリペプチドと複合体を形成することができる、系。

【0456】

115. 1つ以上のガイドRNAをコードする当該ヌクレオチド配列及びRGNポリペプチドをコードする当該ヌクレオチド配列のうちの少なくとも1つが、当該ヌクレオチド配列に対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態114の系。

【0457】

116. DNA分子の標的DNA配列に結合するための系であって、当該系が、

a) 当該標的DNA配列にハイブリダイズすることができる1つ以上のガイドRNA、又は1つ以上のガイドRNA (gRNA) をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドと、

b) 配列番号1~12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、RNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドと、を含み、

1つ以上のガイドRNAが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができ、

1つ以上のガイドRNAが、DNA分子の当該標的DNA配列に結合するように当該RGNポリペプチドを導くために、RGNポリペプチドと複合体を形成することができる、系。

【0458】

117. 1つ以上のガイドRNAをコードする当該ヌクレオチド配列のうちの少なくとも1つが、当該ヌクレオチド配列に対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態114~116のうちのいずれか1つの系。

【0459】

118. 当該RGNポリペプチドが、配列番号1~12のうちのいずれか1つと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態114~117のうちのいずれか1つの系。

【0460】

119. 当該RGNポリペプチドが、配列番号1~12のうちのいずれか1つと100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態114~117のうちのいずれか1つの系。

【0461】

120. 当該RGNポリペプチド及び当該1つ以上のガイドRNAが、天然に互いに複合体化されていることは見出されない、実施形態114~119のうちのいずれか1つの系。

10

20

30

40

50

【0462】

121. 当該標的DNA配列が、真核生物標的DNA配列である、実施形態114～120のうちのいずれか1つの系。

【0463】

122. 当該gRNAが、シングルガイドRNA (sgRNA) である、実施形態114～121のうちのいずれか1つの系。

【0464】

123. 当該sgRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む、実施形態122の系。

【0465】

124. 当該gRNAが、デュアルガイドRNAである、実施形態114～121のうちのいずれか1つの系。

【0466】

125. 当該gRNAが、

a) 配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

b) 配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

c) 配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

d) 配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

e) 配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

f) 配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

g) 配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

h) 配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

i) 配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

10

20

30

40

50

j) 配列番号 22 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 34 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 10 と少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

k) 配列番号 23 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 35 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 11 と少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、及び

l) 配列番号 24 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 36 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 12 と少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、からなる群から選択される、実施形態 114 ~ 124 のうちのいずれか 1 つの系。

10

【0467】

126. 当該 g R N A が、

a) 配列番号 13 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 25 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

b) 配列番号 14 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 26 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 2 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

20

c) 配列番号 15 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 27 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 3 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

d) 配列番号 16 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 28 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 4 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

30

e) 配列番号 17 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 29 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 5 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

f) 配列番号 18 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 30 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 6 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

g) 配列番号 19 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 31 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 7 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

40

h) 配列番号 20 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 32 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 8 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

i) 配列番号 21 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 33 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 9 と少なくとも 95 % の配列同一

50

性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

j) 配列番号22と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号34と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号10と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

k) 配列番号23と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号35と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号11と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、及び

l) 配列番号24と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号36と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号12と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、からなる群から選択される、実施形態114~124のうちのいずれか1つの系。

【0468】

127. 当該gRNAが、

a) 配列番号13と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号25と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号1と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

b) 配列番号14と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号26と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号2と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

c) 配列番号15と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号27と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号3と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

d) 配列番号16と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号28と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号4と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

e) 配列番号17と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号29と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号5と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

f) 配列番号18と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号6と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

g) 配列番号19と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号31と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号7と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

h) 配列番号20と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号32と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号8と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、gRNA、

i) 配列番号21と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号33と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、

10

20

30

40

50

当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 9 と 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

j) 配列番号 2 2 と 1 0 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 3 4 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 0 と 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、

k) 配列番号 2 3 と 1 0 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 3 5 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 1 と 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、及び

l) 配列番号 2 4 と 1 0 0 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 3 6 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 2 と 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、g R N A、からなる群から選択される、実施形態 1 1 4 ~ 1 2 4 のうちのいずれか 1 つの系。

【0 4 6 9】

1 2 8 . 当該標的 D N A 配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) に隣接して位置する、実施形態 1 1 4 ~ 1 2 7 のうちのいずれか 1 つの系。

【0 4 7 0】

1 2 9 . 標的 D N A 配列が、細胞内にある、実施形態 1 1 4 ~ 1 2 7 のうちのいずれか 1 つの系。

【0 4 7 1】

1 3 0 . 1 つ以上のガイド R N A が、標的 D N A 配列にハイブリダイズすることができ、ガイド R N A が、標的 D N A 配列の切断を導くために、R G N ポリペプチドと複合体を形成することができる、実施形態 1 1 4 ~ 1 2 9 のうちのいずれか 1 つの系。

【0 4 7 2】

1 3 1 . 切断が、二本鎖切断を生成する、実施形態 1 3 0 の系。

【0 4 7 3】

1 3 2 . 切断が、一本鎖切断を生成する、実施形態 1 3 0 の系。

【0 4 7 4】

1 3 3 . 当該 R G N ポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである、実施形態 1 1 4 ~ 1 2 9 のうちのいずれか 1 つの系。

【0 4 7 5】

1 3 4 . 当該 R G N ポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態 1 1 4 ~ 1 3 0 、 1 3 2 及び 1 3 3 のうちのいずれか 1 つの系。

【0 4 7 6】

1 3 5 . 当該プライム編集ポリペプチドが、D N A ポリメラーゼを含む、実施形態 1 3 4 の系。

【0 4 7 7】

1 3 6 . 当該プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態 1 3 4 の系。

【0 4 7 8】

1 3 7 . R G N ポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態 1 1 4 ~ 1 3 3 のうちのいずれか 1 つの系。

【0 4 7 9】

1 3 8 . 塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、実施形態 1 3 7 の系。

【0 4 8 0】

1 3 9 . デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態 1 3 8 の系。

【0 4 8 1】

1 4 0 . デアミナーゼが、配列番号 3 7 7 ~ 4 4 8 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配

10

20

30

40

50

列と少なくとも 90% の配列同一性を有する、実施形態 138 の系。

【0482】

141. デアミナーゼが、配列番号 377~448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と 100% の配列同一性を有する、実施形態 138 の系。

【0483】

142. RGN ポリペプチドが、1 つ以上の核局在化シグナルを含む、実施形態 114~141 のうちのいずれか 1 つの系。

【0484】

143. RGN ポリペプチドが、真核生物細胞における発現のためにコドン最適化されている、実施形態 114~142 のうちのいずれか 1 つの系。

【0485】

144. 1 つ以上のガイド RNA をコードするヌクレオチド配列及び RGN ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、1 つのベクター上に位置する、実施形態 114~143 のうちのいずれか 1 つの系。

【0486】

145. 当該系が、1 つ以上のドナーポリヌクレオチドを更に含む、実施形態 114~144 のうちのいずれか 1 つの系。

【0487】

146. 実施形態 114~145 のうちのいずれか 1 つの系を含む、細胞。

【0488】

147. 細胞が、原核細胞である、実施形態 146 の細胞。

【0489】

148. 細胞が、真核細胞である、実施形態 146 の細胞。

【0490】

149. 真核細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態 148 の細胞。

【0491】

150. 哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、実施形態 149 の細胞。

【0492】

151. ヒト細胞が、免疫細胞である、実施形態 150 の細胞。

【0493】

152. 免疫細胞が、幹細胞である、実施形態 151 の細胞。

【0494】

153. 幹細胞が、人工多能性幹細胞である、実施形態 152 の細胞。

【0495】

154. 真核細胞が、昆虫又は鳥類細胞である、実施形態 148 の細胞。

【0496】

155. 真核細胞が、真菌細胞である、実施形態 148 の細胞。

【0497】

156. 真核細胞が、植物細胞である、実施形態 148 の細胞。

【0498】

157. 実施形態 156 の細胞を含む、植物。

【0499】

158. 実施形態 156 の細胞を含む、種子。

【0500】

159. 実施形態 1~19、69~72、及び 85~88 のうちのいずれか 1 つの核酸分子、実施形態 20~27、73~84、及び 89~100 のうちのいずれか 1 つのベクター、実施形態 30~35、103~108、及び 148~153 のうちのいずれか 1 つの細胞、実施形態 48~65 のうちのいずれか 1 つの RGN ポリペプチド、実施形態 66~68 のうちのいずれか 1 つの RNP 複合体、又は実施形態 114~145 のうちのいずれか 1 つの系と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

10

20

30

40

50

【0501】

160. 薬学的に許容される担体が、当該核酸分子、当該ベクター、当該細胞、当該 RGN ポリペプチド、又は当該系に対して異種である、実施形態 159 の薬学的組成物。

【0502】

161. 薬学的に許容される担体が、天然に存在しない、実施形態 159 又は 160 の薬学的組成物。

【0503】

162. DNA 分子の標的 DNA 配列に結合するための方法であって、実施形態 114 ~ 145 のうちのいずれか 1 つの系を、当該標的 DNA 配列又は標的 DNA 配列を含む細胞に送達することを含む、方法。

10

【0504】

163. 当該 RGN ポリペプチド又は当該ガイド RNA が、検出可能な標識を更に含み、それによって、当該標的 DNA 配列の検出を可能にする、実施形態 162 の方法。

【0505】

164. 当該ガイド RNA 又は当該 RGN ポリペプチドが、発現調節因子を更に含み、それによって、当該標的 DNA 配列又は当該標的 DNA 配列による転写制御下にある遺伝子の発現を調節する、実施形態 162 の方法。

【0506】

165. DNA 分子の標的 DNA 配列を切断及び／又は修飾するための方法であって、実施形態 114 ~ 145 のうちのいずれか 1 つの系を、当該標的 DNA 配列又は DNA 分子を含む細胞に送達することを含み、当該標的 DNA 配列の切断又は修飾が生じる、方法。

20

【0507】

166. 修飾された当該標的 DNA 配列が、異種 DNA の標的 DNA 配列への挿入を含む、実施形態 165 の方法。

【0508】

167. 修飾された当該標的 DNA 配列が、標的 DNA 配列からの少なくとも 1 つのヌクレオチドの欠失を含む、実施形態 165 の方法。

【0509】

168. 修飾された当該標的 DNA 配列が、標的 DNA 配列における少なくとも 1 つのヌクレオチドの変異を含む、実施形態 165 の方法。

30

【0510】

169. DNA 分子の標的 DNA 配列に結合するための方法であって、

a)

i) 標的 DNA 配列にハイブリダイズすることができる 1 つ以上のガイド RNA と、

ii) 配列番号 1 ~ 12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む RGN ポリペプチドとを、

RNA 誘導型ヌクレアーゼ (RGN) リボヌクレオチド複合体の形成に好適な条件下で組み合わせることによって、RGN リボヌクレオチド複合体を組み立てることと、

b) 当該標的 DNA 配列又は当該標的 DNA 配列を含む細胞を、組み立てられた RGN リボヌクレオチド複合体と接触させることと、を含み、

40

1 つ以上のガイド RNA が、標的 DNA 配列にハイブリダイズし、それによって、当該標的 DNA 配列に結合するように当該 RGN ポリペプチドを導く、方法。

【0511】

170. 当該方法が、インビトロ、インビボ、又はエクスビボで実行される、実施形態 169 の方法。

【0512】

171. 当該 RGN ポリペプチド又は当該ガイド RNA が、検出可能な標識を更に含み、それによって、当該標的 DNA 配列の検出を可能にする、実施形態 169 又は 170 の方法。

50

【0513】

172. 当該ガイドRNA又は当該RGNポリペプチドが、発現調節因子を更に含み、それによって、当該標的DNA配列の発現の調節を可能にする、実施形態169又は170の方法。

【0514】

173. 当該RGNポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されており、それによって、当該標的DNA配列の修飾を可能にする、実施形態169又は170の方法。

【0515】

174. 当該プライム編集ポリペプチドが、DNAポリメラーゼを含む、実施形態173の方法。

10

【0516】

175. 当該プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態173の方法。

【0517】

176. 当該RGNポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されており、それによって、当該標的DNA配列の修飾を可能にする、実施形態169又は170の方法。

【0518】

177. 当該塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼを含む、実施形態176の方法。

20

【0519】

178. 当該デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態177の方法。

【0520】

179. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態177の方法。

【0521】

180. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と100%の配列同一性を有する、実施形態178の方法。

【0522】

181. 当該RGNポリペプチドが、当該標的DNA配列を切断することができ、それによって、当該標的DNA配列の切断及び／又は修飾を可能にする、実施形態169又は170の方法。

30

【0523】

182. DNA分子の標的DNA配列を切断及び／又は修飾するための方法であって、
a) RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドであって、当該RGNが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチド、及び

b) (a)のRGNを標的DNA配列に標的化することが可能な1つ以上のガイドRNAと、DNA分子を接触させることを含み、

40

1つ以上のガイドRNAが、標的DNA配列にハイブリダイズし、それによって、当該標的DNA配列に結合するように当該RGNポリペプチドを導き、当該標的DNA配列の切断及び／又は修飾が生じる、方法。

【0524】

183. 当該RGNポリペプチドによる切断が、二本鎖切断を生成する、実施形態182の方法。

【0525】

184. 当該RGNポリペプチドによる切断が、一本鎖切断を生成する、実施形態182の方法。

【0526】

50

185. 当該 R G N ポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニックアーゼである、実施形態 182 の方法。

【0527】

186. 当該 R G N が、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されており、それによって、当該標的 D N A 配列の修飾を可能にする、実施形態 182、184 及び 185 のうちのいずれか 1 つの方法。

【0528】

187. 当該プライム編集ポリペプチドが、D N A ポリメラーゼを含む、実施形態 186 の方法。

【0529】

188. 当該プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態 186 の方法。

【0530】

189. 当該 R G N ポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態 182～185 のうちのいずれか 1 つの方法。

【0531】

190. 塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、実施形態 189 の方法。

【0532】

191. デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態 189 の方法。

【0533】

192. デアミナーゼが、配列番号 377～448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する、実施形態 190 の方法。

【0534】

193. デアミナーゼが、配列番号 377～448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と 100% の配列同一性を有する、実施形態 190 の方法。

【0535】

194. 修飾された当該標的 D N A 配列が、異種 D N A の標的 D N A 配列への挿入を含む、実施形態 182 の方法。

【0536】

195. 修飾された当該標的 D N A 配列が、標的 D N A 配列からの少なくとも 1 つのヌクレオチドの欠失を含む、実施形態 182 の方法。

【0537】

196. 修飾された当該標的 D N A 配列が、標的 D N A 配列における少なくとも 1 つのヌクレオチドの変異を含む、実施形態 182 の方法。

【0538】

197. 当該標的 D N A 配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) に隣接して位置する、実施形態 169～196 のうちのいずれか 1 つの方法。

【0539】

198. 当該標的 D N A 配列が、真核生物標的 D N A 配列である、実施形態 169～197 のうちのいずれか 1 つの方法。

【0540】

199. 当該 g R N A が、シングルガイド R N A (s g R N A) である、実施形態 169～198 のうちのいずれか 1 つの方法。

【0541】

200. 当該 s g R N A が、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む、実施形態 199 の方法。

【0542】

201. 当該 g R N A が、デュアルガイド R N A である、実施形態 169～198 のうちのいずれか 1 つの方法。

10

20

30

40

50

【0543】

202. 当該RGNが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態169～201のうちのいずれか1つの方法。

【0544】

203. 当該RGNが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態169～201のうちのいずれか1つの方法。

【0545】

204.

a) 当該RGNが、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、

b) 当該RGNが、配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、

c) 当該RGNが、配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、

d) 当該RGNが、配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、

e) 当該RGNが、配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、

f) 当該RGNが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、

g) 当該RGNが、配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、

h) 当該RGNが、配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、

i) 当該RGNが、配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、

j) 当該RGNが、配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、

、

k) 当該RGNが、配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、又は

l) 当該RGNが、配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、実施形態169～201のうちのいずれか1つの方法。

【0546】

205.

c) 当該RGNが、配列番号3と100%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号15と100%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号27と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含むか、

50

d) 当該 R G N が、配列番号 4 と 1 0 0 % の配列同一性を有し、当該ガイド R N A が、配列番号 1 6 と 1 0 0 % の配列同一性を有する c r R N A 反復配列と、配列番号 2 8 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含むか、

e) 当該 R G N が、配列番号 5 と 1 0 0 % の配列同一性を有し、当該ガイド R N A が、配列番号 1 7 と 1 0 0 % の配列同一性を有する c r R N A 反復配列と、配列番号 2 9 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含むか、

f) 当該 R G N が、配列番号 6 と 1 0 0 % の配列同一性を有し、当該ガイド R N A が、配列番号 1 8 と 1 0 0 % の配列同一性を有する c r R N A 反復配列と、配列番号 3 0 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含むか、

g) 当該 R G N が、配列番号 7 と 1 0 0 % の配列同一性を有し、当該ガイド R N A が、配列番号 1 9 と 1 0 0 % の配列同一性を有する c r R N A 反復配列と、配列番号 3 1 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含むか、

h) 当該 R G N が、配列番号 8 と 1 0 0 % の配列同一性を有し、当該ガイド R N A が、配列番号 2 0 と 1 0 0 % の配列同一性を有する c r R N A 反復配列と、配列番号 3 2 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含むか、

i) 当該 R G N が、配列番号 9 と 1 0 0 % の配列同一性を有し、当該ガイド R N A が、配列番号 2 1 と 1 0 0 % の配列同一性を有する c r R N A 反復配列と、配列番号 3 3 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含むか、

j) 当該 R G N が、配列番号 1 0 と 1 0 0 % の配列同一性を有し、当該ガイド R N A が、配列番号 2 2 と 1 0 0 % の配列同一性を有する c r R N A 反復配列と、配列番号 3 4 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含むか、

k) 当該 R G N が、配列番号 1 1 と 1 0 0 % の配列同一性を有し、当該ガイド R N A が、配列番号 2 3 と 1 0 0 % の配列同一性を有する c r R N A 反復配列と、配列番号 3 5 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含むか、又は

l) 当該 R G N が、配列番号 1 2 と 1 0 0 % の配列同一性を有し、当該ガイド R N A が、配列番号 2 4 と 1 0 0 % の配列同一性を有する c r R N A 反復配列と、配列番号 3 6 と 1 0 0 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、実施形態 1 6 9 ~ 2 0 1 のうちのいずれか 1 つの方法。

【0548】

207. 標的 D N A 配列が、細胞内にある、実施形態 1 6 2 ~ 2 0 6 のうちのいずれか 1 つの方法。

【0549】

208. 細胞が、真核細胞である、実施形態 207 の方法。

【0550】

209. 真核細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態 208 の方法。

【0551】

210. 当該哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、実施形態 209 の方法。

【0552】

211. 当該ヒト細胞が、免疫細胞である、実施形態 210 の方法。

【0553】

212. 当該免疫細胞が、幹細胞である、実施形態 211 の方法。

【0554】

213. 当該幹細胞が、人工多能性幹細胞である、実施形態 212 の方法。

【0555】

214. 真核細胞が、昆虫又は鳥類細胞である、実施形態 208 の方法。

【0556】

215. 細胞が、原核細胞である、実施形態 207 の方法。

【0557】

216. 真核細胞が、真菌細胞である、実施形態 208 の方法。

【0558】

10

20

30

40

50

217. 真核細胞が、植物細胞である、実施形態208の方法。

【0559】

218. RGNポリペプチドが発現され、標的DNA配列を切断及び修飾して、修飾された標的DNA配列を含むDNA分子を産生する条件下で細胞を培養することと、当該修飾された標的DNA配列を含む細胞を選択することと、を更に含む、実施形態207～217のうちのいずれか1つの方法。

【0560】

219. 実施形態218の方法による修飾された標的DNA配列を含む、細胞。

【0561】

220. 細胞が、真核細胞である、実施形態219の細胞。

10

【0562】

221. 真核細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態220の細胞。

【0563】

222. 当該哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、実施形態221の細胞。

【0564】

223. 当該ヒト細胞が、免疫細胞である、実施形態222の細胞。

【0565】

224. 当該免疫細胞が、幹細胞である、実施形態223の細胞。

【0566】

225. 当該幹細胞が、人工多能性幹細胞である、実施形態224の細胞。

20

【0567】

226. 真核細胞が、昆虫又は鳥類細胞である、実施形態220の細胞。

【0568】

227. 細胞が、原核細胞である、実施形態219の細胞。

【0569】

228. 真核細胞が、真菌細胞である、実施形態220の細胞。

【0570】

229. 真核細胞が、植物細胞である、実施形態220の細胞。

【0571】

230. 実施形態229の細胞を含む、植物。

30

【0572】

231. 実施形態229の細胞を含む、種子。

【0573】

232. 実施形態220～225のうちのいずれか1つの細胞と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【0574】

233. 遺伝性疾患の原因となる変異における補正を伴う遺伝子修飾細胞を産生するための方法であって、方法が、細胞に、

a) RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドであって、RGNポリペプチドが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、又は当該RGNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、RGNポリペプチドをコードする当該ポリヌクレオチドが、細胞におけるRGNポリペプチドの発現を可能にするプロモーターに作動可能に連結されている、RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチド、及び

40

b) ガイドRNA(gRNA)又は当該gRNAをコードするポリヌクレオチドであって、gRNAをコードする当該ポリヌクレオチドが、プロモーターに作動可能に連結されて、細胞におけるgRNAの発現を可能にする、ガイドRNA(gRNA)又はポリヌクレオチドを導入することを含み、

それにより、RGN及びgRNAが、原因となる変異のゲノム位置を標的とし、原因となる変異を除去するようにゲノム配列を修飾する、方法。

50

【0575】

234. RGNが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである、実施形態233の方法。

【0576】

235. RGNが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態233又は234の方法。

【0577】

236. プライム編集ポリペプチドが、DNAポリメラーゼを含む、実施形態235の方法。

【0578】

237. プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態235の方法。

【0579】

238. 当該gRNAが、シングルガイドRNAであり、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む、実施形態235～237のうちのいずれか1つの方法。

【0580】

239. RGNが、塩基編集活性を有するポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態233又は234の方法。

【0581】

240. 塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、実施形態239の方法。

【0582】

241. 塩基編集活性を有するポリペプチドが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態240の方法。

【0583】

242. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態240の方法。

【0584】

243. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と100%の配列同一性を有する、実施形態240の方法。

【0585】

244. 遺伝性疾患が、一塩基多型によって引き起こされる、実施形態240～243のうちのいずれか1つの方法。

【0586】

245. 遺伝性疾患が、ハーラー症候群である、実施形態240～243のうちのいずれか1つの方法。

【0587】

246. gRNAが、原因となる一塩基多型に近接する領域を標的とするスペーサー配列を更に含む、実施形態244の方法。

【0588】

247. 原因となる変異における欠失を伴う遺伝子修飾細胞を産生するための方法であって、方法が、細胞に、

a) RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドであって、RGNポリペプチドが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、又は当該RGNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、RGNポリペプチドをコードする当該ポリヌクレオチドが、細胞におけるRGNポリペプチドの発現を可能にするプロモーターに作動可能に連結されている、RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチド、及び

b) 第1のガイドRNA(gRNA)又は当該gRNAをコードするポリヌクレオチドであって、gRNAをコードする当該ポリヌクレオチドが、プロモーターに作動可能に連結されて、細胞におけるgRNAの発現を可能にし、更に、gRNAが、原因となる変異の5'隣接部を標的とするスペーサー配列を含む、第1のガイドRNA(gRNA)又は

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチド、及び

c) 第2のガイドRNA (gRNA) 又は当該gRNAをコードするポリヌクレオチドであって、gRNAをコードする当該ポリヌクレオチドが、プロモーターに作動可能に連結されて、細胞におけるgRNAの発現を可能にし、更に、当該第2のgRNAが、原因となる変異の3'隣接部を標的とするスパーサー配列を含む、第2のガイドRNA (gRNA) 又はポリヌクレオチドを導入することを含み、

それにより、RGN及び2つのgRNAが、原因となる変異を標的とし、原因となる変異の少なくとも一部が除去される、方法。

【0589】

248. 遺伝性疾患が、フリードライヒ運動失調症又はハンチントン病である、実施形態247の方法。

【0590】

249. 第1のgRNAが、原因となる変異内又は原因となる変異に近接する領域を標的とするスパーサー配列を更に含む、実施形態247の方法。

【0591】

250. 第2のgRNAが、原因となる変異内又はそれに近接する領域を標的とするスパーサー配列を更に含む、実施形態249の方法。

【0592】

251. 当該RGNポリペプチドが、配列番号1~12のうちのいずれか1つと少なくとも95%の配列同一性を有する、実施形態233~250のうちのいずれか1つの方法

。

【0593】

252. 当該RGNポリペプチドが、配列番号1~12のうちのいずれか1つと100%の配列同一性を有する、実施形態233~250のうちのいずれか1つの方法。

【0594】

253. 当該gRNA、当該第1のgRNA、当該第2のgRNA、又は当該第1のgRNA及び当該第2のgRNAが、

a) 配列番号13と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号25と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

b) 配列番号14と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号26と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

c) 配列番号15と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号27と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

d) 配列番号16と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号28と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号4と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

e) 配列番号17と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号29と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号5と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

f) 配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一

10

20

30

40

50

性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

g) 配列番号19と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

h) 配列番号20と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号32と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

i) 配列番号21と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号33と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号9と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

j) 配列番号22と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号34と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号10と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

k) 配列番号23と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号35と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号11と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、及び

l) 配列番号24と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号36と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号12と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、からなる群から選択されるgRNAから選択される、実施形態233~250のうちのいずれか1つの方法。

【0595】

254. 当該gRNA、当該第1のgRNA、当該第2のgRNA、又は当該第1のgRNA及び当該第2のgRNAが、

a) 配列番号13と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号25と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号1と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

b) 配列番号14と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号26と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号2と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

c) 配列番号15と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号27と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号3と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

d) 配列番号16と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号28と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号4と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

e) 配列番号17と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号29と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号5と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

f) 配列番号18と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、

10

20

30

40

50

配列番号 30 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 6 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

g) 配列番号 19 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 31 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 7 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

h) 配列番号 20 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 32 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 8 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

i) 配列番号 21 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 33 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 9 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

j) 配列番号 22 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 34 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 10 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

k) 配列番号 23 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 35 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 11 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、及び

l) 配列番号 24 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 36 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 12 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、からなる群から選択される *gRNA* から選択される、実施形態 233 ~ 250 のうちのいずれか 1 つの方法。

【0596】

255. 当該 *gRNA*、当該第 1 の *gRNA*、当該第 2 の *gRNA*、又は当該第 1 の *gRNA* 及び当該第 2 の *gRNA* が、

a) 配列番号 13 と 100 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 25 と 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 1 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

b) 配列番号 14 と 100 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 26 と 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 2 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

c) 配列番号 15 と 100 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 27 と 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 3 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

d) 配列番号 16 と 100 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 28 と 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 4 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

e) 配列番号 17 と 100 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 29 と 100 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 5 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を

有する、gRNA、

f) 配列番号18と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号6と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

g) 配列番号19と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号31と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号7と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

h) 配列番号20と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号32と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号8と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

i) 配列番号21と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号33と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号9と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

j) 配列番号22と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号34と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号10と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

k) 配列番号23と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号35と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号11と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、及び

l) 配列番号24と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号36と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号12と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、からなる群から選択されるgRNAから選択される、実施形態233～250のうちのいずれか1つの方法。

【0597】

256. 細胞が、動物細胞である、実施形態233～255のうちのいずれか1つの方法。

【0598】

257. 動物細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態256の方法。

【0599】

258. 細胞が、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ウシ、ブタ、又はヒトに由来する、実施形態256の方法。

【0600】

259. BCL11A mRNA及びタンパク質発現が低下した遺伝子修飾された哺乳動物造血前駆細胞を産生するための方法であって、方法が、単離されたヒト造血前駆細胞に、

a) RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドであって、RGNポリペプチドが、配列番号1～12のうちのいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、又は当該RGNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、RGNポリペプチドをコードする当該ポリヌクレオチドが、細胞におけるRGNポリペプチドの発現を可能にするプロモーターに作動可能に連結されている、RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチド、及び

b) ガイドRNA(gRNA)又は当該gRNAをコードするポリヌクレオチドであって、gRNAをコードする当該ポリヌクレオチドが、プロモーターに作動可能に連結され

10

20

30

40

50

て、細胞における gRNA の発現を可能にする、ガイド RNA (gRNA) 又はポリヌクレオチドを導入することを含み、

それにより、RGN 及び gRNA が、細胞内で発現され、BCL11A エンハンサー領域で切断され、ヒト造血前駆細胞の遺伝子修飾をもたらし、BCL11A の mRNA 及び／又はタンパク質発現を低下させる、方法。

【0601】

260. 当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 1～12 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 95% の配列同一性を有する、実施形態 259 の方法。

【0602】

261. 当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 1～12 のうちのいずれか 1 つと 100% の配列同一性を有する、実施形態 259 の方法。 10

【0603】

262. 当該 gRNA が、

a) 配列番号 13 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 25 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、gRNA であって、当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 1 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

b) 配列番号 14 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 26 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、gRNA であって、当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 2 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、 20

c) 配列番号 15 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 27 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、gRNA であって、当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 3 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

d) 配列番号 16 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 28 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、gRNA であって、当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 4 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

e) 配列番号 17 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 29 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、gRNA であって、当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 5 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、 30

f) 配列番号 18 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 30 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、gRNA であって、当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 6 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

g) 配列番号 19 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 31 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、gRNA であって、当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 7 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、 40

h) 配列番号 20 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 32 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、gRNA であって、当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 8 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

i) 配列番号 21 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、配列番号 33 と少なくとも 90% の配列同一性を有する tracrRNA と、を含む、gRNA であって、当該 RGN ポリペプチドが、配列番号 9 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

j) 配列番号 22 と少なくとも 90% の配列同一性を有する CRISPR 反復配列と、 50

配列番号 34 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 10 と少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

k) 配列番号 23 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 35 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 11 と少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、及び

l) 配列番号 24 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 36 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 12 と少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、からなる群から選択される、実施形態 259 の方法。

【0604】

263. 当該 *gRNA* が、

a) 配列番号 13 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 25 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 1 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

b) 配列番号 14 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 26 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 2 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

c) 配列番号 15 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 27 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 3 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

d) 配列番号 16 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 28 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 4 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

e) 配列番号 17 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 29 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 5 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

f) 配列番号 18 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 30 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 6 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

g) 配列番号 19 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 31 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 7 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

h) 配列番号 20 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 32 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 8 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

i) 配列番号 21 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *CRISPR* 反復配列と、配列番号 33 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する *tracrRNA* と、を含む、*gRNA* であって、当該 *RGN* ポリペプチドが、配列番号 9 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、*gRNA*、

j) 配列番号 22 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 34 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 10 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、g R N A、

k) 配列番号 23 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 35 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 11 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、g R N A、及び

l) 配列番号 24 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 36 と少なくとも 95 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 12 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、g R N A、からなる群から選択される、実施形態 259 の方法。

10

【0605】

264. 当該 g R N A が、

a) 配列番号 13 と 100 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 25 と 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 1 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、g R N A、

b) 配列番号 14 と 100 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 26 と 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 2 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、g R N A、

20

c) 配列番号 15 と 100 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 27 と 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 3 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、g R N A、

d) 配列番号 16 と 100 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 28 と 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 4 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、g R N A、

30

e) 配列番号 17 と 100 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 29 と 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 5 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、g R N A、

f) 配列番号 18 と 100 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 30 と 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 6 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、g R N A、

g) 配列番号 19 と 100 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 31 と 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 7 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、g R N A、

40

h) 配列番号 20 と 100 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 32 と 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 8 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、g R N A、

i) 配列番号 21 と 100 % の配列同一性を有する C R I S P R 反復配列と、配列番号 33 と 100 % の配列同一性を有する t r a c r R N A と、を含む、g R N A であって、当該 R G N ポリペプチドが、配列番号 9 と 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を

50

有する、gRNA、

j) 配列番号22と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号34と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号10と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、

k) 配列番号23と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号35と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号11と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、及び

l) 配列番号24と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号36と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、gRNAであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号12と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、gRNA、からなる群から選択される、実施形態259の方法。

10

【0606】

265. gRNAが、BCL11Aエンハンサー領域内又はそれに近接する領域を標的とするスパーサー配列を更に含む、実施形態259～264のうちのいずれか1つの方法。

【0607】

266. 疾患、障害、又は状態を治療する方法であって、当該方法が、疾患、障害、又は状態の治療を必要とする対象に、有効量の実施形態159～161及び232のうちのいずれか1つの薬学的組成物を投与することを含む、方法。

20

【0608】

267. 当該疾患が、原因となる変異と関連し、当該有効量の当該薬学的組成物が、当該原因となる変異を修正する、実施形態266の方法。

【0609】

268. 当該対象が、当該疾患、障害、又は状態を発症するリスクを有する、実施形態266又は267の方法。

【0610】

269. 疾患、障害、又は状態の治療を必要とする対象において、疾患、障害、又は状態を治療するための、実施形態1～19、69～72、及び85～88のうちのいずれか1つの核酸分子、実施形態20～27、73～84、及び89～100のうちのいずれか1つのベクター、実施形態30～35、103～108、148～153、及び220～225のうちのいずれか1つの細胞、実施形態48～65のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド、実施形態66～68のうちのいずれか1つのRNP複合体、又は実施形態114～145のうちのいずれか1つの系の、使用。

30

【0611】

270. 当該疾患、障害、又は状態が、原因となる変異と関連し、当該治療することが、当該原因となる変異を修正することを含む、実施形態269の使用。

【0612】

271. 当該対象が、当該疾患、障害、又は状態を発症するリスクを有する、実施形態269又は270の使用。

40

【0613】

272. 疾患、障害、又は状態を治療するのに有用な医薬の製造のための、実施形態1～19、69～72、及び85～88のうちのいずれか1つの核酸分子、実施形態20～27、73～84、及び89～100のうちのいずれか1つのベクター、実施形態30～35、103～108、148～153、及び220～225のうちのいずれか1つの細胞、実施形態48～65のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド、実施形態66～68のうちのいずれか1つのRNP複合体、又は実施形態114～145のうちのいずれか1つの系の、使用。

【0614】

50

273. 当該疾患が、原因となる変異と関連し、有効量の当該医薬が、当該原因となる変異を修正する、実施形態272の使用。

【0615】

274. 当該crRNAを含む実施形態69～72のうちのいずれか1つの核酸分子と、当該tracrRNAを含む実施形態85～88のうちのいずれか1つの核酸分子と、を含む、シングルガイドRNA。

【0616】

275. 当該シングルガイドRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を更に含む、実施形態274のシングルガイドRNA。

【0617】

276. 当該crRNAを含む実施形態69～72のうちのいずれか1つの核酸分子と、当該tracrRNAを含む実施形態85～88のうちのいずれか1つの核酸分子と、を含む、デュアルガイドRNA。

【0618】

277. RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子であって、当該ポリヌクレオチドが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むRGNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、

当該RGNポリペプチドが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができるガイドRNA(gRNA)に結合したときに、RNA誘導型配列特異的に当該標的DNA配列と結合することができる、核酸分子。

【0619】

278. RGNポリペプチドをコードする当該ポリヌクレオチドが、当該ポリヌクレオチドに対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態277の核酸分子。

【0620】

279. 当該RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態277又は278の核酸分子。

【0621】

280. 当該RGNポリペプチドが、配列番号6と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態277又は278の核酸分子。

【0622】

281. 当該RGNポリペプチドが、結合時に当該標的DNA配列を切断することができる、実施形態277～280のうちのいずれか1つの核酸分子。

【0623】

282. 当該RGNポリペプチドが、二本鎖切断を生成することができる、実施形態281の核酸分子。

【0624】

283. 当該RGNポリペプチドが、一本鎖切断を生成することができる、実施形態281の核酸分子。

【0625】

284. 当該RGNポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである、実施形態277～280のうちのいずれか1つの核酸分子。

【0626】

285. RGNポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態277～280、283及び284のうちのいずれか1つの核酸分子。

【0627】

286. 当該プライム編集ポリペプチドが、DNAポリメラーゼを含む、実施形態285の核酸分子。

【0628】

10

20

30

40

50

287. 当該プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態285の核酸分子。

【0629】

288. RGNポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態277～284のうちのいずれか1つの核酸分子。

【0630】

289. 塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、実施形態288の核酸分子。

【0631】

290. デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態289の核酸分子。

【0632】

291. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態289の核酸分子。

【0633】

292. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と100%の配列同一性を有する、実施形態289の核酸分子。

【0634】

293. RGNポリペプチドが、1つ以上の核局在化シグナルを含む、実施形態277～292のうちのいずれか1つの核酸分子。

【0635】

294. RGNポリペプチドが、真核生物細胞における発現のためにコドン最適化されている、実施形態277～293のうちのいずれか1つの核酸分子。

【0636】

295. 当該標的DNA配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に隣接して位置する、実施形態277～294のうちのいずれか1つの核酸分子。

【0637】

296. 当該PAMが、配列番号78又は465として示される配列を有する、実施形態295の核酸分子。

【0638】

297. 実施形態277～296のうちのいずれか1つの核酸分子を含む、ベクター。

【0639】

298. 当該標的DNA配列にハイブリダイズすることができる当該gRNAをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を更に含む、実施形態297のベクター。

【0640】

299. ガイドRNAが、

a) 配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

b) 配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、実施形態298のベクター。

【0641】

300. ガイドRNAが、

a) 配列番号18と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列を含む、CRISPR RNAと、

b) 配列番号30と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、実施形態298のベクター。

【0642】

301. ガイドRNAが、

a) 配列番号18と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、

b) 配列番号30と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、実施形態298のベクター。

10

20

30

40

50

【0643】

302. 当該gRNAが、シングルガイドRNA（sgRNA）である、実施形態298～301のうちのいずれか1つのベクター。

【0644】

303. 当該sgRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を更に含む、実施形態302のベクター。

【0645】

304. 当該gRNAが、デュアルガイドRNAである、実施形態298～301のうちのいずれか1つのベクター。

【0646】

305. 実施形態277～296のうちのいずれか1つの核酸分子又は実施形態297～304のうちのいずれか1つのベクターを含む、細胞。

【0647】

306. RNA誘導型ヌクレアーゼ（RGN）ポリペプチドであって、当該RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、当該RGNポリペプチドが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができるガイドRNA（gRNA）に結合したときに、RNA誘導型配列特異的にDNA分子の当該標的DNA配列と結合することができる、RNA誘導型ヌクレアーゼ（RGN）ポリペプチド。

【0648】

307. 当該RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態306のRGNポリペプチド。

【0649】

308. 当該RGNポリペプチドが、配列番号6と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態306のRGNポリペプチド。

【0650】

309. 当該RGNポリペプチドが、単離されたRGNポリペプチドである、実施形態306～308のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド。

【0651】

310. 当該RGNポリペプチドが、結合時に当該標的DNA配列を切断することができる、実施形態306～309のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド。

【0652】

311. 当該RGNポリペプチドによる切断が、二本鎖切断を生成する、実施形態310のRGNポリペプチド。

【0653】

312. 当該RGNポリペプチドによる切断が、一本鎖切断を生成する、実施形態310のRGNポリペプチド。

【0654】

313. 当該RGNポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである、実施形態306～309のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド。

【0655】

314. RGNポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態306～310、312及び313のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド。

【0656】

315. 当該プライム編集ポリペプチドが、DNAポリメラーゼを含む、実施形態314のRGNポリペプチド。

【0657】

316. 当該プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態314のRGNポリペプチド。

10

20

30

40

50

【0658】

317. RGNポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態306～316のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド。

【0659】

318. 塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、実施形態317のRGNポリペプチド。

【0660】

319. デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態318のRGNポリペプチド。

【0661】

320. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態318のRGNポリペプチド。

【0662】

321. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と100%の配列同一性を有する、実施形態318のRGNポリペプチド。

【0663】

322. 当該標的DNA配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）に隣接して位置する、実施形態306～321のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド。

【0664】

323. 当該PAMが、配列番号78又は465として示される配列を有する、実施形態322のRGNポリペプチド。

【0665】

324. RGNポリペプチドが、1つ以上の核局在化シグナルを含む、実施形態306～323のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド。

【0666】

325. 実施形態306～324のうちのいずれか1つのRGNポリペプチドと、RGNポリペプチドに結合したガイドRNA（gRNA）と、を含む、リボ核タンパク質（RNP）複合体。

【0667】

326. 当該gRNAが、シングルガイドRNA（sgRNA）である、実施形態325のRNP複合体。

【0668】

327. 当該gRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む、実施形態326のRNP複合体。

【0669】

328. DNA分子の標的DNA配列に結合するための系であって、当該系が、

a) 当該標的DNA配列にハイブリダイズすることができる1つ以上のガイドRNA、又は1つ以上のガイドRNA（gRNA）をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドと、

b) 配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むRNA誘導型ヌクレアーゼ（RGN）ポリペプチド、又はRGNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、を含み、

1つ以上のガイドRNAが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができ、

1つ以上のガイドRNAが、DNA分子の当該標的DNA配列に結合するように当該RGNポリペプチドを導くために、RGNポリペプチドと複合体を形成することができる、系。

【0670】

329. 1つ以上のガイドRNAをコードする当該ヌクレオチド配列及びRGNポリペプチドをコードする当該ヌクレオチド配列のうちの少なくとも1つが、当該ヌクレオチド配列に対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態328の系。

10

20

30

40

50

【0671】

330. DNA分子の標的DNA配列に結合するための系であって、当該系が、

a) 当該標的DNA配列にハイブリダイズすることができる1つ以上のガイドRNA、又は1つ以上のガイドRNA (gRNA) をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドと、

b) 配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、RNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドと、を含み、

1つ以上のガイドRNAが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができ、

1つ以上のガイドRNAが、DNA分子の当該標的DNA配列に結合するように当該RGNポリペプチドを導くために、RGNポリペプチドと複合体を形成することができる、系。

10

【0672】

331. 1つ以上のガイドRNAをコードする当該ヌクレオチド配列のうちの少なくとも1つが、当該ヌクレオチド配列に対して異種のプロモーターに作動可能に連結されている、実施形態328~330のうちのいずれか1つの系。

【0673】

332. 当該RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態328~331のうちのいずれか1つの系。

【0674】

333. 当該RGNポリペプチドが、配列番号6と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態328~331のうちのいずれか1つの系。

20

【0675】

334. 当該RGNポリペプチド及び当該1つ以上のガイドRNAが、天然に互いに複合体化されていることは見出されない、実施形態328~333のうちのいずれか1つの系。

【0676】

335. 当該標的DNA配列が、真核生物標的DNA配列である、実施形態328~334のうちのいずれか1つの系。

【0677】

336. 当該gRNAが、シングルガイドRNA (sgRNA) である、実施形態328~335のうちのいずれか1つの系。

30

【0678】

337. 当該sgRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む、実施形態336の系。

【0679】

338. 当該gRNAが、デュアルガイドRNAである、実施形態328~336のうちのいずれか1つの系。

【0680】

339. 当該gRNAが、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、実施形態328~338のうちのいずれか1つの系。

40

【0681】

340. 当該gRNAが、配列番号18と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、実施形態328~338のうちのいずれか1つの系。

【0682】

341. 当該gRNAが、配列番号18と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、実施形態328~338のうちのいずれか1つの系。

【0683】

50

342. 当該標的DNA配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に隣接して位置する、実施形態328～341のうちのいずれか1つの系。

【0684】

343. 当該PAMが、配列番号78又は465として示される配列を有する、実施形態342の系。

【0685】

344. 標的DNA配列が、細胞内にある、実施形態328～341のうちのいずれか1つの系。

【0686】

345. 1つ以上のガイドRNAが、標的DNA配列にハイブリダイズすることができ、ガイドRNAが、標的DNA配列の切断を導くために、RGNポリペプチドと複合体を形成することができる、実施形態328～344のうちのいずれか1つの系。

【0687】

346. 切断が、二本鎖切断を生成する、実施形態345の系。

【0688】

347. 切断が、一本鎖切断を生成する、実施形態345の系。

【0689】

348. 当該RGNポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである、実施形態328～344のうちのいずれか1つの系。

【0690】

349. 当該RGNポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態328～344、347及び348のうちのいずれか1つの系。

【0691】

350. 当該プライム編集ポリペプチドが、DNAポリメラーゼを含む、実施形態349の系。

【0692】

351. 当該プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態349の系。

【0693】

352. RGNポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態328～348のうちのいずれか1つの系。

【0694】

353. 塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、実施形態352の系。

【0695】

354. デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態353の系。

【0696】

355. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態353の系。

【0697】

356. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と100%の配列同一性を有する、実施形態353の系。

【0698】

357. RGNポリペプチドが、1つ以上の核局在化シグナルを含む、実施形態328～355のうちのいずれか1つの系。

【0699】

358. RGNポリペプチドが、真核生物細胞における発現のためにコドン最適化されている、実施形態328～357のうちのいずれか1つの系。

【0700】

359. 1つ以上のガイドRNAをコードするヌクレオチド配列及びRGNポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、1つのベクター上に位置する、実施形態328～3

10

20

30

40

50

58のうちのいずれか1つの系。

【0701】

360. 当該系が、1つ以上のドナーポリヌクレオチドを更に含む、実施形態328～359のうちのいずれか1つの系。

【0702】

361. 実施形態328～360のうちのいずれか1つの系を含む、細胞。

【0703】

362. 実施形態277～296のうちのいずれか1つの核酸分子、実施形態297～304のうちのいずれか1つのベクター、実施形態305若しくは361の細胞、実施形態306～324のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド、実施形態325～327のうちのいずれか1つのRNP複合体、又は実施形態328～360のうちのいずれか1つの系と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

10

【0704】

363. 薬学的に許容される担体が、当該核酸分子、当該ベクター、当該細胞、当該RGNポリペプチド、又は当該系に対して異種である、実施形態362の薬学的組成物。

【0705】

364. 薬学的に許容される担体が、天然に存在しない、実施形態362又は363の薬学的組成物。

【0706】

365. DNA分子の標的DNA配列に結合するための方法であって、実施形態328～360のうちのいずれか1つの系を、当該標的DNA配列又は標的DNA配列を含む細胞に送達することを含む、方法。

20

【0707】

366. 当該RGNポリペプチド又は当該ガイドRNAが、検出可能な標識を更に含み、それによって、当該標的DNA配列の検出を可能にする、実施形態365の方法。

【0708】

367. 当該ガイドRNA又は当該RGNポリペプチドが、発現調節因子を更に含み、それによって、当該標的DNA配列又は当該標的DNA配列による転写制御下にある遺伝子の発現を調節する、実施形態365の方法。

【0709】

368. DNA分子の標的DNA配列を切断及び／又は修飾するための方法であって、実施形態328～360のうちのいずれか1つの系を、当該標的DNA配列又はDNA分子を含む細胞に送達することを含み、当該標的DNA配列の切断又は修飾が生じる、方法。

30

【0710】

369. 修飾された当該標的DNA配列が、異種DNAの標的DNA配列への挿入を含む、実施形態368の方法。

【0711】

370. 修飾された当該標的DNA配列が、標的DNA配列からの少なくとも1つのヌクレオチドの欠失を含む、実施形態368の方法。

40

【0712】

371. 修飾された当該標的DNA配列が、標的DNA配列における少なくとも1つのヌクレオチドの変異を含む、実施形態368の方法。

【0713】

372. DNA分子の標的DNA配列に結合するための方法であって、

a)

i) 標的DNA配列にハイブリダイズすることができる1つ以上のガイドRNAと、

ii) 配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むRGNポリペプチドとを、

RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)リボヌクレオチド複合体の形成に好適な条件下

50

で組み合わせることによって、RGNリボヌクレオチド複合体を組み立てることと、

b) 当該標的DNA配列又は当該標的DNA配列を含む細胞を、組み立てられたRGNリボヌクレオチド複合体と接触させることと、を含み、

1つ以上のガイドRNAが、標的DNA配列にハイブリダイズし、それによって、当該標的DNA配列に結合するように当該RGNポリペプチドを導く、方法。

【0714】

373. 当該方法が、インビトロ、インビボ、又はエクスビボで実行される、実施形態372の方法。

【0715】

374. 当該RGNポリペプチド又は当該ガイドRNAが、検出可能な標識を更に含み、それによって、当該標的DNA配列の検出を可能にする、実施形態372又は373の方法。

【0716】

375. 当該ガイドRNA又は当該RGNポリペプチドが、発現調節因子を更に含み、それによって、当該標的DNA配列の発現の調節を可能にする、実施形態372又は373の方法。

【0717】

376. 当該RGNポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されており、それによって、当該標的DNA配列の修飾を可能にする、実施形態372又は373の方法。

【0718】

377. 当該プライム編集ポリペプチドが、DNAポリメラーゼを含む、実施形態376の方法。

【0719】

378. 当該プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態376の方法。

【0720】

379. 当該RGNポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されており、それによって、当該標的DNA配列の修飾を可能にする、実施形態372又は373の方法。

【0721】

380. 当該塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼを含む、実施形態379の方法。

【0722】

381. 当該デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態380の方法。

【0723】

382. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態380の方法。

【0724】

383. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と100%の配列同一性を有する、実施形態380の方法。

【0725】

384. 当該RGNポリペプチドが、当該標的DNA配列を切断することができ、それによって、当該標的DNA配列の切断及び／又は修飾を可能にする、実施形態372又は373の方法。

【0726】

385. DNA分子の標的DNA配列を切断及び／又は修飾するための方法であって、

a) RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチドであって、当該RGNが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)ポリペプチド、及び

10

20

30

40

50

b) (a) の R G N を標的 D N A 配列に標的化することが可能な 1 つ以上のガイド R N A と、D N A 分子を接触させることを含み、

1 つ以上のガイド R N A が、標的 D N A 配列にハイブリダイズし、それによって、当該標的 D N A 配列に結合するように当該 R G N ポリペプチドを導き、当該標的 D N A 配列の切断及び／又は修飾が生じる、方法。

【0727】

386. 当該 R G N ポリペプチドによる切断が、二本鎖切断を生成する、実施形態 385 の方法。

【0728】

387. 当該 R G N ポリペプチドによる切断が、一本鎖切断を生成する、実施形態 385 の方法。

【0729】

388. 当該 R G N ポリペプチドが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニッカーゼである、実施形態 385 の方法。

【0730】

389. 当該 R G N ポリペプチドが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されており、それによって、当該標的 D N A 配列の修飾を可能にする、実施形態 385、387 及び 388 のうちのいずれか 1 つの方法。

【0731】

390. 当該プライム編集ポリペプチドが、D N A ポリメラーゼを含む、実施形態 389 の方法。

【0732】

391. 当該プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態 389 の方法。

【0733】

392. 当該 R G N ポリペプチドが、塩基編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態 385～388 のうちのいずれか 1 つの方法。

【0734】

393. 塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、実施形態 392 の方法。

【0735】

394. デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態 392 の方法。

【0736】

395. デアミナーゼが、配列番号 377～448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する、実施形態 393 の方法。

【0737】

396. デアミナーゼが、配列番号 377～448 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列と 100% の配列同一性を有する、実施形態 393 の方法。

【0738】

397. 修飾された当該標的 D N A 配列が、異種 D N A の標的 D N A 配列への挿入を含む、実施形態 385 の方法。

【0739】

398. 修飾された当該標的 D N A 配列が、標的 D N A 配列からの少なくとも 1 つのヌクレオチドの欠失を含む、実施形態 385 の方法。

【0740】

399. 修飾された当該標的 D N A 配列が、標的 D N A 配列における少なくとも 1 つのヌクレオチドの変異を含む、実施形態 385 の方法。

【0741】

400. 当該標的 D N A 配列が、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) に隣接して位置する、実施形態 372～399 のうちのいずれか 1 つの方法。

10

20

30

40

50

【0742】

401. 当該PAMが、配列番号78又は465として示される配列を有する、実施形態400の方法。

【0743】

402. 当該標的DNA配列が、真核生物標的DNA配列である、実施形態372～401のうちのいずれか1つの方法。

【0744】

403. 当該gRNAが、シングルガイドRNA (sgRNA) である、実施形態372～402のうちのいずれか1つの方法。

【0745】

404. 当該sgRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む、実施形態403の方法。

【0746】

405. 当該gRNAが、デュアルガイドRNAである、実施形態372～403のうちのいずれか1つの方法。

【0747】

406. 当該RGNが、配列番号6と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態372～405のうちのいずれか1つの方法。

【0748】

407. 当該RGNが、配列番号6と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態372～405のうちのいずれか1つの方法。

【0749】

408. 当該RGNが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、実施形態372～405のうちのいずれか1つの方法。

【0750】

409. 当該RGNが、配列番号6と少なくとも95%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号18と少なくとも95%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号30と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、実施形態372～405のうちのいずれか1つの方法。

【0751】

410. 当該RGNが、配列番号6と100%の配列同一性を有し、当該ガイドRNAが、配列番号18と100%の配列同一性を有するcrRNA反復配列と、配列番号30と100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含む、実施形態372～405のうちのいずれか1つの方法。

【0752】

411. 標的DNA配列が、細胞内にある、実施形態365～183のうちのいずれか1つの方法。

【0753】

412. RGNポリペプチドが発現され、標的DNA配列を切断及び修飾して、修飾された標的DNA配列を含むDNA分子を産生する条件下で細胞を培養することと、当該修飾された標的DNA配列を含む細胞を選択することと、を更に含む、実施形態411の方法。

【0754】

413. 実施形態412の方法による修飾された標的DNA配列を含む、細胞。

【0755】

414. 実施形態413の細胞と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【0756】

10

20

30

40

50

415. 遺伝性疾患の原因となる変異における補正を伴う遺伝子修飾細胞を産生するための方法であって、方法が、細胞に、

a) RNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドであって、RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、又は当該RGNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、RGNポリペプチドをコードする当該ポリヌクレオチドが、細胞におけるRGNポリペプチドの発現を可能にするプロモーターに作動可能に連結されている、RNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチド、及び

b) ガイドRNA (gRNA) 又は当該gRNAをコードするポリヌクレオチドであって、gRNAをコードする当該ポリヌクレオチドが、プロモーターに作動可能に連結されて、細胞におけるgRNAの発現を可能にする、ガイドRNA (gRNA) 又はポリヌクレオチドを導入することを含み、

それにより、RGN及びgRNAが、原因となる変異のゲノム位置を標的とし、原因となる変異を除去するようにゲノム配列を修飾する、方法。

【0757】

416. RGNが、ヌクレアーゼ不活性であるか、又はニックアーゼである、実施形態415の方法。

【0758】

417. RGNが、プライム編集ポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態415又は416の方法。

【0759】

418. プライム編集ポリペプチドが、DNAポリメラーゼを含む、実施形態417の方法。

【0760】

419. プライム編集ポリペプチドが、逆転写酵素を含む、実施形態417の方法。

【0761】

420. 当該gRNAが、プライム編集のための編集テンプレートを含む伸長を含む、実施形態417～419のうちのいずれか1つの方法。

【0762】

421. RGNが、塩基編集活性を有するポリペプチドに作動可能に連結されている、実施形態415又は416の方法。

【0763】

422. 塩基編集ポリペプチドが、デアミナーゼである、実施形態421の方法。

【0764】

423. 塩基編集活性を有するポリペプチドが、シトシンデアミナーゼ又はアデニンデアミナーゼである、実施形態422の方法。

【0765】

424. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、実施形態422の方法。

【0766】

425. デアミナーゼが、配列番号377～448のうちのいずれか1つのアミノ酸配列と100%の配列同一性を有する、実施形態422の方法。

【0767】

426. 遺伝性疾患が、一塩基多型によって引き起こされる、実施形態415～425のうちのいずれか1つの方法。

【0768】

427. gRNAが、原因となる一塩基多型に近接する領域を標的とするスペーサー配列を更に含む、実施形態426の方法。

【0769】

428. 原因となる変異における欠失を伴う遺伝子修飾細胞を産生するための方法であ

10

20

30

40

50

って、方法が、細胞に、

a) RNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチドであって、RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、又は当該RGNポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、RGNポリペプチドをコードする当該ポリヌクレオチドが、細胞におけるRGNポリペプチドの発現を可能にするプロモーターに作動可能に連結されている、RNA誘導型ヌクレアーゼ (RGN) ポリペプチド、

b) 第1のガイドRNA (gRNA) 又は当該gRNAをコードするポリヌクレオチドであって、gRNAをコードする当該ポリヌクレオチドが、プロモーターに作動可能に連結されて、細胞におけるgRNAの発現を可能にし、更に、gRNAが、原因となる変異の5'隣接部を標的とするスパーサー配列を含む、第1のガイドRNA (gRNA) 又はポリヌクレオチド、及び

c) 第2のガイドRNA (gRNA) 又は当該gRNAをコードするポリヌクレオチドであって、gRNAをコードする当該ポリヌクレオチドが、プロモーターに作動可能に連結されて、細胞におけるgRNAの発現を可能にし、更に、当該第2のgRNAが、原因となる変異の3'隣接部を標的とするスパーサー配列を含む、第2のガイドRNA (gRNA) 又はポリヌクレオチドを導入することを含み、

それにより、RGN及び2つのgRNAが、原因となる変異を標的とし、原因となる変異の少なくとも一部が除去される、方法。

【0770】

429. 第1のgRNAが、原因となる変異内又は原因となる変異に近接する領域を標的とするスパーサー配列を更に含む、実施形態428の方法。

【0771】

430. 第2のgRNAが、原因となる変異内又はそれに近接する領域を標的とするスパーサー配列を更に含む、実施形態429の方法。

【0772】

431. 当該RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも95%の配列同一性を有する、実施形態415～430のうちのいずれか1つの方法。

【0773】

432. 当該RGNポリペプチドが、配列番号6と100%の配列同一性を有する、実施形態415～430のうちのいずれか1つの方法。

【0774】

433. 当該gRNA、当該第1のgRNA、当該第2のgRNA、又は当該第1のgRNA及び当該第2のgRNAが、配列番号18と少なくとも90%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30と少なくとも90%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含み、当該RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、実施形態415～430のうちのいずれか1つの方法。

【0775】

434. 当該gRNA、当該第1のgRNA、当該第2のgRNA、又は当該第1のgRNA及び当該第2のgRNAが、配列番号18と少なくとも95%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30と少なくとも95%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含み、当該RGNポリペプチドが、配列番号6と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、実施形態415～430のうちのいずれか1つの方法。

【0776】

435. 当該gRNA、当該第1のgRNA、当該第2のgRNA、又は当該第1のgRNA及び当該第2のgRNAが、配列番号18と100%の配列同一性を有するCRISPR反復配列と、配列番号30に対して100%の配列同一性を有するtracrRNAと、を含み、当該RGNポリペプチドが、配列番号6と100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、実施形態415～430のうちのいずれか1つの方法。

10

20

30

40

50

【0777】

436. 疾患、障害、又は状態を治療する方法であって、当該方法が、疾患、障害、又は状態の治療を必要とする対象に、有効量の実施形態362～364及び414のうちのいずれか1つの薬学的組成物を投与することを含む、方法。

【0778】

437. 当該疾患が、原因となる変異と関連し、当該有効量の当該薬学的組成物が、当該原因となる変異を修正する、実施形態436の方法。

【0779】

438. 当該対象が、当該疾患、障害、又は状態を発症するリスクを有する、実施形態436又は437の方法。

【0780】

439. 疾患、障害、又は状態の治療を必要とする対象において、疾患、障害、又は状態を治療するための、実施形態277～296のうちのいずれか1つの核酸分子、実施形態297～304のうちのいずれか1つのベクター、実施形態305若しくは361の細胞、実施形態306～324のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド、実施形態325～327のうちのいずれか1つのRNP複合体、又は実施形態328～360のうちのいずれか1つの系の、使用。

【0781】

440. 当該疾患、障害、又は状態が、原因となる変異と関連し、当該治療することが、当該原因となる変異を修正することを含む、実施形態439の使用。

【0782】

441. 当該対象が、当該疾患、障害、又は状態を発症するリスクを有する、実施形態439又は440の使用。

【0783】

442. 疾患、障害、又は状態を治療するのに有用な医薬の製造のための、実施形態277～296のうちのいずれか1つの核酸分子、実施形態297～304のうちのいずれか1つのベクター、実施形態305若しくは361の細胞、実施形態306～324のうちのいずれか1つのRGNポリペプチド、実施形態325～327のうちのいずれか1つのRNP複合体、又は実施形態328～360のうちのいずれか1つの系の、使用。

【0784】

443. 当該疾患が、原因となる変異と関連し、有効量の当該医薬が、当該原因となる変異を修正する、実施形態442の使用。

【0785】

以下の実施例は、限定ではなく、例示として提供される。

【実施例】

【0786】

実施例1. RNA誘導型ヌクレアーゼの同定

12個の異なるCRISPR関連RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)を同定し、以下の表1に記載する。表1は、各RGNの名称、そのアミノ酸配列、それが由来する源、並びに処理されたcrRNA及びtracrRNA配列を提供する(同定方法については実施例2を参照されたい)。表1は、更に、一般的なシングルガイドRNA(sgRNA)配列を提供し、poly-Nは、sgRNAの核酸標的配列を決定するスペーサー配列の位置を示す。RGN系LPG10134及びLPG10141の場合、tracrRNAのヘアピンステムの塩基における保存された配列は、CNANNA(配列番号322)である。LPG10136、LPG10138、及びLPG10139の場合、同じ位置の配列は、UNANNG(配列番号321)である。RGN系LPG10145の場合、tracrRNAのヘアピンステムの塩基における保存された配列は、UNANNC(配列番号318)である。LPG10146、LPG10147、LPG10150、LPG10155、LPG10159及びLPG10160について、同じ位置の配列は、UNANNA(配列番号319)である。

10

20

30

40

50

【0787】

【表1】

表1：配列ID及びCRISPR関連系の概要

RGN ID	配列番号	供給源	crRNA 反復配 列(配 列番号)	tracrRNA (配列 番号)	sgRNA骨 格(配列 番号)
LPG10134	1	Brevundimonas vesicularis	13	25	37
LPG10136	2	Bacillus_I endophyticus	14	26	38
LPG10138	3	Bacillus_C megaterium	15	27	39
LPG10139	4	Bacillus_C megaterium	16	28	40
LPG10141	5	Bosea thiooxidans	17	29	41
LPG10145	6	不明	18	30	42
LPG10146	7	Bifidobacterium thermacidophilum	19	31	43
LPG10147	8	不明	20	32	44
LPG10150	9	不明	21	33	45
LPG10155	10	Chryseobacterium geocarposphaerae	22	34	46
LPG10159	11	汚染/複数	23	35	47
LPG10160	12	Chryseobacterium ureilyticum	24	36	48

【0788】

実施例2：ガイドRNA同定及びsgRNA構築

ガイドRNAを、ゲノムCRISPR遺伝子座にコードされるtracrRNA及びcrRNAの同定によって決定した。検証及び予測されたtracrRNAの内部データベースを使用して、推定RNAを決定した。相同性に基づくtracrRNAが同定できなかった場合、tracrRNAの反復防止部分は、Briner, Cold Spring Harb Protoc 7:pbid.p086785(2016)で決定されたプロトコルに従って、コンセンサスCRISPR反復を使用して、許容BLASTnパラメータを使用して同定した。RNAの手動キュレーションは、RNAフォールディングソフトウェアであるRNAfoldによる二次構造予測を使用して実行した。sgRNAカセットは、DNA合成によって調製し、一般に以下のように設計した(5'->3')：crRNAの処理された反復部分にその3'末端で作動可能に連結され、4bpの非相補的リンカー(AAAG；配列番号323)に作動可能に連結され、その3'末端で処理されたtracrRNAに作動可能に連結される、20~30bpのスペーサー配列。他の4bp非相補的リンカーも使用してもよい。

【0789】

インビトロアッセイについて、sgRNAを、GeneArt(商標)Precisi

on gRNA Synthesis Kit (ThermoFisher) を用いた s gRNA カセットのインビトロ転写によって合成した。RGN ポリペプチドの各々について処理された crRNA 及び tracrRNA 配列を同定し、表 1 に記載する。PAM ライブラリ 1 及び 2 のために構築された s gRNA については、実施例 3 を参照されたい。
【0790】

実施例 3：各 RGN の PAM 要件の決定

各 RGN の PAM 要件は、本質的に Karvelis et al. (2015) Genome Biol 253 から適合させたインビトロ翻訳 PAM 決定アッセイを使用し
て決定した。簡潔に述べると、2 つのプラスミドライブラリ (L1 及び L2) を pUC1
8 骨格 (ampR) 内で生成し、各々が、8 つのランダムヌクレオチド (すなわち、PAM
領域) に隣接する別個の 30 bp プロトスペーサー (標的) 配列を含有した。各 RGN
についてのライブラリ 1 及びライブラリ 2 の標的配列及び隣接 PAM 領域を表 2 に示す。
【0791】

簡潔に述べると、タンパク質を、T7 プロモーター駆動の細菌発現プラスミドから開始
する PURExpress In Vitro Protein Synthesis キット (New England Biolabs) を使用してインビトロで翻訳した。
【0792】

適切な s gRNA の存在下で、RGN によって認識可能な PAM を含有するプラスミド
が切断される。アダプターを、NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs) を使用して切断さ
れた DNA にライゲーションし、クリーンアップ後、生成物を、ライゲーションされたア
ダプター及びプラスミド骨格配列に相補的なプライマーを使用して PCR 増幅して、濃縮
された PAM 配列が増幅子に含まれるようにした。ディープシーケンシング (75 bp 単
一エンドリード) は、サービスプロバイダ (MoGene, St. Louis, MO) に
よって MiSeq (Illumina) 上で実行した。典型的には、増幅子当たり 50 万
リードが得られた。PAM 領域を抽出し、計数し、各試料の全リードに正規化した。プ
ラスミド切断をもたらした PAM は、対照と比較したときに濃縮されることによって同定さ
れた (すなわち、ライブラリ中の PAM の開始頻度)。新規 RGN の PAM 要件を表すた
めに、問題の領域内の全ての配列の枯渇比 (試料中の頻度 / 対照中の頻度) を、 $-\log$
塩基 2 変換を用いて濃縮値に変換した。十分な PAM は、濃縮値が 3.5 を超えるもの
として定義した。両方のライブラリでこのしきい値を超える PAM を収集し、Web ログを
生成するために使用した。Web ログは、例えば、「web logo」として知られるイ
ンターネット上の Web ベースのサービスを使用して生成することができる。PAM 配列
を同定し、上位濃縮 PAM に一貫したパターンがあった場合に報告した。各々の RGN
についてのコンセンサス PAM (3.5 を超える濃縮係数 (EF) を有する) を表 2 に示す
。表 2 には、PAM の配向も示されている。

【0793】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2：PAM又はPAM様の決定

RGN ID	sgRNA L1 (配列番号)	sgRNA L2 (配列番号)	PAM (配列番号)	PAM配向
LPG10134	49	61	73	5' -標的-PAM-3'
LPG10136	50	62	74	5' -標的-PAM-3'
LPG10138	51	63	75	5' -標的-PAM-3'
LPG10139	52	64	76	5' -標的-PAM-3'
LPG10141	53	65	77	5' -標的-PAM-3'
LPG10145	54	66	78	5' -標的-PAM-3'
LPG10146	55	67	79	5' -標的-PAM-3'
LPG10147	56	68	80	5' -標的-PAM-3'
LPG10150	57	69	81	5' -標的-PAM-3'
LPG10155	58	70	82	5' -標的-PAM-3'
LPG10159	59	71	83	5' -標的-PAM-3'
LPG10160	60	72	84	5' -標的-PAM-3'

10

【0794】

20

実施例 4：哺乳動物細胞における遺伝子編集活性の実証

RGN 発現カセットを作製し、哺乳動物発現のためにベクターに導入した。各 RGN は、ヒト発現のためにコドン最適化され、5' 末端で、SV40 核局在化配列 (NLS；配列番号 316) 及び 3 つの FLAG タグ (配列番号 326) に作動可能に融合され、3' 末端で、ヌクレオプラスミン NLS 配列 (配列番号 317) に作動可能に融合された。各発現カセットは、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (配列番号 327) の制御下にあった。CMV 転写エンハンサー (配列番号 328) もまた、CMV プロモーターを含む構築物に含まれることが当該技術分野で知られている。各々がヒト RNA ポリメラーゼ III U6 プロモーター (配列番号 329) の制御下にある、単一の gRNA をコードするガイド RNA 発現構築物を産生し、pTwist High Copy Amp ベクターに導入した。各ガイドの標的配列の配列を表 3 に示す。

30

【0795】

上述の構築物のいくつかを哺乳動物細胞に導入した。トランスフェクションの 1 日前に、 1×10^5 個の HEK293T 細胞 (Sigma) を、Dulbecco 改変イーグル培地 (DMEM) + 10% (体積/体積) のウシ胎仔血清 (Gibco) 及び 1% のペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco) 中の 24 ウェルディッシュに配置した。翌日、細胞が 50~60% のコンフルエンスであったとき、500 ng の RGN 発現プラスミドと 500 ng の単一 gRNA 発現プラスミドを、製造業者の指示に従って、1 ウェル当たり 1.5 μ L の Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific) を使用して共トランスフェクトした。48 時間の増殖後、製造業者の指示に従ってゲノム DNA 単離キット (Machery-Nagel) を使用して全ゲノム DNA を回収した。

40

【0796】

次いで、全ゲノム DNA を分析して、各ゲノム標的についての各 RGN についての編集率を測定した。第一に、PCR 増幅及び増幅されたゲノム標的部位のその後の分析に使用されるオリゴヌクレオチドを産生した。

【0797】

全ての PCR 反応は、0.5 μ M の各プライマーを含む 20 μ L の反応において、10 μ L の 2X Master Mix Phusion High-Fidelity DNA ポリメラーゼ (Thermo Scientific) を使用して実行した。各標的

50

遺伝子を包含する大きなゲノム領域を、以下のプログラムを使用して、P C R # 1 プライマーを使用して最初に増幅した：98 ° C、1 分；[98 ° C、10 秒；62 ° C、15 秒；72 ° C、5 分] を30 サイクル；72 ° C、5 分；12 ° C、永久。次いで、以下のプログラムを使用して、このP C R 反応の1 マイクロリットルを、各ガイドに特異的なプライマー（P C R # 2 プライマー）を使用して更に増幅した：98 ° C、1 分；[98 ° C、10 秒；67 ° C、15 秒；72 ° C、30 秒] を35 サイクル；72 ° C、5 分；12 ° C、永久。P C R # 2 のプライマーには、I l l u m i n a 配列決定のための N e x t e r a R e a d 1 及び R e a d 2 トランスポザーゼアダプターオーバーハン

グ配列が含まれる。

【0798】

10

ヒトゲノムにおける多数の異なる遺伝子を、R N A 誘導型切断のために標的化した。これらの遺伝子座を、以下の表3に示す。

【0799】

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3 : 哺乳動物細胞における遺伝子編集活性を試験するために使用されるガイドRNAのための標的及び
sgRNA配列

RGN ID	遺伝子	ガイドID	標的配列 (配列番号)
LPG10134	B2M	SGN002644	554
LPG10134	B2M	SGN002645	555
LPG10134	B2M	SGN002646	556
LPG10134	B2M	SGN002647	557
LPG10134	B2M	SGN002648	558
LPG10134	TRAC	SGN002649	559
LPG10134	TRAC	SGN002650	560
LPG10134	TRAC	SGN002651	561
LPG10134	TRAC	SGN002652	562
LPG10134	TRAC	SGN002653	563
LPG10136	B2M	SGN002654	564
LPG10136	B2M	SGN002655	565
LPG10136	B2M	SGN002656	566
LPG10136	B2M	SGN002657	567
LPG10136	B2M	SGN002658	568
LPG10136	TRAC	SGN002659	569
LPG10136	TRAC	SGN002660	570
LPG10136	TRAC	SGN002661	571
LPG10136	TRAC	SGN002662	572
LPG10136	TRAC	SGN002663	573
LPG10138	B2M	SGN002664	574
LPG10138	B2M	SGN002665	575
LPG10138	B2M	SGN002666	576
LPG10138	B2M	SGN002667	577
LPG10138	B2M	SGN002668	578
LPG10138	TRAC	SGN002669	579
LPG10138	TRAC	SGN002670	580
LPG10138	TRAC	SGN002671	581
LPG10138	TRAC	SGN002672	582
LPG10138	TRAC	SGN002673	583
LPG10139	B2M	SGN002674	584
LPG10139	B2M	SGN002675	585
LPG10139	B2M	SGN002676	586
LPG10139	B2M	SGN002677	587
LPG10139	B2M	SGN002678	588

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

RGN ID	遺伝子	ガイドID	標的配列(配列番号)
LPG10139	TRAC	SGN002679	589
LPG10139	TRAC	SGN002680	590
LPG10139	TRAC	SGN002681	591
LPG10139	TRAC	SGN002682	592
LPG10139	TRAC	SGN002683	593
LPG10141	B2M	SGN002684	594
LPG10141	B2M	SGN002685	595
LPG10141	B2M	SGN002686	596
LPG10141	B2M	SGN002687	597
LPG10141	B2M	SGN002688	598
LPG10141	TRAC	SGN002689	599
LPG10141	TRAC	SGN002690	600
LPG10141	TRAC	SGN002691	601
LPG10141	TRAC	SGN002692	602
LPG10141	TRAC	SGN002693	603
LPG10145	B2M	SGN002698	604
LPG10145	B2M	SGN002699	605
LPG10145	B2M	SGN002700	606
LPG10145	B2M	SGN002701	607
LPG10145	B2M	SGN002702	608
LPG10145	TRAC	SGN002703	609
LPG10145	TRAC	SGN002704	610
LPG10145	TRAC	SGN002705	611
LPG10145	TRAC	SGN002706	612
LPG10145	TRAC	SGN002707	613
LPG10146	B2M	SGN002708	614
LPG10146	B2M	SGN002709	615
LPG10146	B2M	SGN002710	616
LPG10146	B2M	SGN002711	617
LPG10146	B2M	SGN002712	618
LPG10146	TRAC	SGN002713	619
LPG10146	TRAC	SGN002714	620
LPG10146	TRAC	SGN002715	621
LPG10146	TRAC	SGN002716	622
LPG10146	TRAC	SGN002717	623
LPG10147	B2M	SGN002718	624
LPG10147	B2M	SGN002719	625
LPG10147	TRAC	SGN002720	626
LPG10147	TRAC	SGN002721	627
LPG10147	TRAC	SGN002722	628
LPG10147	TRAC	SGN002723	629

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

RGN ID	遺伝子	ガイドID	標的配列 (配列番号)
LPG10150	B2M	SGN002724	630
LPG10150	B2M	SGN002725	631
LPG10150	B2M	SGN002726	632
LPG10150	B2M	SGN002727	633
LPG10150	B2M	SGN002728	634
LPG10150	TRAC	SGN002729	635
LPG10150	TRAC	SGN002730	636
LPG10150	TRAC	SGN002731	637
LPG10150	TRAC	SGN002732	638
LPG10150	TRAC	SGN002733	639
LPG10155	B2M	SGN002734	640
LPG10155	B2M	SGN002735	641
LPG10155	TRAC	SGN002736	642
LPG10155	TRAC	SGN002737	643
LPG10155	TRAC	SGN002738	644
LPG10155	TRAC	SGN002739	645
LPG10159	B2M	SGN002740	646
LPG10159	B2M	SGN002741	647
LPG10159	B2M	SGN002742	648
LPG10159	B2M	SGN002743	649
LPG10159	B2M	SGN002744	650
LPG10159	TRAC	SGN002745	651
LPG10159	TRAC	SGN002746	652
LPG10159	TRAC	SGN002747	653
LPG10159	TRAC	SGN002748	654
LPG10159	TRAC	SGN002749	655
LPG10160	B2M	SGN002750	656
LPG10160	B2M	SGN002751	657
LPG10160	B2M	SGN002752	658
LPG10160	B2M	SGN002753	659
LPG10160	B2M	SGN002754	660
LPG10160	TRAC	SGN002755	661
LPG10160	TRAC	SGN002756	662
LPG10160	TRAC	SGN002757	663
LPG10160	TRAC	SGN002758	664
LPG10160	TRAC	SGN002759	665

【0800】

精製ゲノムDNAを、上記のようにPCR#1及びPCR#2に供した。第2のPCR増幅後、DNAを、製造業者の指示に従ってPCRクリーンアップキット（Zymo）を使用してクリーニングし、水中で溶出した。200～500 ngの精製PCR#2生成物を、20 µLの反応中の2 µLの10×NEB緩衝液2及び水と組み合わせ、以下のプログラムを使用してアニールしてヘテロ二重鎖DNAを形成した：95℃、5分；95～85℃、2℃／秒の速度で冷却；85～25℃、0.1℃／秒の速度で冷却；12℃、永久。アニーリング後、5 µLのDNAを酵素なし対照として除去し、1 µLのT7エンドヌクレアーゼI（NEB）を添加し、反応物を37℃で1時間インキュベートした。インキ

ュベーション後、5倍のFlashGelローディング染料(Lonza)を添加し、各反応及び対照の5 μ Lを、ゲル電気泳動を使用して2.2%のアガロースフラッシュゲル(Lonza)によって分析した。ゲルの視覚化に続いて、非相同末端結合(NHEJ)の割合は、以下の方程式を使用して決定した： $\%NHEJ \text{ 事象} = 100 \times [1 - (1 - \text{切断率}) (1/2)]$ 。式中、(切断率)は次のように定義される：(消化された生成物の密度) / (消化された生成物の密度 + 未消化の親バンド)。

【0801】

いくつかの試料について、哺乳動物細胞における発現後の結果を分析するためにSURVEYOR(登録商標)を使用した。細胞を、ゲノムDNA抽出前に、トランスフェクション後72時間、37℃でインキュベートした。ゲノムDNAを、製造業者のプロトコルに従ってQuickExtract DNA Extraction Solution(Epicentre)を使用して抽出した。RGN標的部に隣接するゲノム領域をPCR増幅し、製造業者のプロトコルに従ってQiaQuick Spin Column(Qiagen)を使用して生成物を精製した。合計200~500ngの精製PCR生成物を、1 μ Lの10 $\times$ Taq DNAポリメラーゼPCR緩衝液(Enzymatics)及び超高純度水と混合して、最終体積を10 μ Lにし、再アニールプロセスに供して、ヘテロ二重鎖の形成を可能にした：95℃で10分間、95℃~85℃(-2℃/秒で上昇)、85℃~25℃で-0.25℃/秒、及び25℃で1分間保持。

【0802】

再アニーリングの後、生成物を製造者の推奨プロトコルに従って、SURVEYOR(登録商標)ヌクレアーゼ及びSURVEYOR(登録商標)エンハンサーS(Integrated DNA Technologies)で処理し、4~20%のNovex TBEポリアクリルアミドゲル(Life Technologies)で分析した。ゲルをSYBR Gold DNA染色(Life Technologies)で10分間染色し、ゲルDOCゲルイメージング系(Bio-rad)で撮像した。定量化は、相対バンド強度に基づいた。Indelパーセンテージは、式 $100 \times (1 - (1 - (b + c) / (a + b + c)) (1/2))$ によって決定した。式中、aは、未消化のPCR産物の統合強度であり、b及びcは、各切断産物の統合強度である。

【0803】

加えて、Illuminaオーバーハング配列を含有するPCR#2由来の生成物は、Illumina 16S Metagenomic Sequencing Libraryプロトコルに従ってライブラリ調製を受けた。ディープシーケンシングは、サービスピロバイダ(MOGene)によってIllumina Mi-Seqプラットフォーム上で実行した。典型的には、250bpの対末端リード(2 $\times$ 10万リード)のうちの200,000個は、増幅子ごとに生成される。リードをCRISPResso(Pinello, et al. 2016 Nature Biotech, 34:695-697)を使用して分析して、編集率を計算した。出力アラインメントは、挿入部位及び欠失部位を確認するために、並びに組換え部位でマイクロホモロジー部位を同定するために手作業でキュレーションした。編集率を表4に示す。全ての実験は、ヒト細胞内で実行した。

「標的配列」は、遺伝子標的内の標的配列である。各標的配列について、ガイドRNAは、使用されるRGNに応じて、相補的RNA標的配列及び適切なsgRNAを含む。ガイドRNAによる実験の選択された内訳を表5.1及び5.2に示し、図1に示す。

【0804】

10

20

30

40

【表 4 - 1】

表 4 : プラスミド送達による編集率

RGN	SGN	Rep1	Rep2	Rep3
LPG10134	SGN002644	0	0.06	1.76
LPG10134	SGN002645	0	0	1.43
LPG10134	SGN002646	0	0	0.04
LPG10134	SGN002647	0	0	0
LPG10134	SGN002648	0	0	2.15
LPG10134	SGN002649	0	0	0
LPG10134	SGN002650	0	0	0
LPG10134	SGN002651	0	0	0
LPG10134	SGN002652	0	0	0
LPG10134	SGN002653	0	0	0
LPG10136	SGN002654	5.74	3.57	8
LPG10136	SGN002655	5.18	5.36	6.86
LPG10136	SGN002656	3.4	2.06	5.7
LPG10136	SGN002657	4.14	3.01	6.77
LPG10136	SGN002658	0.05	0	0
LPG10136	SGN002659	0.33	0.15	0.87
LPG10136	SGN002660	1.89	0.82	4.38
LPG10136	SGN002661	3.56	3.81	4.82
LPG10136	SGN002662	2.53	1.9	3.99
LPG10136	SGN002663	0.51	0.33	0.67
LPG10138	SGN002664	0.47	0.46	2.75
LPG10138	SGN002665	0.92	3.79	4.84
LPG10138	SGN002666	0.12	0.22	0.88
LPG10138	SGN002667	0.91	3.13	3.18
LPG10138	SGN002668	0	0	0
LPG10138	SGN002669	0.14	0.42	1.92
LPG10138	SGN002670	0	0	0.14
LPG10138	SGN002671	2.54	2.56	3.21
LPG10138	SGN002672	0.1	1.11	0.79
LPG10138	SGN002673	0	0	0.87
LPG10139	SGN002674	0.27	0.56	2.97
LPG10139	SGN002675	3.95	3.92	5.99
LPG10139	SGN002676	0	0.12	1.36
LPG10139	SGN002677	0.88	0.24	3.27
LPG10139	SGN002678	0	0	0
LPG10139	SGN002679	1.68	0.47	3.26
LPG10139	SGN002680	0	0	0.16
LPG10139	SGN002681	3.53	4.09	7.03
LPG10139	SGN002682	0.94	0.51	3.32
LPG10139	SGN002683	0.35	0.44	0.93

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

RGN	SGN	Rep1	Rep2	Rep3
LPG10141	SGN002684	0	0	0.3
LPG10141	SGN002685	0	0	0.43
LPG10141	SGN002686	0	0	0.14
LPG10141	SGN002687	0	0	2.1
LPG10141	SGN002688	0	0	0
LPG10141	SGN002689	0	0	0
LPG10141	SGN002690	0	0	0
LPG10141	SGN002691	0	0	0
LPG10141	SGN002692	0	0	0
LPG10141	SGN002693	0	0	0
LPG10145	SGN002698	9.25	9.03	13.74
LPG10145	SGN002699	3.19	4.3	6.29
LPG10145	SGN002700	1.43	0.31	4.26
LPG10145	SGN002701	3.9	5.07	6.85
LPG10145	SGN002702	9.87	4.92	11.76
LPG10145	SGN002703	0.08	0.07	0.61
LPG10145	SGN002704	3.04	1.09	4.83
LPG10145	SGN002705	0	0	0
LPG10145	SGN002706	4.36	1.96	4.7
LPG10145	SGN002707	8.54	8.09	7.36
LPG10146	SGN002708	0.85	0	1.09
LPG10146	SGN002709	0	0	0.19
LPG10146	SGN002710	0.29	1.08	1.09
LPG10146	SGN002711	0	0	0.71
LPG10146	SGN002712	2.42	1.57	3.01
LPG10146	SGN002713	0	0	0
LPG10146	SGN002714	0	0	0
LPG10146	SGN002715	0	0	0
LPG10146	SGN002716	0	0	0
LPG10146	SGN002717	0	0	0
LPG10147	SGN002718	0	0	0
LPG10147	SGN002719	0	0	0
LPG10147	SGN002720	0	0	0
LPG10147	SGN002721	0	0	0
LPG10147	SGN002722	0	0	0
LPG10147	SGN002723	0	0	0
LPG10150	SGN002724	2.15	3.12	1.25
LPG10150	SGN002725	1.29	1.1	0.28
LPG10150	SGN002726	0.05	0	0
LPG10150	SGN002727	0.03	0	0
LPG10150	SGN002728	0.06	0.1	0
LPG10150	SGN002729	0	0	0
LPG10150	SGN002730	0	0	0
LPG10150	SGN002731	0.08	0.2	0

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

RGN	SGN	Rep1	Rep2	Rep3
LPG10150	SGN002732	0	0	0
LPG10150	SGN002733	0.72	0.17	0.09
LPG10155	SGN002734	0	0	0
LPG10155	SGN002735	0	0.15	0
LPG10155	SGN002735	0.42	0	0
LPG10155	SGN002736	0	0	0
LPG10155	SGN002737	0	0	0
LPG10155	SGN002738	0	0	0
LPG10159	SGN002738	0	0	0
LPG10159	SGN002739	0	0	0
LPG10159	SGN002740	0	0	0
LPG10159	SGN002741	0	0	0
LPG10159	SGN002742	0	0	0
LPG10159	SGN002744	0	0	0
LPG10159	SGN002745	0	0	0
LPG10159	SGN002747		0	0
LPG10159	SGN002748	0	0	0
LPG10159	SGN002749	0	0	0
LPG10160	SGN002750	0	0	0
LPG10160	SGN002751	0	0	0
LPG10160	SGN002752	0	0	0
LPG10160	SGN002753	0	0	0
LPG10160	SGN002754	0	0	0
LPG10160	SGN002755	0	0	0
LPG10160	SGN002756	0	0	0
LPG10160	SGN002757	0	0	0
LPG10160	SGN002758	0	0	0
LPG10160	SGN002759	0	0	0

10

20

30

40

50

【0805】

LPG10136は、3つの別々の実験において、10のガイドにわたって約3.01%の平均編集率を示した。LPG10145は、3つの独立した編集実験において、10のガイドにわたって約4.63%の平均編集率を示し、3つのガイドが約10%を編集した。LPG10138、LPG10139、LPG10141、LPG10146、及びLPG10150はまた、これらのヌクレアーゼが哺乳動物細胞において活性であることを実証する少なくとも1つのガイドRNAとのアンプリコン配列決定によるインデル形成を示した。

【0806】

【表 5 - 1】

表 5. 1 : LPG10136 の INDEL 形成の例

リード#	編集配列	カテゴリ	サイズ	INDEL位置	リード %	INDELの %
261890	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGG TTACTCAGTCATCCAGCAGAGA	WT	0	0	92.82	0

【表 5 - 2】

リード#	編集配列	カテゴリ	サイズ	INDEL位置	リード %	INDELの %
1935	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT TT----ACGTCATCCAGCAGAGA	欠失	4	3	0.69	9.55
1806	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT TTAC-----TCATCCAGCAGAGA	欠失	5	0	0.64	8.92
929	CTCAGGTA CTCAAAGAT-----T CACGTCATCCAGCAGAGA	欠失	10	5	0.33	4.59
828	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT TTACT-ACGTCATCCAGCAGAGA	欠失	1	3	0.29	4.09
803	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT TTACTCAACGTCATCCAGCAGAG	挿入	1	3	0.28	3.96
802	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT TTAC-----TCCAGCAGAGA	欠失	8	-3	0.28	3.96
622	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT TTACT-CGTCATCCAGCAGAGA	欠失	2	2	0.22	3.07
409	CTCAGGTA CTCAAAG-----A CGTCATCCAGCAGAGA	欠失	14	3	0.14	2.02
380	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT TTACTCCACGTCATCCAGCAGAG	挿入	1	4	0.13	1.88
373	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT TTACT-----CAGCAGAGA	欠失	9	-5	0.13	1.84
342	CTCAGGTA CTCAAAGATTC----- -----ACGTCATCCAGCAGAGA	欠失	9	3	0.12	1.69
340	CTCAGGTA CTCAAAG----- ----- -----A	欠失	133	-116	0.12	1.68
335	CTCAGGTA CTCAAAGAT----- -----TCATCCAGCAGAGA	欠失	15	0	0.12	1.65
302	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT TTA-CACGTCATCCAGCAGAGA	欠失	2	4	0.11	1.49
302	CTCAGGTA CTCAAAGAT----- ACGTCATCCAGCAGAGA	欠失	12	3	0.11	1.49
293	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAG----- -----GTCATCCAGCAGAGA	欠失	10	1	0.1	1.45
289	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT TTACTC-CGTCATCCAGCAGAGA	欠失	1	2	0.1	1.43
287	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT T-----ACGTCATCCAGCAGAGA	欠失	5	3	0.1	1.42
277	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT T----- ----- ----- -----T	欠失	168	-160	0.1	1.37
271	CTCAGGTA CTCAAAGATTCAGGT TTA-----ACGTCATCCAGCAGAGA	欠失	3	3	0.1	1.34

全体の編集結果の 0.1% 超を占める編集された対立遺伝子を上に示す。削除は、ダッシュで示される。このガイドの最も頻繁な編集結果は、小さな削除と挿入であった。

【0807】

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 5. 2 : LPG10145 の INDEL 形成の例

リード#	編集配列	カテゴリ	サイズ	INDEL位置	リード %	INDELの %
270438	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGT GCTCGCGCTACTCTCTCTTTC	WT	0	0	85.84	0
8329	ATGTCTCGCTCCGTGG-CTTAGCTGT GCTCGCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	1	2	2.64	18.68
3531	ATGTCTCGCTCCGTGGC-TAGCTGT GCTCGCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	2	3	1.12	7.92
2595	ATGTCTCGCTCCGTG-----GCTGTGC TCGCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	6	1	0.82	5.82
2201	ATGTCTCGCTCCGTGGC-----CTC GCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	10	3	0.7	4.94
1902	ATGTCTCGCTCCGTGGCACTTAGC TGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTT	挿入	1	3	0.6	4.27
1262	ATGTCTCGCTCCGTG-----GCTC GCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	11	1	0.4	2.83
1047	ATGTCTCG-----CTTAGCTGTGCT CGCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	9	-6	0.33	2.35
759	ATGTCTC-----GCTCGCGC TACTCTCTCTTTC	欠失	19	-7	0.24	1.7
730	ATGTCTCGCTCCGTGGC----GCTGT GCTCGCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	4	3	0.23	1.64
654	ATGTCTCGCTCCGTGGC-----CTGTG CTCGCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	5	3	0.21	1.47
639	ATGTCTCGCTCCGTGGC--AGCTGT GCTCGCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	3	3	0.2	1.43
548	ATGTCTCGCTCCGTG-----GC GCTACTCTCTCTTTC	欠失	15	1	0.17	1.23
530	ATGTCTCGCTCCGTGGC-----TGC TCGCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	8	3	0.17	1.19
528	ATGT-----CTCGCGCT ACTCTCTCTTTC	欠失	23	-10	0.17	1.18
519	ATGTCTCGCTCCGTGGC-----GC TCGCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	9	3	0.16	1.16
470	ATGTCTCGCTCCGTGGCTTCTTAG CTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTT	挿入	2	3	0.15	1.05
456	ATGTCTCGCTCCGTGGC-----GTG CTCGCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	7	3	0.14	1.02
431	ATGTCTC-----GCTGTGCTCG CGCTACTCTCTCTTTC	欠失	14	-7	0.14	0.97
410	ATGTCTCGCTCCGTGGC-GAGCT GTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTC	欠失	2	3	0.13	0.92

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

リード#	編集配列	カテゴリ	サイズ	INDEL位置	リード%	INDELの%
391	ATGTCTCGCTCCGTGGCCGTTT CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC GCT	挿入	41	3	0.12	0.88
368	ATGTCTCGCTCCG-----TAGCTGTGCTCGCGCTACTC TC TCTTTC	欠失	6	-1	0.12	0.83
329	ATG----- --- ----- ----- ----- ----- -----T	欠失	137	-11	0.1	0.74
328	ATGTCTCGCTCCGTG-----GCTACTC TCTCTTTC	欠失	17	1	0.1	0.74
310	ATGTCTCGCTCCGTGGC-----CGCGCTACTC TCTCTTTC	欠失	12	3	0.1	0.7
301	ATGTCTCGCTC-----CCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTC TCTCTTTC	欠失	5	-3	0.1	0.67

全体の編集結果の0.1%超を占める編集された対立遺伝子を上に示す。削除は、ダッシュで示される。このガイドの最も頻繁な編集結果は、小さな削除と挿入であった。

【0808】

実施例5：様々な送達形式の試験

RGNが異なる形式で送達することができるかどうかを判定するために、mRNA及びRNPヌクレオフェクション送達を一次T細胞で試験する。精製されたCD3+T細胞又は末梢血単核細胞(PBMC)を解凍し、CD3/CD28ビーズ(ThermoFisher)を使用して3日間活性化し、次いでLonza 4D-Nucleofector Xユニット及びNucleocuvetteストリップを使用してヌクレオフェクションする。P3一次細胞キットは、mRNA及びRNPの両方の送達に使用される。細胞を、それぞれmRNA及びRNP送達のためのEO-115及びEH-115プログラムを使用してトランスフェクトする。細胞を、IL-2、IL-7、及びIL-15(Miltenyi Biotec)を含有するCTS Optimizer T細胞拡張培地(ThermoFisher)でヌクレオフェクション後4日間培養し、その後、Nucleospin TissueゲノムDNA単離キット(Machery Nagel)を使用して収穫する。

【0809】

編集部位を取り巻くアンプリコンを、プライマーを使用したPCRによって生成し、実施例4に記載の方法に従って、2×250bpのペアエンド配列決定を使用してIllumina Nexteraプラットフォームを使用してNGS配列決定に供する。

【0810】

実施例6：疾患標的の同定

World Wide WebのNCBI ClinVarウェブサイトから入手可能なNCBI ClinVarデータベースから臨床変異体のデータベースを取得した。病原性一塩基多型(SNP)をこのリストから同定した。ゲノム遺伝子座情報を使用して、各SNPを重複して取り囲む領域内のCRISPR標的を同定した。原因となる変異(「

CasI Mut.)」を標的とするために本発明のRGNと併せて塩基編集を使用して修正され得るSNPの選択を表6に列挙する。表6では、各疾患の1つのエイリアスのみが列挙されている。「RS#」は、NCBIウェブサイトのSNPデータベースを介したRS受託番号に対応している。AlleleIDは、原因対立遺伝子の受託番号に対応している。表6はまた、各疾患について列挙されるRGNに好適なゲノム標的配列情報を提供する。標的配列情報はまた、本発明の対応するRGNに必要なsgRNAの産生のためのプロトスペーサー配列を提供する。

【0811】

【表7-1】

表6：RGNの疾患標的

疾患	RS#	RGN	CasI Mut.	AlleleID	遺伝子記号	標的(配列番号)
スターガード病1	1800553	LPG10134	G>A	22927	ABCA4	85
スターガード病1	1800553	LPG10136	G>A	22927	ABCA4	86
スターガード病1	1800553	LPG10138、LPG10139	G>A	22927	ABCA4	87
スターガード病1	1800553	LPG10145	G>A	22927	ABCA4	88
スターガード病1	1800553	LPG10141	G>A	22927	ABCA4	89
スターガード病1	1800728	LPG10134	T>C	98777	ABCA4	90
スターガード病1	1800728	LPG10138、LPG10139	T>C	98777	ABCA4	91
スターガード病1	1800728	LPG10145	T>C	98777	ABCA4	92
スターガード病1	1800728	LPG10146	T>C	98777	ABCA4	93
スターガード病1	1800728	LPG10150	T>C	98777	ABCA4	94
スターガード病1	1800728	LPG10159	T>C	98777	ABCA4	95
スターガード病1	1800728	LPG10141	T>C	98777	ABCA4	96
中鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症	121434274	LPG10138、LPG10139	G>A	18627	ACADM	97
中鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症	121434274	LPG10160	G>A	18627	ACADM	98

【表 7 - 2】

疾患	RS#	RGN	CasI Mu t.	AlleleID	遺伝子記号	標的(配 列番号)
超長鎖アシル-CoAデ ヒドロゲナーゼ欠損 症	113994167	LPG10134	T>C	33877	ACADVL	99
超長鎖アシル-CoAデ ヒドロゲナーゼ欠損 症	113994167	LPG10138、LPG10139	T>C	33877	ACADVL	100
超長鎖アシル-CoAデ ヒドロゲナーゼ欠損 症	113994167	LPG10145	T>C	33877	ACADVL	101
超長鎖アシル-CoAデ ヒドロゲナーゼ欠損 症	113994167	LPG10146	T>C	33877	ACADVL	102
超長鎖アシル-CoAデ ヒドロゲナーゼ欠損 症	113994167	LPG10141	T>C	33877	ACADVL	103
アデニロコハク酸リ アーゼ欠損症	119450941	LPG10138、LPG10139	G>A	17501	ADSL	104
原発性高シュウ酸尿 症、I型	121908529	LPG10134	G>A	38436	AGXT	105
原発性高シュウ酸尿 症、I型	121908529	LPG10136	G>A	38436	AGXT	106
原発性高シュウ酸尿 症、I型	121908529	LPG10138、LPG10139	G>A	38436	AGXT	107
原発性高シュウ酸尿 症、I型	121908529	LPG10145	G>A	38436	AGXT	108
原発性高シュウ酸尿 症、I型	121908529	LPG10141	G>A	38436	AGXT	109
低ホスファターゼ症	121918007	LPG10134	G>A	28709	ALPL	110
低ホスファターゼ症	121918007	LPG10136	G>A	28709	ALPL	111
低ホスファターゼ症	121918007	LPG10138、LPG10139	G>A	28709	ALPL	112
低ホスファターゼ症	121918007	LPG10145	G>A	28709	ALPL	113
異染性白質ジストロ フィー	80338815	LPG10134	G>A	18090	ARSA	114
異染性白質ジストロ フィー	80338815	LPG10136	G>A	18090	ARSA	115

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

疾患	RS#	RGN	CasI Mu t.	AlleleID	遺伝子記号	標的(配 列番号)
異染色性白質ジスト ロフィー	80338815	LPG10138、LPG1013 9	G>A	18090	ARSA	116
異染色性白質ジスト ロフィー	80338815	LPG10145	G>A	18090	ARSA	117
異染色性白質ジスト ロフィー	80338815	LPG10146	G>A	18090	ARSA	118
異染色性白質ジスト ロフィー	80338815	LPG10141	G>A	18090	ARSA	119
乳がん及び/又は卵 巣がん	80356962	LPG10134	G>A	70247	BRCA1	120
乳がん及び/又は卵 巣がん	80356962	LPG10134	G>A	70247	BRCA1	121
乳がん及び/又は卵 巣がん	80356962	LPG10136	G>A	70247	BRCA1	122
乳がん及び/又は卵 巣がん	80356962	LPG10138、LPG1013 9	G>A	70247	BRCA1	123
乳がん及び/又は卵 巣がん	80356962	LPG10145	G>A	70247	BRCA1	124
乳がん及び/又は卵 巣がん	80356962	LPG10146	G>A	70247	BRCA1	125
乳がん及び/又は卵 巣がん	80359003	LPG10134	G>A	67069	BRCA2	126
乳がん及び/又は卵 巣がん	80359003	LPG10145	G>A	67069	BRCA2	127
乳がん及び/又は卵 巣がん	80359003	LPG10146	G>A	67069	BRCA2	128
乳がん及び/又は卵 巣がん	80359003	LPG10159	G>A	67069	BRCA2	129
乳がん及び/又は卵 巣がん	80359003	LPG10160	G>A	67069	BRCA2	130
乳がん及び/又は卵 巣がん	80359003	LPG10141	G>A	67069	BRCA2	131
乳がん及び/又は卵 巣がん	80359071	LPG10134	G>A	67203	BRCA2	132
乳がん及び/又は卵 巣がん	80359071	LPG10138、LPG1013 9	G>A	67203	BRCA2	133
ホモシスチン尿症	5742905	LPG10134	T>C	15159	CBS	134

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

疾患	RS#	RGN	CasI Mu t.	AlleleID	遺伝子記号	標的(配 列番号)
ホモシスチン尿症	5742905	LPG10136	T>C	15159	CBS	135
ホモシスチン尿症	5742905	LPG10138、LPG1013 9	T>C	15159	CBS	136
ホモシスチン尿症	5742905	LPG10145	T>C	15159	CBS	137
ホモシスチン尿症	5742905	LPG10145	T>C	15159	CBS	138
ホモシスチン尿症	5742905	LPG10150	T>C	15159	CBS	139
ホモシスチン尿症	5742905	LPG10159	T>C	15159	CBS	140
ホモシスチン尿症	5742905	LPG10141	T>C	15159	CBS	141
ホモシスチン尿症	121964962	LPG10134	G>A	15156	CBS	142
ホモシスチン尿症	121964962	LPG10136	G>A	15156	CBS	143
ホモシスチン尿症	121964962	LPG10138、LPG1013 9	G>A	15156	CBS	144
ホモシスチン尿症	121964962	LPG10145	G>A	15156	CBS	145
ホモシスチン尿症	121964962	LPG10141	G>A	15156	CBS	146
嚢胞性線維症	75527207	LPG10138、LPG1013 9	G>A	22159	CFTR	147
嚢胞性線維症	75527207	LPG10160	G>A	22159	CFTR	148
嚢胞性線維症	78655421	LPG10134	G>A	22148	CFTR	149
嚢胞性線維症	78655421	LPG10138、LPG1013 9	G>A	22148	CFTR	150
嚢胞性線維症	78655421	LPG10145	G>A	22148	CFTR	151
嚢胞性線維症	78655421	LPG10141	G>A	22148	CFTR	152
家族性自律神経失 調症	111033171	LPG10136	T>C	21124	ELP1	153

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

疾患	RS#	RGN	CasI Mut.	AlleleID	遺伝子記号	標的(配列番号)
家族性自律神経失調症	111033171	LPG10138、LPG10139	T>C	21124	ELP1	154
家族性自律神経失調症	111033171	LPG10146	T>C	21124	ELP1	155
チロシン血症I型	80338901	LPG10134	G>A	26909	FAH	156
チロシン血症I型	80338901	LPG10136	G>A	26909	FAH	157
チロシン血症I型	80338901	LPG10138、LPG10139	G>A	26909	FAH	158
チロシン血症I型	80338901	LPG10145	G>A	26909	FAH	159
難聴	80338945	LPG10134	T>C	32055	GJB2	160
難聴	80338945	LPG10136	T>C	32055	GJB2	161
難聴	80338945	LPG10138、LPG10139	T>C	32055	GJB2	162
難聴	80338945	LPG10145	T>C	32055	GJB2	163
難聴	80338945	LPG10146	T>C	32055	GJB2	164
難聴	80338945	LPG10150	T>C	32055	GJB2	165
難聴	80338945	LPG10159	T>C	32055	GJB2	166
難聴	104894396	LPG10138、LPG10139	G>A	32041	GJB2	167
難聴	104894396	LPG10145	G>A	32041	GJB2	168
難聴	104894396	LPG10160	G>A	32041	GJB2	169
難聴	104894396	LPG10141	G>A	32041	GJB2	170
封入体筋炎	28937594	LPG10134	T>C	21064	GNE	171
封入体筋炎	28937594	LPG10138、LPG10139	T>C	21064	GNE	172
封入体筋炎	28937594	LPG10145	T>C	21064	GNE	173
封入体筋炎	28937594	LPG10146	T>C	21064	GNE	174
封入体筋炎	28937594	LPG10141	T>C	21064	GNE	175
ムコ多糖症I型	121965019	LPG10134	G>A	26947	IDUA	176

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

疾患	RS#	RGN	CasI Mut.	AlleleID	遺伝子記号	標的(配列番号)
ムコ多糖症I型	121965019	LPG10136	G>A	26947	IDUA	177
ムコ多糖症I型	121965019	LPG10138、LPG10139	G>A	26947	IDUA	178
ムコ多糖症I型	121965019	LPG10145	G>A	26947	IDUA	179
ムコ多糖症I型	121965019	LPG10150	G>A	26947	IDUA	180
ムコ多糖症I型	121965019	LPG10141	G>A	26947	IDUA	181
家族性高コレステロール血症	137929307	LPG10134	G>A	171217	LDLR	182
家族性高コレステロール血症	137929307	LPG10138、LPG10139	G>A	171217	LDLR	183
家族性高コレステロール血症	137929307	LPG10145	G>A	171217	LDLR	184
家族性高コレステロール血症	137929307	LPG10146	G>A	171217	LDLR	185
家族性高コレステロール血症	137929307	LPG10141	G>A	171217	LDLR	186
家族性地中海熱	28940579	LPG10136	T>C	17579	MEFV	187
家族性地中海熱	28940579	LPG10138、LPG10139	T>C	17579	MEFV	188
家族性地中海熱	28940579	LPG10146	T>C	17579	MEFV	189
家族性地中海熱	28940579	LPG10159	T>C	17579	MEFV	190
家族性地中海熱	28940579	LPG10160	T>C	17579	MEFV	191
家族性地中海熱	104895097	LPG10136	G>A	17588	MEFV	192
家族性地中海熱	104895097	LPG10138、LPG10139	G>A	17588	MEFV	193
家族性地中海熱	104895097	LPG10145	G>A	17588	MEFV	194
家族性地中海熱	104895097	LPG10146	G>A	17588	MEFV	195
家族性地中海熱	104895097	LPG10150	G>A	17588	MEFV	196
家族性地中海熱	104895097	LPG10159	G>A	17588	MEFV	197

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

疾患	RS#	RGN	CasI Mut	AlleleID	遺伝子記号	標的(配列番号)
メバロン酸尿症	28934897	LPG10136	G>A	26968	MVK	198
メバロン酸尿症	28934897	LPG10138、LPG10139	G>A	26968	MVK	199
メバロン酸尿症	28934897	LPG10146	G>A	26968	MVK	200
肥大型心筋症	200411226	LPG10134	G>A	174776	MYBPC3	201
肥大型心筋症	200411226	LPG10136	G>A	174776	MYBPC3	202
肥大型心筋症	200411226	LPG10138、LPG10139	G>A	174776	MYBPC3	203
肥大型心筋症	200411226	LPG10145	G>A	174776	MYBPC3	204
肥大型心筋症	200411226	LPG10146	G>A	174776	MYBPC3	205
肥大型心筋症	200411226	LPG10147	G>A	174776	MYBPC3	206
肥大型心筋症	200411226	LPG10155	G>A	174776	MYBPC3	207
肥大型心筋症	200411226	LPG10160	G>A	174776	MYBPC3	208
肥大型心筋症	397516074	LPG10134	G>A	51962	MYBPC3	209
肥大型心筋症	397516074	LPG10136	G>A	51962	MYBPC3	210
肥大型心筋症	397516074	LPG10138、LPG10139	G>A	51962	MYBPC3	211
肥大型心筋症	397516074	LPG10145	G>A	51962	MYBPC3	212
肥大型心筋症	397516074	LPG10159	G>A	51962	MYBPC3	213
肥大型心筋症	397516074	LPG10141	G>A	51962	MYBPC3	214
MYH7関連障害	3218716	LPG10134	G>A	52071	MYH7	215
MYH7関連障害	3218716	LPG10136	G>A	52071	MYH7	216
MYH7関連障害	3218716	LPG10138、LPG10139	G>A	52071	MYH7	217
MYH7関連障害	3218716	LPG10145	G>A	52071	MYH7	218
MYH7関連障害	3218716	LPG10150	G>A	52071	MYH7	219
MYH7関連障害	3218716	LPG10159	G>A	52071	MYH7	220

10

20

30

40

50

【表 7 - 8】

疾患	RS#	RGN	CasI Mu t.	AlleleID	遺伝子記号	標的(配 列番号)
MYH7関連障害	3218716	LPG10141	G>A	52071	MYH7	221
MYH7関連障害	371898076	LPG10138、LPG10139	G>A	52045	MYH7	222
肥大型心筋症	104894368	LPG10134	G>A	29104	MYL2	223
肥大型心筋症	104894368	LPG10138、LPG10139	G>A	29104	MYL2	224
肥大型心筋症	104894368	LPG10145	G>A	29104	MYL2	225
肥大型心筋症	104894368	LPG10145	G>A	29104	MYL2	226
肥大型心筋症	104894368	LPG10160	G>A	29104	MYL2	227
肥大型心筋症	104894368	LPG10141	G>A	29104	MYL2	228
ニーマン・ピック病 C1型	80358259	LPG10136	T>C	18006	NPC1	229
ニーマン・ピック病 C1型	80358259	LPG10138、LPG10139	T>C	18006	NPC1	230
ニーマン・ピック病 C1型	80358259	LPG10146	T>C	18006	NPC1	231
ニーマン・ピック病 C1型	80358259	LPG10150	T>C	18006	NPC1	232
ニーマン・ピック病 C1型	80358259	LPG10159	T>C	18006	NPC1	233
フェニルケトン尿症	5030855	LPG10138、LPG10139	G>A	15646	PAH	234
フェニルケトン尿症	5030855	LPG10146	G>A	15646	PAH	235
フェニルケトン尿症	62508698	LPG10134	G>A	15619	PAH	236
						237
フェニルケトン尿症	62508698	LPG10136	G>A	15619	PAH	238
フェニルケトン尿症	62508698	LPG10138、LPG10139	G>A	15619	PAH	239
						240
フェニルケトン尿症	62508698	LPG10145	G>A	15619	PAH	241
						242
フェニルケトン尿症	62508698	LPG10150	G>A	15619	PAH	
フェニルケトン尿症	62516152	LPG10134	G>A	108520	PAH	

10

20

30

40

50

【表 7 - 9】

疾患	RS#	RGN	CasI Mut.	AlleleID	遺伝子記号	標的(配列番号)
フェニルケトン尿症	62516152	LPG10138、LPG10139	G>A	108520	PAH	243
フェニルケトン尿症	62516152	LPG10145	G>A	108520	PAH	244
フェニルケトン尿症	62516152	LPG10146	G>A	108520	PAH	245
フェニルケトン尿症	62516152	LPG10160	G>A	108520	PAH	246
フェニルケトン尿症	62516152	LPG10141	G>A	108520	PAH	247
フェニルケトン尿症	62644499	LPG10134	G>A	15656	PAH	248
フェニルケトン尿症	62644499	LPG10136	G>A	15656	PAH	249
フェニルケトン尿症	62644499	LPG10138、LPG10139	G>A	15656	PAH	250
フェニルケトン尿症	62644499	LPG10145	G>A	15656	PAH	251
フェニルケトン尿症	62644499	LPG10159	G>A	15656	PAH	252
ツェルベルガー症候群	61750420	LPG10134	G>A	22555	PEX1	253
ツェルベルガー症候群	61750420	LPG10136	G>A	22555	PEX1	254
ツェルベルガー症候群	61750420	LPG10138、LPG10139	G>A	22555	PEX1	255
ツェルベルガー症候群	61750420	LPG10145	G>A	22555	PEX1	256
ツェルベルガー症候群	61750420	LPG10146	G>A	22555	PEX1	257
ツェルベルガー症候群	61750420	LPG10150	G>A	22555	PEX1	258
ツェルベルガー症候群	61750420	LPG10141	G>A	22555	PEX1	259
免疫不全14	397518423	LPG10134	G>A	94255	PIK3CD	260
免疫不全14	397518423	LPG10136	G>A	94255	PIK3CD	261
免疫不全14	397518423	LPG10138、LPG10139	G>A	94255	PIK3CD	262
免疫不全14	397518423	LPG10145	G>A	94255	PIK3CD	263

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 0】

疾患	RS#	RGN	CasI Mu t.	AlleleID	遺伝子記号	標的(配 列番号)
免疫不全14	397518423	LPG10146	G>A	94255	PIK3CD	264
免疫不全14	397518423	LPG10150	G>A	94255	PIK3CD	265
免疫不全14	397518423	LPG10159	G>A	94255	PIK3CD	266
免疫不全14	397518423	LPG10141	G>A	94255	PIK3CD	267
POLG関連状態	113994095	LPG10138、LPG1013 9	G>A	28535	POLG	268
POLG関連状態	113994095	LPG10146	G>A	28535	POLG	269
POLG関連状態	113994098	LPG10134	G>A	28541	POLG	270
POLG関連状態	113994098	LPG10138、LPG1013 9	G>A	28541	POLG	271
POLG関連状態	113994098	LPG10145	G>A	28541	POLG	272
POLG関連状態	113994098	LPG10141	G>A	28541	POLG	273
心筋症	121908987	LPG10134	G>A	21885	PRKAG2	274
心筋症	121908987	LPG10136	G>A	21885	PRKAG2	275
心筋症	121908987	LPG10138、LPG1013 9	G>A	21885	PRKAG2	276
心筋症	121908987	LPG10145	G>A	21885	PRKAG2	277
心筋症	121908987	LPG10146	G>A	21885	PRKAG2	278
心筋症	121908987	LPG10159	G>A	21885	PRKAG2	279
心筋症	121908987	LPG10141	G>A	21885	PRKAG2	280
シュバックマン症 候群	113993993	LPG10136	T>C	18235	SBDS	281
シュバックマン症 候群	113993993	LPG10138、LPG1013 9	T>C	18235	SBDS	282
ブルガダ症候群	137854601	LPG10134	G>A	24416	SCN5A	283
ブルガダ症候群	137854601	LPG10136	G>A	24416	SCN5A	284
ブルガダ症候群	137854601	LPG10138、LPG1013 9	G>A	24416	SCN5A	285
ブルガダ症候群	137854601	LPG10145	G>A	24416	SCN5A	286
ブルガダ症候群	137854601	LPG10146	G>A	24416	SCN5A	287

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 1】

疾患	RS#	RGN	CasI Mu t.	AlleleID	遺伝子記号	標的(配 列番号)
ブルガダ症候群	137854601	LPG10150	G>A	24416	SCN5A	288
アルファ-1-アンチ トリプシン欠乏症	28929474	LPG10134	G>A	33006	SERPINA1	289
アルファ-1-アンチ トリプシン欠乏症	28929474	LPG10136	G>A	33006	SERPINA1	290
アルファ-1-アンチ トリプシン欠乏症	28929474	LPG10138、LPG1013 9	G>A	33006	SERPINA1	291
アルファ-1-アンチ トリプシン欠乏症	28929474	LPG10138、LPG1013 9	G>A	33006	SERPINA1	292
アルファ-1-アンチ トリプシン欠乏症	28929474	LPG10145	G>A	33006	SERPINA1	293
アルファ-1-アンチ トリプシン欠乏症	28929474	LPG10141	G>A	33006	SERPINA1	294
ムコ多糖症、MPS-I II-A	104894635	LPG10134	G>A	20146	SGSH	295
ムコ多糖症、MPS-I II-A	104894635	LPG10138、LPG1013 9	G>A	20146	SGSH	296
ムコ多糖症、MPS-I II-A	104894635	LPG10145	G>A	20146	SGSH	297
ムコ多糖症、MPS-I II-A	104894635	LPG10141	G>A	20146	SGSH	298
結節性硬化症症候 群	28934872	LPG10134	G>A	27436	TSC2	299
結節性硬化症症候 群	28934872	LPG10138、LPG1013 9	G>A	27436	TSC2	300
結節性硬化症症候 群	28934872	LPG10145	G>A	27436	TSC2	301
結節性硬化症症候 群	28934872	LPG10141	G>A	27436	TSC2	302
アミロイド生成性 トランスサイレチ ンアミロイドーシ ス	76992529	LPG10134	G>A	28465	TTR	303

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 2】

疾患	RS#	RGN	CasI Mu t.	AlleleID	遺伝子記号	標的(配 列番号)
アミロイド生成性 トランスサイレチ ンアミロイドーシ ス	76992529	LPG10138、LPG1013 9	G>A	28465	TTR	304
アミロイド生成性 トランスサイレチ ンアミロイドーシ ス	76992529	LPG10145	G>A	28465	TTR	305
アミロイド生成性 トランスサイレチ ンアミロイドーシ ス	76992529	LPG10150	G>A	28465	TTR	306
アミロイド生成性 トランスサイレチ ンアミロイドーシ ス	76992529	LPG10160	G>A	28465	TTR	307
アミロイド生成性 トランスサイレチ ンアミロイドーシ ス	76992529	LPG10141	G>A	28465	TTR	308
フォン・ヴィレブ ランド病	41276738	LPG10134	G>A	15335	VWF	309
フォン・ヴィレブ ランド病	41276738	LPG10136	G>A	15335	VWF	310
フォン・ヴィレブ ランド病	41276738	LPG10138、LPG1013 9	G>A	15335	VWF	311
フォン・ヴィレブ ランド病	41276738	LPG10145	G>A	15335	VWF	312
フォン・ヴィレブ ランド病	41276738	LPG10146	G>A	15335	VWF	313
フォン・ヴィレブ ランド病	41276738	LPG10150	G>A	15335	VWF	314
フォン・ヴィレブ ランド病	41276738	LPG10141	G>A	15335	VWF	330

【 0 8 1 2】

実施例 7：ハーラー症候群に關与する標的変異

以下は、病気を有する患者の大部分においてハーラー症候群を引き起こす変異を修正する RNA 指向塩基編集系を使用して、MPS-1とも称されるハーラー症候群の潜在的な治療法を説明する。このアプローチは、RNA 誘導され、幅広い組織タイプへの送達のために単一の AAV ベクターにパッケージングすることができる塩基編集融合タンパク質を利用する。使用される正確な調節エレメント及び塩基エディタドメインに応じて、疾患遺伝子座を標的とする塩基編集融合タンパク質及びシングルガイド RNA の両方をコードする単一のベクターを操作することも可能であり得る。

【0813】

実施例 7. 1 : 理想的な PAM による RGN の同定

遺伝性疾患 MPS-1 は、リソソームにおけるデルマタン硫酸塩及びヘパラン硫酸塩の蓄積によって分子レベルで特徴付けられるリソソーム蓄積症である。この疾患は、一般に、 α -L-イズロニダーゼをコードする IDUA 遺伝子 (NCBI 参照配列 NG_008103.1) の変異によって引き起こされる遺伝性遺伝子障害である。この疾患は、 α -L-イズロニダーゼの欠乏の結果である。北ヨーロッパのバックグラウンドを有する個体の研究で見出される最も一般的な IDUA 変異は、W402X 及び Q70X であり、各々のナンセンス変異は、翻訳の早期終了をもたらす (Bunge et al., (1994), Hum. Mol. Genet., 3 (6) : 861-866、参照により本明細書に組み込まれる)。単一ヌクレオチドの復帰は、野生型コード配列を復元し、遺伝子座の内因性調節機構によって制御されるタンパク質発現をもたらす。

10

【0814】

ヒト Idua 遺伝子の W402X 変異は、MPS-1 H 症例の高い割合を占める。塩基エディタは、ガイド RNA のプロトスペーサー成分の結合部位に対して狭い配列ウィンドウを標的にすることができ、したがって、標的遺伝子座からの特定の距離の PAM 配列の存在は、戦略の成功に不可欠である。標的変異は、塩基編集タンパク質の相互作用中に曝露された非標的鎖 (NTS) 上になければならず、RGN ドメインのフットプリントが PAM の近くの領域へのアクセスをブロックするという制約を考慮すると、アクセス可能な遺伝子座は、PAM から 10~30 bp であると考えられる。このウィンドウ内の他の近くのアデノシン塩基の編集及び変異誘発を回避するために、異なるリンカーをスクリーニングする。理想的なウィンドウは、PAM から 12~16 bp である。

20

【0815】

LP G10134、LP G10136、LP G10139 及び LP G10145 と適合する PAM 配列は、遺伝子座において容易に明らかである。これらのヌクレアーゼは、それぞれ 5'-nGG-3' (配列番号 73)、5'-nnnnCC-3' (配列番号 74)、5'-nnnnC-3' (配列番号 76)、及び 5'-nnGG-3' (配列番号 78) の PAM 配列を有し、サイズがコンパクトであり、潜在的に単一の AAV ベクターを介した送達を可能にする。この送達アプローチは、広範囲の組織 (肝臓、筋肉、CNS) へのアクセス、並びに十分に確立された安全性プロファイル及び製造技術など、他のものと比較して複数の利点を与える。

30

【0816】

Spyogenes 由来の Cas9 (SpyCas9) は、W402X 遺伝子座の近くに存在する NGG (配列番号 331) の PAM 配列を必要とするが、SpyCas9 のサイズは、単一の AAV ベクターへのパッケージングを妨げ、したがって、このアプローチの前述の利点を放棄する。二重送達戦略を用いてもよいが (例えば、Ryu et al., (2018), Nat. Biotechnol., 36 (6) : 536-539、参照により本明細書に組み込まれる)、製造の複雑さ及びコストが著しく増加するであろう。更に、所与の細胞での成功した編集は、ベクター及び細胞内の融合タンパク質の両方での感染を必要とするため、二重ウイルスベクター送達は、遺伝子修正の効率を著しく低下させる。

40

【0817】

Saureus からの一般的に使用される Cas9 オルソログ (SauCas9) は、SpyCas9 と比較してサイズがかなり小さいが、より複雑な PAM 要件を有する -NGRRT (配列番号 332)。この配列は、原因遺伝子座の塩基編集に有用であると予想される範囲内にはない。

【0818】

実施例 7. 2 : RGN 融合構築物及び sgRNA 配列

以下のドメインを有する融合タンパク質をコードする DNA 配列は、標準的な分子生物学技術を使用して産生される : 1) DNA 切断活性を不活性化させる変異を有する RGN

50

ドメイン（「不活性型」又は「ニックアーゼ」）；2）塩基編集に有用なアデニンデアミナーゼ。表7に記載の全ての構築物は、不活性型RGN LPG10134、LPG10136、LPG10139、又はLPG10145のN末端に作動可能に融合した、塩基編集活性ドメイン、この例ではLPG50148（配列番号333）を有する融合タンパク質を含む。塩基編集DNAに有用な他のアデニンデアミナーゼも使用され得る（例えば、国際公開第2020/139873号、2020年9月11日に出願された米国仮特許出願第63/077,089号、2021年2月8日に出願された同第63/146,840号、及び2021年3月22日に出願された同第63/164,273号、並びに2021年9月10日に出願された国際出願第PCT/US2021/049853号（その各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。融合タンパク質はまた、RGNのC末端で塩基編集酵素を用いて作製することができる。ことが当該技術分野で知られている。更に、RGN及び融合タンパク質の塩基エディタは、典型的には、リンカーアミノ酸配列によって分離される。標準リンカーの長さが15～30アミノ酸の範囲であることは、当該技術分野で既知である。

10

【0819】

【表8】

表7：RNA標的化塩基編集のための構築物

配列番号	構築物	RGN	不活性型(D)又はニックアーゼ(N)	塩基エディタ
334	SV40-LPG50148-リンカー-d LPG10134-リンカー-Nuc	LPG10134	D	ADAT
335	SV40-LPG50148-リンカー-d LPG10145-リンカー-Nuc	LPG10145	D	ADAT
336	SV40-LPG50148-リンカー-d LPG10136-リンカー-Nuc	LPG10136	D	ADAT
337	SV40-LPG50148-リンカー-d LPG10139-リンカー-Nuc	LPG10139	D	ADAT

20

【0820】

RGNのアクセス可能な編集部位は、PAM配列によって決定される。RGNを塩基編集ドメインと組み合わせる場合、NTSは一本鎖であり、一方、RGNは遺伝子座と会合しているため、編集のための標的残基は、非標的鎖（NTS）上に存在しなければならない。いくつかのヌクレアーゼ及び対応するガイドRNAを評価することは、この特定の遺伝子座に最も適切な遺伝子編集ツールの選択を可能にする。ヒトIdua遺伝子に記載の構築物によって標的化され得るいくつかの潜在的なPAM配列は、W402X変異を担う変異体ヌクレオチドに近接している。1）疾患遺伝子座におけるノンコーディングDNA鎖に相補的な「スペーサー」、及び2）ガイドRNAとRGNとの会合に必要なRNA配列を含有するガイドRNA転写物をコードする配列もまた、産生される。かかるsgRNAは、例えば、LPG10134、LPG10145、LPG10136、及びLPG10139についてそれぞれ、配列番号338～341であり得る。これらのsgRNA分子、及び当業者によって考案され得る類似のsgRNAは、上記の塩基エディタを目的の遺伝子座に導くことにおけるそれらの効率について評価することができる。

30

40

【0821】

実施例7.3：ハーラー病患者由来の細胞における活性のアッセイ

遺伝子型戦略を検証し、上述の構築物を評価するために、ハーラー病患者からの線維芽細胞を使用する。実施例4に記載のベクターと同様に、ヒト細胞におけるこれらの発現のために、融合タンパク質コード配列及びsgRNAコード配列の上流に適切なプロモーターを含有するベクターを設計する。ヒト細胞における高レベルの発現について既知であるか、又は線維芽細胞において十分に発現し得るプロモーター及び他のDNAエレメント（

50

例えば、エンハンサー、又はターミネーター）も使用され得ることが認識されている。ベクターを、標準的な技術、例えば実施例 4 に記載されるものと同様のトランスフェクションを使用して線維芽細胞にトランスフェクトする。代替的に、エレクトロポレーションを使用してもよい。細胞は、1～3日間培養される。ゲノムDNA（gDNA）は、標準的な技法を使用して単離される。編集効率は、以下に更に記載されるように、精製されたgDNAに対してqPCR遺伝子型決定アッセイ及び／又は次世代配列決定を行うことによって決定される。

【0822】

Taqman（商標）qPCR分析は、野生型及び変異型対立遺伝子に特異的なプローブを利用する。これらのプローブは、qPCR器具を使用してそのスペクトル励起特性及び／又は放出特性によって分解されるフルオロフォアを有する。PCRプライマー及びプローブを含有する遺伝子型決定キットは、商業的に得ることができる（すなわち、SNP ID rs121965019について、Thermo Fisher Taqman（商標）SNP遺伝子型決定アッセイID C_27862753_10）か、又は設計することができる。設計されたプライマー及びプローブセットの例を表8に示す。

【0823】

【表9】

表8：RT-PCRプライマー及びプローブ

説明	配列	配列番号
順方向増幅プライマー	5' -GACTCCTTCACCAAG-3'	342
逆方向増幅プライマー	5' -GTAGATCAGCACCG-3'	343
野生型プローブ	5' -CTCTGGGCCGAAGT-3'	344
W402Xプローブ	5' -CTCTAGGCCGAAGT-3'	345

【0824】

編集実験に続いて、gDNAを、標準的な方法、並びに上述のプライマー及びプローブを使用してqPCR分析に供する。予想結果を表9に示す。このインビトロ系を使用して、構築物を便宜的に評価し、更なる研究のために高い編集効率を有するものを選択することができる。系を、W402X変異を有する細胞と有しない細胞と、好ましくは、この変異に対してヘテロ接合性であるいくつかと比較して評価する。Ct値を、Sybr greenなどの染料を使用した参照遺伝子又は遺伝子座の総増幅のいずれかと比較する。

【0825】

【表10】

表9：予想されるqPCR結果

遺伝子型	塩基エディタでのトランスフェクション	予想されるPCR結果
Idua ^{WT/WT}	なし	ホモ接合性WT
Idua ^{WT/W402X}	なし	ヘテロ接合：50%WT、50%W402X
Idua ^{W402X/W402X}	なし	ホモ接合性W402X
Idua ^{W402X/W402X}	あり	可変

【0826】

組織はまた、次世代配列決定によって分析することができる。以下に示すもの（表10）などのプライマー結合部位、又は当業者によって識別され得る他の好適なプライマー結合部位を使用することができる。PCR増幅後、Illumina Nextera XTオーバーハング配列を含有する生成物は、Illumina 16S Metagenomic Sequencing Libraryプロトコルに従ってライブラリ調製を

受ける。ディープシーケンシングは、Illumina Mi-Seqプラットフォームで実施する。典型的には、250bpの対末端リード（2×10万リード）のうちの200,000個は、増幅子ごとに生成される。リードをCRISPResso（Pinello et al., 2016）を使用して分析し、編集率を計算する。出力アラインメントは、挿入部位及び欠失部位を確認するために、並びに組換え部位でマイクロホモロジー部位を同定するために手作業でキュレーションする。

【0827】

【表11】

表10：NGSプライマー結合部位

方向	配列	配列番号
順方向	5' -ACTTCCTCCAGCC-3'	346
逆方向	5' -GAACCCCGGCTTA-3'	347

10

【0828】

抗IDUA抗体を使用して、トランスフェクトした細胞及び対照細胞の細胞溶解物のウエスタンブロッティングを実行し、完全長タンパク質の発現を検証し、基質4-メチルウンベリフェリルα-L-イズロニドを使用して、細胞溶解物上の酵素活性アッセイを行って、酵素が触媒活性であることを検証する（Hopwood et al., Clin. Chim. Acta (1979), 92(2): 257-265、参照により本明細書に組み込まれる）。これらの実験は、元のIduaW402X/W402X細胞系（トランスフェクションなし）、塩基編集構築物及びランダムガイド配列でトランスフェクトされたIduaW402X/W402X細胞系、及び野生型IDUAを発現する細胞系と比較して実行される。

20

【0829】

実施例7.4：マウスモデルにおける疾患処置の妥当性検証

この治療アプローチの有効性を検証するために、類似のアミノ酸にナンセンス変異を有するマウスモデルを使用する。マウス株は、Idua遺伝子（Gene ID: 15932）にW392X変異を保有し、これは、ハーラー症候群患者における相同変異に対応する（Bunge et al., (1994), Hum. Mol. Genet. 3(6): 861-866、参照により本明細書に組み込まれる）。この遺伝子座は、ヒトのものとは異なるヌクレオチド配列を含み、これは、前の実施例に記載の塩基エディタでの修正に必要なPAM配列を欠き、したがって、ヌクレオチド修正を実行するための異なる融合タンパク質の設計を必要とする。この動物における疾患の改善は、遺伝子送達ベクターによってアクセス可能な組織における変異を補正する治療アプローチを検証することができる。

30

【0830】

この変異に対してホモ接合性のマウスは、ハーラー症候群患者と同様のいくつかの表現型特性を示す。RNA誘導型配列とともに、上述の塩基編集RGN融合タンパク質（表7）を、マウスにおけるタンパク質発現及びRNA転写を可能にする発現ベクターに組み込む。研究設計を以下の表11に示す。本研究は、塩基編集融合タンパク質及びRNA誘導型配列を含む高用量の発現ベクター、低用量の同じ発現ベクター、塩基編集融合タンパク質又はガイドRNAを含まない発現ベクターで処理されたモデルマウスである対照、及び同じ空のベクターで処理された野生型マウスである第2の対照で処置された群を含む。

40

【0831】

50

【表 1 2】

表 1 1 : マウスモデルにおけるゲノム編集実験

群	マウス株	N	処理
1	Idua-W392X	≥5	低用量のベクター
2	Idua-W392X	≥5	高用量のベクター
3	Idua-W392X	≥5	ビヒクル
4	129/Sv (WT)	5	ビヒクル

10

【0 8 3 2】

評価するエンドポイントには、体重、尿 G A G 排泄、血清 I D U A 酵素活性、目的の組織における I D U A 活性、組織病理学、S N P の補正を検証するための目的の組織の遺伝子型決定、並びに行動及び神経学的評価が含まれる。いくつかのエンドポイントは末端であるため、研究の終了前に、例えば、組織病理及び組織 I D U A 活性の評価のために追加の群を追加してもよい。エンドポイントの追加の例は、ハーラー症候群動物モデルを確立する公開された論文に見出すことができる (Shull et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91 (26): 12937-12941、Wang et al. (2010), Mol. Genet. Metab., 99 (1): 62-71、Hartung et al. (2004), Mol. Ther., 9 (6): 866-875、Liu et al. (2005), Mol. Ther., 11 (1): 35-47、Clarke et al. (1997), Hum. Mol. Genet. 6 (4): 503-511、全て本明細書に組み込まれる)。

20

【0 8 3 3】

1つの可能な送達ベクターは、アデノ随伴ウイルス (A A V) を利用する。ベクターは、C M V エンハンサー (配列番号 3 2 8) 及びプロモーター (配列番号 3 2 7)、又は他の好適なエンハンサー及びプロモーターの組み合わせが先行する塩基エディター d R G N 融合タンパク質コード配列 (例えば、上述のような Nuc - A D A T - リンカー - d A P G 1 9 7 4 8 - リンカー - S V 4 0)、任意選択的にコザック配列を含むように産生され、3'末端で、Levitt, N.; Briggs, D.; Gil, A.; Proudfoot, N. J. Definition of an Efficient Synthetic Poly (A) Site. Genes Dev. 1989, 3 (7), 1019-1025 に記載されている最小配列などのターミネーター配列及びポリアデニル化配列に作動可能に融合する。ベクターは、その 5'末端でヒト U 6 プロモーター (配列番号 3 2 9) 又は低分子ノンコーディング RNA の産生に好適な別のプロモーターに作動可能に連結されたシングルガイド RNA をコードする発現カセットを更に含んでよく、A A V カプシドにパッケージングするために必要かつ当該技術分野で周知の逆位末端反復 (I T R) 配列を更に含んでよい。産生及びウイルスパッケージングは、米国特許第 9, 587, 250 号 (参照により本明細書に組み込まれる) に記載されるものなどの標準的な方法によって実行される。

30

40

【0 8 3 4】

他の可能性のあるウイルスベクターには、アデノウイルス及びレンチウイルスベクターが含まれ、これらは一般的に使用され、異なるパッケージング能力及び要件を有する同様の要素を含有する。脂質ナノ粒子によって封入された mRNA 及び sgRNA (Cullis, P. R. and Allen, T. M. (2013), Adv. Drug Deliv. Rev. 65 (1): 36-48、Finn et al. (2018), Cell Rep. 22 (9): 2227-2235、両方とも参照により組み込まれる)、プラスミド DNA の流体力学的注入 (Suda T and Liu D,) 2007) Mol. Ther. 15 (12): 2063~2069、参照により本明細書に組み込まれ

50

る)、又はsgRNAのリボ核タンパク質複合体、及び金ナノ粒子と関連するリボ核タンパク質複合体 (Lee, K.; Conboy, M.; Park, H. M.; Jiang, F.; Kim, H. J.; Dewitt, M. A.; Mackley, V. A.; Chang, K.; Rao, A.; Skinner, C.; et al. Nanoparticle Delivery of Cas9 Ribonucleoprotein and Donor DNA in Vivo Induces Homology-Directed DNA Repair. Nat. Biomed. Eng. 2017, 1 (11), 889-90) などの非ウイルス送達方法も使用される。

【0835】

実施例7.5: ヒト化遺伝子座を有するマウスモデルにおける疾患の修正

ヒト治療に使用されるものと同一の塩基エディタ構築物の有効性を評価するために、W392付近のヌクレオチドがW402付近のヒトにおける配列に一致するように改変されるマウスモデルが必要である。これは、マウス胚における遺伝子座を切断して置き換えるためのRGN及びHDRテンプレートの使用を含む様々な技術によって達成することができる。

【0836】

表12に示されるように、高度のアミノ酸保存のために、マウス遺伝子座内のほとんどのヌクレオチドは、サイレント変異を有するヒト配列のヌクレオチドに変化され得る。得られた操作マウスゲノムにおける変化されたコード配列をもたらす唯一の塩基変化は、導入された停止コドンの後に生じる。

【0837】

【表13-1】

表12: ヒト化マウス遺伝子座を生成するためのヌクレオチド変異

	ヒト (W402X)		マウス (W392X)		ヒト化マウス	
特徴	ヌクレオチド (配列番号 548)	コードされたAA	ヌクレオチド (配列番号 549)	コードされたAA	ヌクレオチド (配列番号 550)	コードされたAA
プロトスペーサー	G	E	A	G	G	G
	G	E	G	E	G	E
	A		A		A	
	G		A		G	
	C	Q	C	Q	C	Q
	A		A		A	
	G		A		G	

10

20

30

40

50

【表 13-2】

	ヒト (W402X)		マウス (W392X)		ヒト化マウス	
特徴	ヌクレオチド (配列番号 548)	コードされたAA	ヌクレオチド (配列番号 549)	コードされたAA	ヌクレオチド (配列番号 550)	コードされたAA
プロトスペーサー	C	L	C	L	C	L
	T		T		T	
	C		C		C	
	T	終止	T	終止	T	終止
	A		A		A	
	G		G		G	
	G	A	G	A	G	A
	C		C		C	
	C		A		C	
	G	E	G	E	G	E
	A		A		A	
	A		G		A	
	G	V	G	V	G	V
	T		T		T	
	G		C		G	
	T	S	T	S	T	S
	C		C		C	
	G		A		G	
PAM、非重要	C	Q	A	K	C	Q
	A		A		A	
	G		G		G	
	G	A	G	A	G	A
PAM、重要	C		C		C	
	C		T		C	

このマウス株の操作時に、同様の実験を実施例 7. 4に記載されるように実行する。

【0838】

実施例 8：フリードライヒ運動失調症に関与する標的変異

フリードライヒ運動失調症 (FRDA) を引き起こすトリヌクレオチド反復配列の拡大は、FRDA 不安定性領域と称される、FXN 遺伝子内の定義された遺伝子座において生じる。RNA 誘導型ヌクレアーゼ (RGN) が、FRDA 患者細胞内の不安定領域を切除するために使用され得る。このアプローチは、1) ヒトゲノム内の対立遺伝子を標的とするようにプログラムすることができる RGN 及びガイド RNA 配列、並びに 2) RGN 及びガイド配列に対する送達アプローチを必要とする。ゲノム編集に使用される多くのヌクレアーゼ、例えば、S. pyogenes 由来の一般的に使用される Cas9 ヌクレアーゼ (SpCas9) は、特に、機能発現カセットに必要な他の遺伝子要素に加えて、SpCas9 遺伝子及びガイド RNA の長さを考慮する場合、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターにパッケージングするには大きすぎる。これにより、SpCas9 を使用する実行可能なアプローチは行いにくくなる。

【0839】

本発明のコンパクト RNA 誘導型ヌクレアーゼ、例えば、LPG10134、LPG10145、LPG10136、及び LPG10139 は、FRDA 不安定性領域の切除に一意によく適している。LPG10134、LPG10145、LPG10136、及び

LPG10139は、FRDA不安定性領域の近傍にあるPAM要件を有する。加えて、LPG10134、LPG10145、LPG10136、又はLPG10139は、ガイドRNAとともにAAVベクターにパッケージングされ得る。

【0840】

表13は、FRDA不安定性領域の5'及び3'隣接部へのLPG10134、LPG10145、LPG10136、又はLPG10139の標的化に好適なゲノム標的配列の位置を示す。遺伝子座に着くと、RGNは、FA不安定領域を切除する。領域の切除は、遺伝子座のIllumina配列決定によって検証することができる。

【0841】

【表14】

表13：RGN系のゲノム標的配列

RGN	FRDA不安定領域に対する位置	ゲノム標的配列(配列番号)
LPG10134	5'	348
LPG10134	5'	349
LPG10134	3'	350
LPG10134	3'	351
LPG10145	5'	352
LPG10145	5'	353
LPG10145	3'	354
LPG10145	3'	355
LPG10136	5'	356
LPG10136	5'	357
LPG10136	3'	358
LPG10136	3'	359
LPG10139	5'	360
LPG10139	5'	361
LPG10139	3'	362
LPG10139	3'	363

【0842】

実施例9：鎌状赤血球疾患に関与する標的変異

BCL11Aエンハンサー領域内の標的配列(配列番号364)は、鎌状赤血球疾患の症状を治癒又は緩和するために、胎児ヘモグロブリン(HbF)を増加させるためのメカニズムを提供し得る。例えば、ゲノムワイド関連研究は、HbFレベルの増加と関連するBCL11Aにおける一連の遺伝的バリエーションを同定した。これらのバリエーションは、ステージ特異的な系譜制限エンハンサー領域として機能するBCL11Aのノンコーディング領域に見出されるSNPのコレクションである。更なる調査により、このBCL11Aエンハンサーが、BCL11A発現のために赤血球系細胞において必要であることが明らかになった(Bauer et al., (2013) Science 343:253-257、参照により本明細書に組み込まれる)。エンハンサー領域は、BCL11A遺伝子のイントロン2内に見出され、イントロン2におけるDNase I過敏症の3つの領域(多くの場合、調節可能性に関連するクロマチン状態を示す)が同定された。これらの3つの領域は、BCL11Aの転写開始部位からのキロ塩基単位の距離に従って、「+62」、「+58」及び「+55」として同定された。これらのエンハンサー領域は、長さが約350(+55)、550(+58)、及び350(+62)ヌクレオチドである(Bauer et al., 2013)。

【0843】

実施例9.1：好ましいRGN系の同定

ここでは、成人ヘモグロビンにおけるベータ異常ヘモグロビン症の作製に關与する遺伝子であるHBB遺伝子座内のその結合部位へのBCL11Aの結合を破壊するRGN系を使用したベータヘモグロビン異常症の潜在的な治療法について説明する。このアプローチは、哺乳動物細胞においてより効率的であるNHEJを使用する。更に、このアプローチは、インビボ送達のために単一のAAVベクターにパッケージングされ得る十分に小さいサイズのヌクレアーゼを使用する。

【0844】

ヒトBCL11Aエンハンサー領域におけるGATA1エンハンサーモチーフ（配列番号364）は、成人ヒト赤血球におけるHbFの同時再発現とともにBCL11A発現を低減するためのRNA誘導型ヌクレアーゼ（RGN）を使用した破壊のための理想的な標的である（Wu et al., (2019) Nat Med 387:2554）。LPG10134、LPG10145、LPG10136、及びLPG10139と適合するいくつかのPAM配列は、このGATA1部位を取り囲む遺伝子座において容易に明らかである。これらのヌクレアーゼは、それぞれ5'-nGG-3'（配列番号73）、5'-nnGG-3'（配列番号78）、5'-nnnnCC-3'（配列番号74）、及び5'-nnnnC-3'（配列番号76）のPAM配列を有し、サイズがコンパクトであり、単一のAAV又はアデノウイルスベクターにおける適切なガイドRNAとともにそれらの送達を可能にする可能性がある。この送達アプローチは、造血幹細胞へのアクセス、及び十分に確立された安全性プロファイル及び製造技術など、他のものと比較して複数の利点を与える。

【0845】

Spyogenes由来の一般的に使用されるCas9ヌクレアーゼ（SpyCas9）は、5'-NGG-3'、（配列番号331）のPAM配列を必要とし、そのうちのいくつかは、GATA1モチーフの近くに存在する。しかしながら、SpyCas9のサイズは、単一のAAV又はアデノウイルスベクターへのパッケージングを防止し、したがって、このアプローチの前述の利点を放棄する。二重送達戦略を採用してもよいが、製造の複雑さ及びコストが大幅に増加するであろう。更に、所与の細胞での成功した編集は、両方のベクターでの感染を必要とするため、二重ウイルスベクター送達は、遺伝子修正の効率を著しく低下させる。

【0846】

実施例4に記載されるものと同様に、ヒトコドン最適化LPG10134、LPG10145、LPG10136、又はLPG10139をコードする発現カセットを生成する。RGN LPG10134、LPG10145、LPG10136、及びLPG10139のガイドRNAを発現する発現カセットも生成する。これらのガイドRNAは、1）BCL11Aエンハンサー遺伝子座内のノンコーディング又はコードDNA鎖（標的配列）のいずれかと相補的であるプロトSpacer配列、及び2）ガイドRNAとRGNとの会合に必要なRNA配列。BCL11A GATA1エンハンサーモチーフを取り囲むLPG10134、LPG10145、LPG10136、及びLPG10139による標的化のためのいくつかの潜在的なPAM配列により、いくつかの潜在的なガイドRNA構築物が作製され、BCL11A GATA1エンハンサー配列の堅牢な切断及びNHEJ媒介の破壊をもたらす最良のプロトSpacer配列を決定する。表14の標的ゲノム配列を評価して、RGNをこの遺伝子座に導く。

【0847】

10

20

30

40

50

【表 15】

表 14 : LPG10134、LPG10145、LPG10136又はLPG10139を使用したBC L11A GATA1エンハンサー遺伝子座の標的配列

ガイド	RGN	標的ゲノム配列(配列番号)
1	LPG10134	365
2	LPG10134	366
3	LPG10134	367
4	LPG10145	368
5	LPG10145	369
6	LPG10145	370
7	LPG10136	371
8	LPG10136	372
9	LPG10136	373
10	LPG10139	374
11	LPG10139	375
12	LPG10139	376

10

20

【0848】

LPG10134、LPG10145、LPG10136、又はLPG10139がBC L11Aエンハンサー領域を破壊する挿入又は欠失を生成する効率を評価するために、ヒト胎児腎臓細胞（HEK細胞）などのヒト細胞株が使用される。RGN発現カセットを含むDNAベクター（例えば、実施例4に記載されるように）を生成する。ガイドRNA配列のコード配列を含む発現カセットを含む別個のベクターも生成する。そのような発現カセットは、実施例4に記載されるように、ヒトRNAポリメラーゼIII U6プロモーター（配列番号329）を更に含み得る。代替的に、RGN及びガイドRNAの両方の発現カセットを含む単一のベクターを使用してもよい。ベクターを、実施例4に記載されるものなどの標準的な技術を使用してHEK細胞に導入し、細胞を1～3日間培養する。この培養期間の後、実施例4に記載されるように、ゲノムDNAを単離し、T7エンドヌクレアーゼI消化及び／又は直接DNA配列決定を使用して挿入又は欠失の頻度を決定する。

30

【0849】

標的BC L11A領域を包含するDNAの領域を、Illumina Nextera XTオーバーハング配列を含有するプライマーを用いたPCRによって増幅する。これらのPCR増幅子は、T7エンドヌクレアーゼI消化を使用してNHEJの形成について検査されるか、又はIllumina 16S Metagenomic Sequencing Libraryプロトコル又は同様の次世代配列決定（NGS）ライブラリ調製の後にライブラリ調製を受けるかのいずれかである。ディープシーケンシングに続いて、生成されたリードをCRISPRessoによって分析して、編集率を計算する。出力アライメントは、挿入及び削除部位を確認するために手作業でキュレーションされている。この分析は、好ましいRGN及び対応する好ましいガイドRNA（sgRNA）を同定する。分析の結果、LPG10134、LPG10145、LPG10136、及びLPG10139のいずれかが等しく好ましくなり得る。更に、分析は、1つより多い好ましいガイドRNAが存在するか、又は表14の全ての標的ゲノム配列が等しく好ましいことを決定し得る。

40

【0850】

実施例9.2：胎児ヘモグロビンの発現のためのアッセイ

この実施例では、BC L11Aエンハンサー領域を破壊するLPG10134、LPG

50

10145、LPG10136、又はLPG10139が生成した挿入又は欠失を、胎児ヘモグロビンの発現についてアッセイする。健康なヒトドナーCD34⁺造血幹細胞（HSC）を使用する。これらのHSCは培養され、好ましいRGN及び好ましいsgRNAのコード領域を含む発現カセットを含むベクター（複数可）は、実施例8.1に記載されているものと同様の方法を使用して導入される。エレクトロポレーション後、これらの細胞は、確立されたプロトコルを使用してインビトロで赤血球に分化される（例えば、Giarratana et al. (2004) Nat Biotechnology 23:69-74、参照により本明細書に組み込まれる）。次いで、HbFの発現を、抗ヒトHbF抗体を用いたウエスタンブロッティングを用いて測定するか、又は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を介して定量する。BCL11Aエンハンサー遺伝子座の破壊に成功すると、RGNのみでガイドなしでエレクトロポレーションされたHSCと比較して、HbF産生の増加につながると予想される。

10

【0851】

実施例9.3：鎌状赤血球形成減少のためのアッセイ

この実施例では、BCL11Aエンハンサー領域を破壊するLPG10134、LPG10145、LPG10136、又はLPG10139が生成した挿入又は欠失を、鎌状赤血球形成の減少についてアッセイする。鎌状赤血球疾患に罹患した患者由来のドナーCD34⁺造血幹細胞（HSC）を使用する。これらのHSCは培養され、好ましいRGN及び好ましいsgRNAのコード領域を含む発現カセットを含むベクター（複数可）は、実施例8.1に記載されているものと同様の方法を使用して導入される。エレクトロポレーション後、これらの細胞は、確立されたプロトコルを使用してインビトロで赤血球に分化される（Giarratana et al. (2004) Nat Biotechnology 23:69-74）。次いで、HbFの発現を、抗ヒトHbF抗体を用いたウエスタンブロッティングを用いて測定するか、又は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を介して定量する。BCL11Aエンハンサー遺伝子座の破壊に成功すると、RGNのみでガイドなしでエレクトロポレーションされたHSCと比較して、HbF産生の増加につながると予想される。

20

【0852】

鎌状赤血球の形成は、メタ重亜硫酸塩の添加によって、これらの分化した赤血球に誘導される。鎌状赤血球対正常赤血球の数を、顕微鏡を使用してカウントする。鎌状赤血球の数は、LPG10134、LPG10145、LPG10136、又はLPG10139 + sgRNAで処理した細胞では、未処理の細胞、又はRGN単独で処理した細胞よりも少ないことが予想される。

30

【0853】

実施例9.4：マウスモデルにおける疾患処置の妥当性検証

BCL11A遺伝子座の破壊のためにLPG10134、LPG10145、LPG10136、又はLPG10139を使用する有効性を評価するために、鎌状赤血球貧血の好適なヒト化マウスモデルを使用する。好ましいRGN及び好ましいsgRNAをコードする発現カセットは、AAVベクター又はアデノウイルスベクターにパッケージングされている。特に、アデノウイルス型Ad5/35は、HSCを標的化するのに有効である。鎌状赤血球対立遺伝子を有するヒト化HBB遺伝子座を含む好適なマウスモデル、例えば、B6;FVB-Tg(LCR-HBA2, LCR-HBB*E26K)53Hhb/J又はB6.Cg-Hb atm1Paz Hbb tm1Tow Tg(HBA-HBBs)41Paz/HhbJを選択する。これらのマウスを、単独で、又はプレリキサフォルと組み合わせて、顆粒球コロニー刺激因子で処置して、HSCを循環に動員する。次いで、RGN及びガイドプラスミドを運ぶAAV又はアデノウイルスを静脈内に注入し、マウスを1週間回復させる。これらのマウスから得られた血液を、メタ重亜硫酸塩を使用したインビトロ鎌状赤血球アッセイで試験し、マウスを長手方向に追跡して、死亡率及び造血機能を監視する。RGN及びガイドRNAを運ぶAAV又はアデノウイルスによる処置は、発現カセットの両方を欠くウイルス、又はRGN発現カセットを単独で運ぶウイルスで処

40

50

理されたマウスと比較して、鎌状赤血球、死亡率を低減し、造血機能を改善することが予想される。

【0854】

実施例10：タンパク質精製及び生化学的試験

本開示のRGNを発現させ、精製し、標的配列のインビトロ切断について試験した。その後、LPG10145のインビトロ切断アッセイを使用して、切断部位を決定した。

【0855】

実施例10.1：RNA誘導型ヌクレアーゼ及び生化学的切断アッセイの組換え発現及び精製

細菌コドン最適化されたHISタグ付きRGNコード配列を含有するプラスミドを合成し、pET-29b(+)ベクター骨格にクローニングした。RGN細菌発現プラスミドの形質転換を、熱ショックを使用してOne Shot(商標)BL21 Star(商標)(DE3)Chemically Competent E. coli細胞を用いて実施した。RGNを、50 µg/mLのカナマイシンを補充したMagic Media(商標)E. coli発現培地(Invitrogen)を使用して、0.5 Lのスケールで発現させた。スターター培養物で播種した後、発現培養物を300 rpmで振盪する30℃で5時間インキュベートし、次いで18℃に更に24時間落とした。次に、細胞を遠心分離によって採取し、-80℃で凍結した。発現培養物からの細胞ペレットを室温で解凍し、溶解緩衝液に再懸濁し、均質化し、次いで、Emulsiflex-C3細胞破壊剤(Avestin)で溶解した。次いで、粗溶解物溶液を、高速遠心分離を使用して清澄化した。次に、AekTA Pure25 Fast Protein Liquid Chromatographyシステム(Cytiva)を使用して、固定化金属親和性クロマトグラフィー(IMAC)を使用して、清澄化した溶解物を精製した。LPG10136、LPG10138、及びLPG10139を、カチオン交換クロマトグラフィーを使用して更に精製した。次いで、精製されたRGNタンパク質を濃縮し、20 mMのリン酸ナトリウム、300 mMの塩化ナトリウム、1 mMのDTT、pH 7.4、及び20%のグリセロールを含有する製剤緩衝液中に交換した後、液体窒素を使用してフラッシュ凍結した。精製したRGNの純度を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を使用して決定した。

【0856】

(ヌクレアーゼ及びsgRNAを含む)リボ核タンパク質複合体を、ヌクレアーゼ及びRNAを、緩衝溶液中で20分間、室温でインキュベートすることによって形成した。複合体を、各RGNの対応するPAM配列にその3'末端で直接連結された、消化緩衝液及びPCR増幅標的を含有するチューブに移した。リボ核タンパク質複合体としての各RGNを、それぞれの標的(ライブラリ1又はライブラリ2、それぞれ配列番号459及び460)ポリヌクレオチドと37℃で120分間インキュベートした。消化反応をエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を使用してクエンチし、断片解析を使用して分析して、切断生成物を定量した。

【0857】

本開示の12個のRGNのうち10個を可溶性に発現させ、E. coliから単離した。組換え発現及びその後の精製からの収量は、RGNの同一性に依拠して大きく変化し、数mg~100mgを超える範囲であった。発現及び精製に成功した10個のRGNタンパク質のうち、8個は、2つの異なる標的配列及びいくつかの適合性PAMコンテキストに対して試験したときに生化学的DNA切断アッセイにおいて活性であった。精製タンパク質を用いたこれらのインビトロアッセイの不活性は、これらの特定の発現、精製、及び/又は切断の条件に特異的ないくつかの因子に起因する可能性があり、他の条件又はインビボ設定内でのRGNの活性を必ずしも反映しない場合がある。

【0858】

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表 1 5 : d s DNA の精製純度及びインビトロ切断

RGN	単離された収量 mg/L培養物	純度 (%)	標的鎖の最大数 観察された切断 (%)
LPG10134	15	78	0
LPG10136	34 (14)	66	31
LPG10138	67 (6)	75	18
LPG10139	79 (36)	75	7
LPG10141	0	n/a	n/a
LPG10145	148	90	100
LPG10146	127	87	58
LPG10147	0	n/a	n/a
LPG10150	148	70	32
LPG10155	15	77	33
LPG10159	62	83	2. 6
LPG10160	3	35	0

I M A C 精製からの単離された収量
(C E X からの単離された収量)

【 0 8 5 9】

【表 1 7 - 1】

表 1 6 : インビトロ切断及び完璧な標的切断のための配列

RGN ID	標的配列	PAMコンテキスト	PAM配列番号	標的鎖の切断 (%)	非標的鎖の切断 (%)
LPG10134	ライブラリ1	AGGACCTC	461	0	0
LPG10134	ライブラリ1	AGGAATTC	462	0	0
LPG10134	ライブラリ1	AGGAAAGC	463	0	0
LPG10134	ライブラリ2	AGGACCTC	461	0	0
LPG10134	ライブラリ2	AGGAATTC	462	0	0
LPG10134	ライブラリ2	AGGAAAGC	463	0	0

10

20

30

40

50

【表 17-2】

RGN ID	標的配列	PAMコンテキスト	PAM配列番号	標的鎖の切断(%)	非標的鎖の切断(%)
LPG10136	ライブラリ1	AGGACCTC	461	5.0	3.3
LPG10136	ライブラリ1	AGGACTTC	464	0	0
LPG10136	ライブラリ2	AGGACCTC	461	30.9	19.7
LPG10136	ライブラリ2	AGGACTTC	464	11.3	7.5
LPG10138	ライブラリ1	AGGACCTC	461	1.4	0.5
LPG10138	ライブラリ1	AGGAATTC	462	0	0
LPG10138	ライブラリ1	AGGACTTC	464	5.5	3.7
LPG10138	ライブラリ2	AGGACCTC	461	4.7	1.5
LPG10138	ライブラリ2	AGGAATTC	462	0	0
LPG10138	ライブラリ2	AGGACTTC	464	18.0	9.4
LPG10139	ライブラリ1	AGGACCTC	461	4.4	2.4
LPG10139	ライブラリ2	AGGACCTC	461	7.3	4.5
LPG10145	ライブラリ1	ACGGATTC	465	92.9	95.3
LPG10145	ライブラリ2	ACGGATTC	465	100	100
LPG10146	ライブラリ1	AGGAAACC	466	3.9	2.8
LPG10146	ライブラリ1	GGATAACC	467	0	0
LPG10146	ライブラリ1	GAGTAACC	468	1.5	1.0
LPG10146	ライブラリ1	CAATAACC	469	0	0
LPG10146	ライブラリ2	AGGAAACC	466	48.9	48.6
LPG10146	ライブラリ2	GGATAACC	467	39.7	27.2
LPG10146	ライブラリ2	GAGTAACC	468	57.7	48.2
LPG10146	ライブラリ2	CAATAACC	469	32.7	25.9
LPG10150	ライブラリ1	AGGACCTC	461	1.4	0.9
LPG10150	ライブラリ1	AGGACTTC	464	2.3	1.7
LPG10150	ライブラリ2	AGGACCTC	461	25.1	16.5
LPG10150	ライブラリ2	AGGACTTC	464	31.8	26.1
LPG10155	ライブラリ1	AGAAATTC	470	32.7	20.1
LPG10155	ライブラリ2	AGAAATTC	470	7.6	3.5
LPG10159	ライブラリ2	AGAAATTC	470	2.5	1.2
LPG10160	ライブラリ1	AAATATTC	471	0	0
LPG10160	ライブラリ2	AAATATTC	471	0	0

【0860】

実施例10.2：インビトロ切断部位の決定

RNP（リボ核タンパク質）及び適切なプラスミド基質を使用して、切断部位を決定した。His10 N末端タグに融合したRGNをコードする*E. coli*発現プラスミドを構築し、タンパク質発現のためにBL21（DE3）Star *E. coli*（Invitrogen）に形質転換した。RGN発現は、自己誘導Magic Media（Thermo）を使用して行った。溶解及び清澄化後、固定化金属親和性クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、及びアニオン交換クロマトグラフィーを含む3段階の精製方法でタンパク質を精製した。RNP複合体は、RGNを、そのRNAガイド（ライブラリ1については配列番号473、ライブラリ2については配列番号474）とともに、緩衝溶液中で15分間室温でインキュベートすることによって形成した。

【0861】

切断反応は、RNP、消化緩衝液、及びプラスミド標的から構成された。プラスミド標的（配列番号472）配列は、RGN PAM配列に対して、ライブラリ1及びライブラリ2として記載される2つの標的ヌクレオチド配列（それぞれ、配列番号459及び配列番号460）、-5'を含有した。切断反応を37℃で90分間インキュベートすると、切断生成物が得られた。切断された生成物を、アガロースゲル電気泳動によって視覚化した。全切断反応を、サイズ選択のない磁気ビーズDNA精製法を用いてクリーンアップし、このクリーンアップを各酵素反応後に繰り返した。クリーニングしたDNAを、T4 DNAポリメラーゼ（NEB）で末端修復し、Klenow断片（3'-5' exo）（NEB）を使用してA末端修復した。アダプターオリゴ（配列番号475及び476）を、等モル量で混合し、95℃まで加熱し、室温までゆっくりと冷却することによってアニーリングした。T4 DNAリガーゼをT4ポリヌクレオチドキナーゼと組み合わせて使用して、アダプターをAテール切断生成物にアニーリングした。最終的にクリーニングしたライゲーション生成物をPCRテンプレートとして機能した。

10

【0862】

アダプター連結切断生成物を増幅するためのPCRを、予想される切断部位の上流及び下流のアダプター配列及びプラスミド骨格に相補的な適切なプライマー対を使用して実行した。具体的には、PCR反応は、50～100 ngのテンプレートDNA及び0.5 μMの各プライマーを有する2×Ultra II Q5マスターミックス（NEB）を含んだ。PCRサイクル条件は、98℃で1分間、続いて98℃で10秒、62℃で10秒、72℃で10秒の30サイクル、続いて、72℃で1分間、10℃で永久保持する最終ステップであった。PCR産物は、アガロースゲル電気泳動によって視覚化され、配列は、サンガー配列決定によって検証された。

20

【0863】

サンガー配列に配列が存在しない、又は繰り返されない場合、切断部位は平滑であると判断した。切断部位が5'オーバーハングを有する場合、オーバーハング配列は、両方の配列決定されたPCR産物に存在するであろう。3'オーバーハングは、未切断のプラスミド基質と比較して、両方のPCR生成物に欠けている配列をもたらす。

【0864】

LPG10145が、PAMに対して+3位に開裂部位を有すること、すなわち、PAM配列の上流の3番目と4番目のヌクレオチド（5'）の間に平滑開裂が導入されることが決定された。

30

【0865】

実施例11：PBMCへのRNP及びmRNAの送達

RGNが異なる形式で送達することができるかどうかを判定するために、RNPヌクレオフェクション送達を末梢血単核細胞（PBMC）で試験した。PBMCを解凍し、3日間、CD3／CD28ビーズ（ThermoFisher）を使用して活性化し、次いで、Lonza 4D-Nucleofector Xユニット及びNucleocuvetteストリップを使用してヌクレオフェクションした。P3原発性細胞キットを、mRNA及びRNP送達の両方に使用した。細胞を、それぞれ、mRNA及びRNP送達のためのEO-115及びEH-115プログラムを使用してトランスフェクトした。細胞を、IL-2、IL-7、及びIL-15（Miltenyi Biotec）を含有するCTS Optimizer T細胞拡張培地（ThermoFisher）でヌクレオフェクション後4日間培養し、その後、Nucleospin TissueゲノムDNA単離キット（Machery Nagel）を使用して収穫した。

40

【0866】

編集効率を決定するために、ヌクレオフィクトされたPBMCを、適切なフルオロフォアコンジュゲート抗体とともにインキュベートし、続いてフローサイトメトリー又はNGSを行った。フローサイトメトリーによる編集効率は、目的の遺伝子のノックアウトパーセントとして報告される。染色効率が完全であることを確認するために、未編集の対照を

50

含めた。編集部位を取り巻くアンプリコンを、PCRによって生成し、実施例4に記載の方法に従って、 2×250 bpのペアエンド配列決定を使用してIllumina Nexteraプラットフォームを使用してNGS配列決定に供した。

【0867】

LPG10136のRNP送達を使用して、10種類の異なるガイドを試験するためにRNPを形成した（図2及び表17を参照されたい）。試験した9つのガイドのうち、1つのガイド、SGN002661のみが、フローサイトメトリーを介したタンパク質ノックアウトによって測定された高レベルの編集を示した。SGN002661は、フローサイトメトリーによって測定した場合、75%を超えるタンパク質ノックアウトを示した。

【0868】

【表18】

表17：LPG10136のRNP送達に使用されるsgRNA

sgRNA名称	sgRNA標的配列配列番号
SGN002654	505
SGN002655	506
SGN002656	507
SGN002657	508
SGN002658	509
SGN002659	510
SGN002660	511
SGN002661	512
SGN002662	513
SGN002663	514

【0869】

実施例11．1目標長さの最適化

PBMCにおけるリボ核タンパク質としてのLPG10145の送達（RNP：シングルガイドRNAと複合体化されたRNA誘導型ヌクレアーゼ）の送達について、ヌクレオフェクションを利用した。これは、DNA、RNA、及び／又はタンパク質の細胞核への移入を可能にするエレクトロポレーションベースの方法である。TRAC遺伝子及びB2M遺伝子は、それらの臨床的関連性及びこれらの遺伝子が細胞表面タンパク質を制御するために標的化され、高スループットのフローサイトメトリーベースの分析を利用できる利便性を提供した。この実験では、スパーサー配列の長さを25個のヌクレオチドから20個のヌクレオチドに短縮して、目的とする2つの標的の編集効率に対するスパーサー長の影響を決定した。単離した末梢血単核細胞（PBMC）を解凍し、CD3／CD28ビーズで活性化し、5%CO₂で37℃でインキュベートした。3日後、ビーズを細胞から取り出した。次いで、細胞を遠心分離によって濃縮し、 1×10^6 個の細胞を各反応に使用できるように、ヌクレオフェクション緩衝液（P3 Solution Lonza）に再懸濁した。RNP（60 pmolのRGN及び120 pmolのガイド）を室温で少なくとも10分間インキュベートした後、PBMCを添加した。細胞+LPG10145+sgRNA反応を、プログラムEH-115（Lonza）を使用して製造業者の指示に従ってヌクレオフェクトした。ヌクレオフェクション後、細胞を10分間休ませ、続いて培地中で1～4日間インキュベートした。編集効率を決定するために、ヌクレオフィクトされた細胞を、適切なフルオロフォアコンジュゲート抗体とともにインキュベートし、続いてフローサイトメトリーを行った。編集効率は、目的の遺伝子のノックアウトパーセントとして報告される。染色効率が完全であることを確認するために、未編集の対照を含

めた。

【0870】

更に、スパーサー長の最適化は、TRAC及びB2Mを標的とする同じガイドを使用して、スパーサーの長さを27個のヌクレオチドから17個のヌクレオチドに拡大しながら、LPG10145のmRNA送達によって確認した。mRNAとしてのLPG10145の送達のために、2 μ gのLPG10145 mRNA及び4 μ gのsgRNAを、反応当たり 3.0×10^4 個の細胞とともにヌクレオフェクション緩衝液（P3溶液）に再懸濁した。細胞を反応物に添加し、プログラムEO-115（Lonza）を使用して製造業者の指示に従ってヌクレオフェクトした。ヌクレオフェクション後、細胞を培養容器に移し、培地中で4日間インキュベートした。フローサイトメトリーによる編集効率の評価を、上述のように行った。

10

【0871】

【表19】

表18：編集に対する標的長さの効果を試験する細胞へのLPG10145のRNP送達

ヌクレアーゼ	SGN	スパーサー長	標的配列番号	フローサイトメトリーによる編集率(複製#1)	フローサイトメトリーによる編集率(複製#2)	フローサイトメトリーによる編集率(複製#3)
なし	非編集対照			10.3	18.1	
LPG10145	SGN002702	25	516	77.1	68.8	80.7
	SGN005121	24	491	90.01	89.3	76.2
	SGN005122	23	492	88.9	90	87.4
	SGN005123	22	493	90.1	91.38	85.2
	SGN005124	21	494	92.61	91.26	85.5
	SGN003018	20	481	83.2	83.6	55.2
LPG10145	SGN002707	25	517	50.4	53	20.6
	SGN005117	24	487	50.1	52.5	19.9
	SGN005118	23	488	50.5	58	22.8
	SGN005119	22	489	NT	NT	21.7
	SGN005120	21	490	NT	NT	19.2
	SGN003023	20	486	57.3	51.5	15.7

20

30

NT＝試験せず

【0872】

40

50

【表 20-1】

表 19 : 編集に対する標的長さの効果を試験する細胞への LPG10145 の mRNA 送達

ヌクレオ ーゼ	SGN	スペーサ ー長	標的配列 番号	フローサイトメトリーによる編 集率(複製1)	フローサイトメトリーによる編 集率(複製2)
なし	非編集			1.1	8
LPG10145	SGN0070 76	17	495	1.1	1.3
	SGN0070 77	18	496	1.1	1.3
	SGN0070 78	19	497	18.1	22.8
	SGN0030 18	20	481	84.8	91.0
	SGN0051 24	21	494	94.1	89.5
	SGN0051 23	22	493	93.58	94.72
	SGN0051 22	23	492	93.61	92.61
	SGN0051 21	24	491	91.85	95.83
	SGN0027 02	25	557	93.40	94.81
	SGN0070 79	26	498	86.8	89.7
	SGN0070 80	27	499	82.3	87.2
なし	非編集			1.4	8
LPG10145	SGN0070 81	17	500	1.3	1.6
	SGN0070 82	18	501	1.3	1.9
	SGN0070 83	19	502	23.7	27.7
	SGN0030 23	20	486	51.4	56.8
	SGN0051 20	21	490	55.0	58.4
	SGN0051 19	22	489	56.7	61.6
	SGN0051 18	23	488	69.8	73.7

10

20

30

40

50

【表 20-2】

ヌクレオ ーゼ	SGN	スペーサ ー長	標的配列 番号	フローサイトメトリーによ る編集率(複製1)	フローサイトメトリーによ る編集率(複製2)
	SGN005 117	24	487	69.7	58.9
	SGN002 707	25	558	55.1	56.9
	SGN007 084	26	503	56.1	63.8
	SGN007 085	27	504	49.1	57.7

10

【0873】

分析

RNP送達を使用し、20～25個のヌクレオチドのスペーサー長を試験して、全てのスペーサー長は、各標的について同様のレベルの編集を示した。最良の編集は、わずかであるが、21～24個のヌクレオチドのスペーサー長で見られた。20～25個のヌクレオチド間の編集にわずかな差があったため、各標的について試験したスペーサー長を拡大し、mRNAで試験した。これらのデータは、RNPデータを裏付け、最高の編集が21～24ヌクレオチドの間のスペーサー長を使用するときであることを定義するのに役立った。

20

【0874】

実施例11.2：RNP用量依存性

RGNの濃度を増加させることが編集を効果的に改善することができるかどうかを理解するために、PBMC細胞編集実験において異なる濃度のRNPを提供した。試験したRNP濃度は、60pモル、90pモル及び120pモルであり、タンパク質：RNAの比は1：2であった。結果は、働くgRNAを用いて、所望の標的上の編集率が、より多くの量のRGNで改善され得ることを示した（表20、及び図3A及び3Bを参照されたい）。

30

【0875】

【表21】

表20：RNP用量依存性実験に使用されるsgRNA

SGN名称	SGN標的配列配列番号
SGN002699	515
SGN003014	477
SGN003015	478
SGN003016	479
SGN003017	480
SGN003018	481
SGN002707	517
SGN003019	482
SGN003020	483
SGN003021	484
SGN003022	485
SGN003023	486

40

50

【 0 8 7 6 】

実施例 1 2 : オフターゲット部位

ヌクレアーゼの特異性を評価するために、オフターゲット編集を、バイオインフォマティクスによって特定された潜在的な部位で決定した。L P G 1 0 1 4 5 の潜在的な標的外部位は、標的配列中に 5 個未満のミスマッチを有し、P A M 配列中に少なくとも 1 つの残基マッチを有する標的によって同定された。

【 0 8 7 7 】

哺乳動物細胞への R N P 送達及び増幅子配列決定のための実施例 1 1 . 1 に記載されるものと同じ方法を使用して、L P G 1 0 1 4 5 の特異性及びオフターゲット編集を試験した。S G N 0 0 3 0 1 7 及び S G N 0 0 3 0 2 3 について高い編集率を有する試料において、表 2 1 における潜在的なオフターゲット位置を潜在的な編集についてアッセイした。表 2 2 のプライマーを使用して、オフターゲット編集を探すために、オンターゲット部位と配列類似性を有する潜在的なオフターゲット部位を増幅した。

【 0 8 7 8 】

【表 2 2 】

表 2 1 : アッセイされたオフターゲット配列

SGN	オフターゲット番号	オフターゲット配列	配列ID
SGN003017	3017-1	TGTCCACGGAGCGAGACAGGGAGG	518
SGN003023	3023-1	ATAGGCAGACAAACTTGTATAGG	519
SGN003023	3023-2	ATAGGCAGACAGACTTGCAGAGG	520
SGN003023	3023-3	ACAGGCAGACAGATTTGTCAGAGG	521
SGN003023	3023-4	AAAGGCAGACAGACATGTCAGTGG	522
SGN003023	3023-5	CTAGGCAGACAGACTTCCTTCCTAGG	523
SGN003023	3023-6	ATGGGGCAGACAGACTTGTACAGG	524
SGN003023	3023-7	ACAGGCAGACAGACTTGCATTTGG	525
SGN003023	3023-8	ATAGGCAGACAGACTTGTTAGAAG	526
SGN003023	3023-9	ATAGGTAGACAGACTTGTCACTGA	527

【 0 8 7 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 2 2 : オフターゲット領域を増幅するために使用されたプライマー

説明	プライマー配列	配列ID
3017-1 FWD	TCTTCGCCTGTGATCTCTGA	528
3023-1 FWD	GCTAGTTCCAGCTGCCTAGG	530
3023-2 FWD	TGAGCCCTTCTTCTGTGCTG	532
3023-3 FWD	AGTGCTAGAGTGATGTGGGA	534
3023-4 FWD	ATCTCCCTCAGTCCAGTCCC	536
3023-5 FWD	CCAGAACATCAGCAGCAAGC	538
3023-6 FWD	AAGGTGGGACTCACTCTGAA	540
3023-7 FWD	CCCTCAGCTCTGACTCCTCT	542
3023-8 FWD	CCTGTCAAGGGAGTGTCTTCT	544
3023-9 FWD	ATGCTCCGCTCCTTGATCTG	546
3017-1 REV	TTGGATGGGATGTCCTGAGG	529
3023-1 REV	CAGTGCGTTTCTCTGGTCCT	531
3023-2 REV	CCTCCAGATCCCCACTACCA	533
3023-3 REV	AGGTCACCTTTGTTGCCATC	535
3023-4 REV	CCATCTCATCCAGTGCCCTC	537
3023-5 REV	CCTGGGTCACTTCCTGTCAC	539
3023-6 REV	ATTTTACTCAAGGCCAGGC	541
3023-7 REV	TGAACTCAGGACCACATGGC	543
3023-8 REV	ATCCTTGCAATCCTCTGAAA	545
3023-9 REV	TCATTCCCTCCCCACTTTCTC	547

【0880】

RNP送達を使用して、試験された2つのガイドで検出可能なオフターゲット編集はなかった。2つのオフターゲット位置は、低レベルのバックグラウンドインデルを示し、これはまた、未編集の対照細胞由来のアンプリコンにも見られた。これらのオフターゲット位置は、表23にアスタリスクで示される、3023-5及び3023-9であった。

【0881】

【表 2 4】

表 2 3 : S G N 0 0 3 0 1 7 及び S G N 0 0 3 0 2 3 の オ フ タ ー ゲ ッ ト 編 集

送達	ガイド	オンターゲット効率	オフターゲット部位	オフターゲット編集
RNP	SGN003017-B 2M	59%	1	0%
RNP	SGN 003023- TRAC	54%	1	0%
			2	0%
			3	0%
			4	0.11%
			5	0.07%*
			6	0.49%
			7	0%
			8	0%
			9	0.14*

【0882】

実施例 1 3 : L P G 1 0 1 4 5 の グ リ シ ン 走 査

グリシン変異及び挿入の決定

L P G 1 0 1 4 5 の タ ン パ ク 質 配 列 を D y n a m i n e ウ ェ ブ サ ー バ を 介 し て 実 行 し、各残基の S 2 予測スコアを提供し、その残基の骨格の剛性及び柔軟性を推定した。スコアは、1（リジッド）から0（高ダイナミック）の範囲である。近くの残基がグリシンリッチ領域（互いに隣接する2つのグリシンとして定義される）でない限り、スコアが0.72未満の残基をグリシンに変異させた。グリシンの挿入部位を、0.72よりも高いが0.75未満のスコアを有し、グリシンに隣接する可撓性領域として選択した。これらの挿入部位をL P G 1 0 1 4 5 相 同 性 モ デ ル に も マ ッ ピ ン グ し て、それらが可撓性領域にあると予測されたかどうかを確認した。

【0883】

哺乳動物細胞におけるL P G 1 0 1 4 5 グリシン変異体のスクリーニング活性

グリシン変異体を、2つの異なるガイド（S G N 0 0 3 0 1 4 及び S G N 0 0 3 0 1 8）を使用して、H E K 2 9 3 T 細胞におけるベクター2-ミクログロブリン（B 2 M）のエクソン1を編集する能力において、親L P G 1 0 1 4 5 と比較した。これらのガイドは、親L P G 1 0 1 4 5 を用いた中程度から低レベルの編集のために選択され、飽和（最適）編集条件並びに非飽和（準最適）条件で試験された。最適な編集条件を、前日に10,000個の細胞で播種された細胞のL i p o f e c t a m i n e 3 0 0 0 を使用して、L P G 1 0 1 4 5 又はL P G 1 0 1 4 5 バリエーションをコードするプラスミド160ng及びガイドをコードするプラスミド40ngを使用して、プラスミドリポフェクションで実行した。L P G 1 0 1 4 5 又はL P G 1 0 1 4 5 バリエーションをコードする40ngのプラスミドDNA及び40ngのガイドコードプラスミドを使用して、前日に10,000個

の細胞で播種した細胞のプラスミドリポフェクションを用いて、最適ではない編集条件を実行した。細胞を37℃及び5% CO₂で2日間インキュベートし、ゲノムDNAを抽出し、PCRによって標的領域を増幅し、NGS配列決定のために提出した。

【0884】

【表25-1】

表24：LPG10145グリシン変異体の活性

	WTに正規化された編集(WT=1)		編集%	
LPG10145構築物	SGN003014	SGN003018	SGN003014	SGN003018
pLEM145v3.1	1	1	48.1*	47.99*
S44G	0.417464	0.760913	20.08	36.52
S46G	0.533056	0.715908	25.64	34.36
A47G	0.582952	0.86384	28.04	41.46
S48G	0.470686	0.784665	22.64	37.66
R49G	0.427651	0.663611	20.57	31.85
N50G	0.486071	0.823627	23.38	39.53
E51G	0.437006	0.816543	21.02	39.19
E52G	0.497089	0.779039	23.91	37.39
F82G	0.356133	0.97531	17.13	46.81
P83G	0.588773	0.879675	28.32	42.22
F84G	0.363825	0.711741	17.5	34.16
P85G	0.530977	0.590895	25.54	28.36
N87G	0.512266	0.661527	24.64	31.75
T88G	0.848233	1.050526	40.8	50.42
A90G	0.809979	1.05636	38.96	50.7
N91G	0.613929	0.94864	29.53	45.53
S133G	0.728067	0.943223	35.02	45.27
N138G	0.59106	0.89926	28.43	43.16
L176G	0.735759	0.831128	35.39	39.89
E178G	0.681289	0.979685	32.77	47.02
P234G	0.499376	1.005521	24.02	48.26
S236G	0.641372	0.921763	30.85	44.24
E237G	0.66736	0.874883	32.1	41.99
K238G	0.449688	0.653401	21.63	31.36
S239G	0.434719	0.699865	20.91	33.59
S334G	0.642204	0.965934	30.89	46.36

10

20

30

40

50

【表 25 - 2】

	WTに正規化された編集(WT=1)		編集%	
LPG10145構築物	SGN003014	SGN003018	SGN003014	SGN003018
P335G	0.571102	0.891134	27.47	42.77
A336G	0.567775	0.996562	27.31	47.83
P349G	0.81684	1.158871	39.29	55.62
V428G	0.892931	1.282217	42.95	61.54
K544G	0.645946	0.936973	31.07	44.97
Q623G	0.72578	1.020106	34.91	48.96
N624G	0.645114	0.765496	31.03	36.74
S647G	0.707069	0.950099	34.01	45.6
N740G	0.798753	0.892385	38.42	42.83
K741G	0.124116	0.379623	5.97	18.22
S742G	0.57131	0.806126	27.48	38.69
R743G	0.44657	0.729243	21.48	35
E744G	0.975468	1.079487	46.92	51.81
T745G	0.66736	0.931972	32.1	44.73
H746G	0.646778	0.87905	31.11	42.19
M827G	0.804366	1.009063	38.69	48.43
N828G	0.573181	0.736118	27.57	35.33
V844G	0.811019	1.010314	39.01	48.49
P910G	0.778794	1.091572	37.46	52.39
N911G	0.862162	1.035733	41.47	49.71
N939G	0.69605	0.981561	33.48	47.11
N940G	0.478378	0.624857	23.01	29.99
P942G	0.418295	0.652985	20.12	31.34
N1044G	0.632848	1.013647	30.44	48.65
N1058G	0.980873	0.905928	47.18	43.48
P1059G	0.597713	0.925721	28.75	44.43
A1060G	0.755094	1.068236	36.32	51.27
G429	0.822661	1.020523	39.57	48.98
G473	0.707692	1.057819	34.04	50.77
G592	0.729314	0.777164	35.08	37.3
G845	0.834096	0.945515	40.12	45.38
G930	0.797089	1.009689	38.34	48.46

* 親WT対照の編集は、2回の反復の平均である

【0885】

実施例14：LPG10145の堅牢性試験

実施例14.1：プラスミド送達による哺乳動物細胞における複数の標的遺伝子座でのLPG10145編集のスクリーニング

いくつかの遺伝子を標的とするガイドを、プラスミド送達によるHEK293T細胞における堅牢性試験のために設計した。これらのガイドを、1日目に10,000個の細胞を播種し、2日目にLipofectamine 3000を使用してリポフェクションを行い、4日目にゲノムDNA抽出を含む96ウェルプレート中のHEK293T細胞について、最適な編集条件下で試験した。リポフェクションは、160ngのLPG101

45をコードするプラスミドと40ngのガイドをコードするプラスミドと、0.4μlのp3000をOpti-MEM中で混合することによって実行した。次に、Opti-MEMで希釈した0.3μlのLipofectamine 3000をプラスミド混合物に添加し、細胞に添加する前に15分間インキュベートした。各ガイドの編集部位周辺の領域を抽出されたゲノムDNAから増幅し、実施例4に記載されるようにNGSによって配列決定する。各ガイドでのLPG10145の編集効率は、編集パーセント（標的部位でのINDELSのパーセント）として報告される。試験した32のガイドのうち、LPG10145は、ガイドの43.7%（14／32ガイド）で20%を超える編集を示し、試験したガイドの53%（17／32ガイド）で10%を超える編集を行った。
【0886】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表 2 5 : H E K 2 9 3 T 細胞におけるプラスミド送達による L P G 1 0 1 4 5 による堅牢な編集

ガイド	遺伝子名	編集%	ガイド当たりの複製
SGN006164	遺伝子A	0.6	1
SGN006165	遺伝子A	1.07	1
SGN006166	遺伝子A	17.83	1
SGN006167	遺伝子A	4.86	1
SGN006168	遺伝子A	0.78	1
SGN006169	遺伝子A	6.315	2
SGN006170	遺伝子A	40.59	2
SGN002707	TRAC	34.87	2
SGN002703	TRAC	6.555	2
SGN006172	TRAC	29.745	2
SGN006173	TRAC	31.86	2
SGN006174	TRAC	26.595	2
SGN006175	TRAC	20.83	2
SGN006176	B2M	9.61	2
SGN002700	B2M	10.615	2
SGN006178	B2M	23.975	2
SGN006179	B2M	45.445	2
SGN006180	B2M	0.895	2
SGN006181	B2M	4.465	2
SGN006182	B2M	32.365	2
SGN006183	遺伝子B	5.595	2
SGN006184	遺伝子B	11.065	2
SGN006185	遺伝子B	9.09	2
SGN006186	遺伝子B	22.7	2
SGN006187	遺伝子C	31.87	2
SGN006188	遺伝子C	0.065	2
SGN006189	遺伝子C	35.725	2
SGN006190	遺伝子C	4.325	2
SGN006192	遺伝子C	3.4	2
SGN006193	遺伝子C	2.24	1
SGN003014	B2M	34.41	2
SGN003018	B2M	56.51	2

【0887】

実施例 15 : L P G 1 0 1 4 5 再現性スクリーニング

L P G 1 0 1 4 5 編集再現性を評価するために、L P G 1 0 1 4 5 を、T 細胞中のリボ核タンパク質複合体として、ヌクレオフェクションを介して送達した。R N P 送達のための方法及びアンプリコン配列決定を通して読み出される実験方法を実施例 11 に記載されるように実施した。ここで、異なる遺伝子を標的とする複数の s g R N A を利用して、50 % 未満の変動係数 (C V) 値を返す全てのガイドを用いた L P G 1 0 1 4 5 編集の再現性を示した (図 4) 。

10

20

30

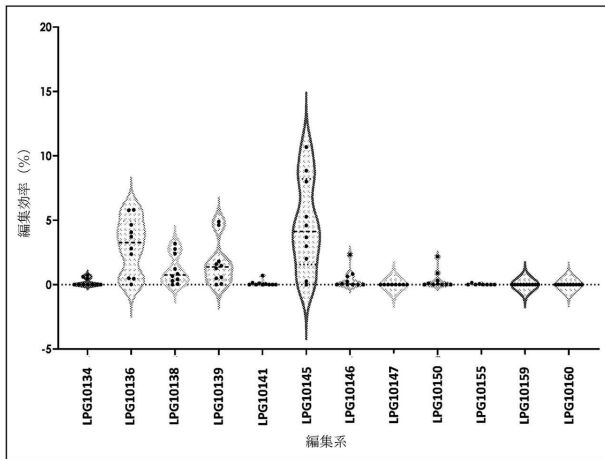
40

50

【図面】

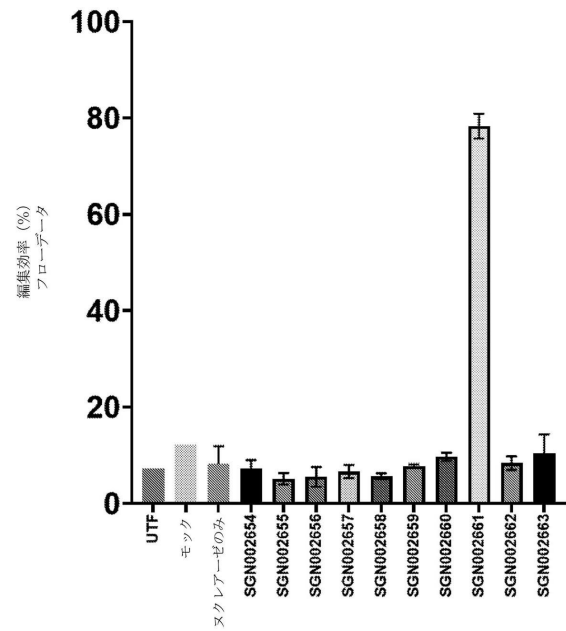
【図 1】

図 1



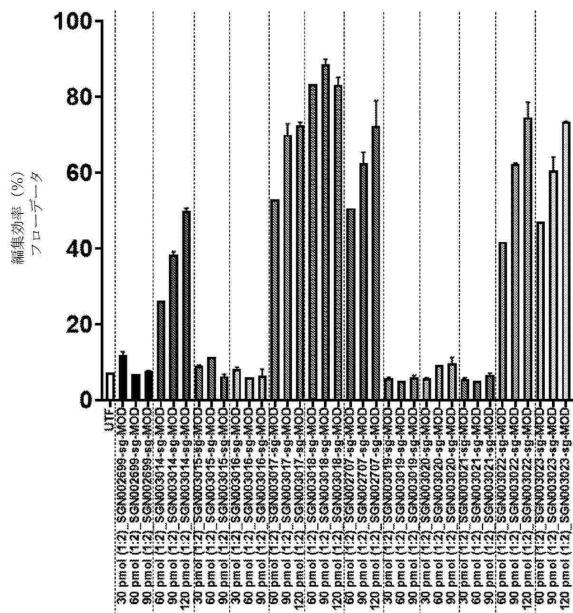
【図 2】

図 2



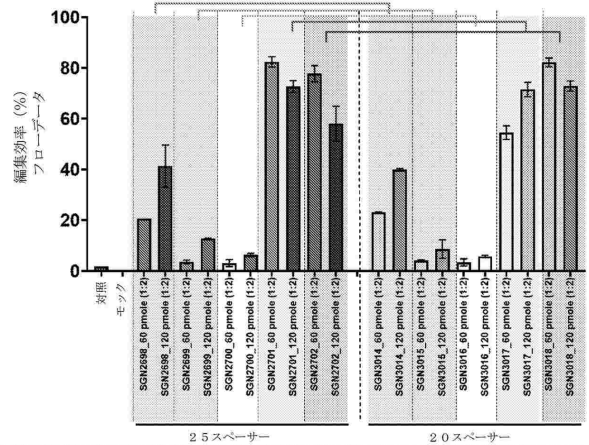
【図 3 A】

図 3 A



【図 3 B】

図 3 B



10

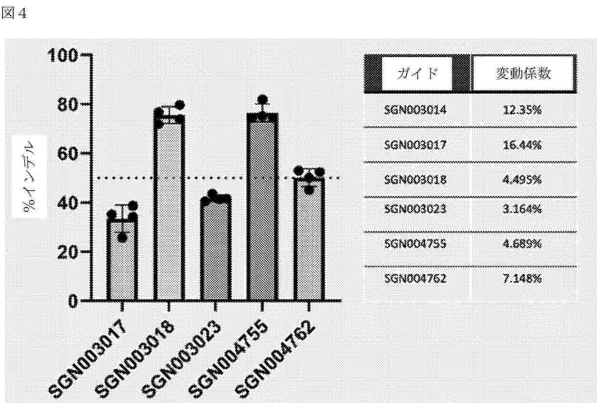
20

30

40

50

【 図 4 】



10

【 配 列 表 】

202550489800001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2023/050560

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C12N15/10 C12N9/22 A61P3/00 A61P7/00 A61P21/00	
	A61P25/28	
ADD.		
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) C12N A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU LINA ET AL: "Genome-Based Taxonomy of Brevundimonas with Reporting Brevundimonas huaxiensis sp. nov.", MICROBIOLOGY SPECTRUM, vol. 9, no. 1, 3 September 2021 (2021-09-03), XP093034790, DOI: 10.1128/Spectrum.00111-21	1, 2, 4-7, 18, 26, 27, 31, 33, 34, 36-39, 48, 50, 51, 54, 55, 58, 61-69, 80, 81, 83, 85, 86, 88-92, 94, 101-105, 115-118, 121-124, 126, 131, 133, 141,
	-/--	
☒ 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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 June 2023		Date of mailing of the international search report 29/06/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Salminen, Aaro

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2023/050560

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:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2023/050560

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.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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:

see additional sheet

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 an 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.:
1-147 (partially)
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.:

30

40

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 application No
PCT/IB2023/050560

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	figure 1 -----	143, 146, 147
X	US 2010/192451 A1 (PONNUSAMY LOGANATHAN [US] ET AL) 5 August 2010 (2010-08-05) examples 5, 10-12; table 1 -----	1, 2, 4-7, 18, 26, 27, 31, 33, 34, 36-39, 48, 50, 51, 54, 55, 58, 61-69, 80-83, 85, 86, 88-92, 94, 101-105, 115-118, 121-124, 126, 127, 131, 133, 141, 143, 146, 147
X	DATABASE UniProtKB [Online] 8 May 2019 (2019-05-08), N/a: "CRISPR-associated endonuclease Cas9 (Enterococcus asini)", XP093053981, Database accession no. A0A413AJC9 the whole document -----	1-125, 127-147
A	SCHMIDT MORITZ J. ET AL: "Improved CRISPR genome editing using small highly active and specific engineered RNA-guided nucleases", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 12, no. 1, 9 July 2021 (2021-07-09), pages 1-12, XP93034439, DOI: 10.1038/s41467-021-24454-5 the whole document -----	1-147
A	WO 2021/248016 A2 (EMENDO BIO INC [US]; IZHAR LIOR [IL] ET AL.) 9 December 2021 (2021-12-09) the whole document -----	1-147
A	US 2021/403925 A1 (CHEVESSIER-TÜNNESSEN FRÉDÉRIC [DE] ET AL) 30 December 2021 (2021-12-30) the whole document -----	1-147

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2023/050560

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CAROLIN ANDERS ET AL: "Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease", EUROPE PMC FUNDERS GROUP AUTHOR MANUSCRIPT, vol. 513, no. 7519, 27 July 2014 (2014-07-27), pages 1-22, XP055538018, DOI: 10.1038/nature13579 the whole document -----	1-147
A	DANIEL H. HAFT ET AL: "A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes", PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY, vol. 1, no. 6, 1 January 2005 (2005-01-01) , page e60, XP055445295, US ISSN: 1553-734X, DOI: 10.1371/journal.pcbi.0010060 the whole document & DATABASE RefSeq [Online]	1-147
A,P	1 May 2022 (2022-05-01), Haft D H: "type II CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 [Enterococcus asini]", XP93054269, Database accession no. WP_231453593.1 the whole document -----	1-147

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

International Application No. PCT/IB2023/050560

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10134 (SEQ ID NO: 1) and related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 13 and 25)

2. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10136 (SEQ ID NO: 2) and related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 14 and 26)

3. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10138 (SEQ ID NO: 3) and related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 15 and 27)

4. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10139 (SEQ ID NO: 4) and related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 16 and 28)

5. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10141 (SEQ ID NO: 5) and related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 17 and 29)

6. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10145 (SEQ ID NO: 6) and related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 18 and 30)

7. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10146 (SEQ ID NO: 7) and related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 19 and 31)

8. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10147 (SEQ ID NO: 8) and related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 20 and 32)

9. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10150 (SEQ ID NO: 9) and related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 21 and 33)

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/IB2023/050560

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

10. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10155 (SEQ ID NO: 10) and
related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 22 and 34)

11. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10159 (SEQ ID NO: 11) and
related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 23 and 35)

12. claims: 1-147 (partially)

RNA-guided nuclease labeled LPG10160 (SEQ ID NO: 12) and
related crRNA and tracrRNA sequences (SEQ ID NOs: 24 and 36)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2023/050560

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010192451 A1	05-08-2010	NONE	
WO 2021248016 A2	09-12-2021	AU 2021285983 A1	02-02-2023
		CA 3179130 A1	09-12-2021
		CN 116157514 A	23-05-2023
		EP 4162039 A2	12-04-2023
		IL 298706 A	01-02-2023
		KR 20230056630 A	27-04-2023
		US 2023122086 A1	20-04-2023
		WO 2021248016 A2	09-12-2021
US 2021403925 A1	30-12-2021	AU 2018240515 A1	01-08-2019
		BR 112019015244 A2	14-04-2020
		CA 3050616 A1	27-09-2018
		CN 110914433 A	24-03-2020
		EP 3601576 A1	05-02-2020
		JP 2020513824 A	21-05-2020
		KR 20190133699 A	03-12-2019
		RU 2019132890 A	26-04-2021
		SG 10202110491P A	29-11-2021
		SG 11201906297Q A	30-10-2019
		US 2021403925 A1	30-12-2021
		WO 2018172556 A1	27-09-2018

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22	
C 1 2 N	9/12 (2006.01)	C 1 2 N	9/12	
C 1 2 N	9/78 (2006.01)	C 1 2 N	9/78	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/46	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,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,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,V
N,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 池田 達則

(74)代理人 100203828

弁理士 喜多村 久美

(72)発明者 グンジャン エイチ. アリア

アメリカ合衆国, ノース カロライナ 2 7 5 1 8, ケーリー, ロジェ ドライブ 8 5 4 4

(72)発明者 マイケル コイル

アメリカ合衆国, ノース カロライナ 2 7 5 1 4, チャペル ヒル, ノース エリオット ロード
4 0 7

(72)発明者 アレグザンドラ ブライナー クロウリー

アメリカ合衆国, ノース カロライナ 2 7 5 1 1, ケーリー, スコット プレイス 1 2 2 0

(72)発明者 テッド ディー. エリック

アメリカ合衆国, ノース カロライナ 2 7 7 0 5, ダーラム, アラムウッド プレイス 5

(72)発明者 ジョエル エス. パーカー

アメリカ合衆国, ノース カロライナ 2 7 5 0 2, アペックス, トスカ トレイル 2 6 5 1

F ターム (参考) 4B065 AA26X AB01 BA01 BA02 BA05 CA29 CA44

4C084 AA02 AA07 AA13 BA44 CA53 DC22 NA14 ZA021 ZA022 ZA221

ZA222 ZA551 ZA552 ZB211 ZB212 ZC211 ZC212

4C086 AA01 AA03 EA16 MA04 NA14 ZA02 ZA22 ZA55 ZB21 ZC21

4C087 AA01 AA03 BB65 BC83 NA14 ZA02 ZA22 ZA55 ZB21 ZC21