

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-534575
(P2024-534575A)

(43)公表日 令和6年9月20日(2024.9.20)

(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 1 0	4 C 0 7 6
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 4
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全305頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-518410(P2024-518410)			(71)出願人	522352030
(86)(22)出願日	令和4年9月22日(2022.9.22)				ヴァーヴ・セラピューティクス、インコーポレーテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年5月22日(2024.5.22)				アメリカ合衆国マサチューセッツ州02215、ボストン、ブルックライン・アベニュー 201、スイート 601
(86)国際出願番号	PCT/US2022/044453				
(87)国際公開番号	WO2023/049299				
(87)国際公開日	令和5年3月30日(2023.3.30)				
(31)優先権主張番号	63/247,236			(74)代理人	100118902
(32)優先日	令和3年9月22日(2021.9.22)				弁理士 山本 修
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100106208
(31)優先権主張番号	63/255,333				弁理士 宮前 徹
(32)優先日	令和3年10月13日(2021.10.13)			(74)代理人	100196508
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 松尾 淳一
(31)優先権主張番号	63/389,679			(74)代理人	100122644
					弁理士 寺地 拓己
				(72)発明者	ベリンジャー、アンドリュウ・エム
			最終頁に続く	最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 P C S K 9又はANGPTL3の遺伝子編集、並びに疾患の治療のためにそれらを使用する組成物及び方法

(57)【要約】

脂質ナノ粒子薬学的製剤を介して対象に静脈内に送達され、高いオンターゲット遺伝子編集効率、減少したか又は低いオフターゲット効率で、かつ生殖細胞系列編集を伴わない、ANGPTL3などの標的遺伝子の耐久性のあるインビボ編集を実現することができる新規の遺伝子編集系が本明細書に開示される。遺伝子編集系は、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの特定の配列を有するスペーサーを有する化学的に改変されたガイド核酸配列を含む。新規の遺伝子編集系は、改変されたニッカーゼ構成要素を含み得る、遺伝子エディタータンパク質をコードするmRNAを含む。遺伝子編集系を使用する疾患治療の方法もまた開示される。

【選択図】 図1

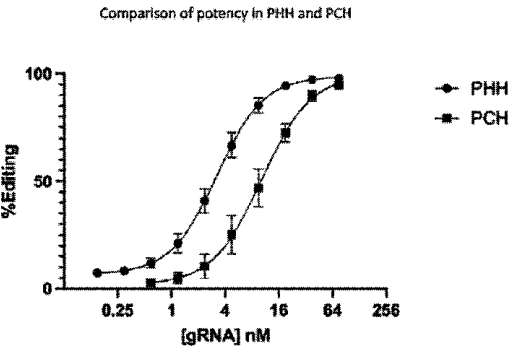


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インビボハイブリッドガイド遺伝子編集系であって、

(a) 核酸結合ドメインを含む遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素、又は前記遺伝子エディタータンパク質若しくは前記その構成要素をコードする核酸と、

(b) (i) デオキシリボヌクレオチド、及びリボースを含むリボヌクレオチドを含むスペーサー配列であって、前記リボースの 2' ヒドロキシル基が、メチル基に共有結合している (2' - OMe)、スペーサー配列、並びに (ii) 前記遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素のための結合足場を含む、ハイブリッドガイド核酸と、を含み、

10

(a) 及び (b) が、(a) 又は (b) を含有する脂質ナノ粒子 (LNP) を含む薬学的組成物を構成する構成要素であり、前記 LNP が、アミノ脂質、リン脂質、ステロール、及び PEG 脂質を含む、インビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項 2】

前記スペーサー配列が、標的遺伝子上のプロトスペーサーに対応し、前記標的遺伝子が、ANGPTL3 である、請求項 1 に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項 3】

前記遺伝子エディタータンパク質若しくは前記その構成要素が、デアミナーゼを含む、請求項 1 に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項 4】

20

インビボハイブリッドガイド遺伝子編集系であって、

(a) 核酸結合ドメインを含む遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素、又は前記遺伝子エディタータンパク質若しくは前記その構成要素をコードする核酸と、

(b) (i) デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含むスペーサー配列であって、前記スペーサー配列が、ANGPTL3 遺伝子上のプロトスペーサーに対応する、スペーサー配列、並びに (ii) 前記遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素のための結合足場を含む、ハイブリッドガイド核酸と、を含み、

(a) 及び (b) が、(a) 又は (b) を含有する脂質ナノ粒子 (LNP) を含む薬学的組成物を構成する構成要素であり、前記 LNP が、アミノ脂質、リン脂質、ステロール、及び PEG 脂質を含む、インビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

30

【請求項 5】

前記遺伝子エディタータンパク質若しくは前記その構成要素が、デアミナーゼを含む、請求項 4 に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項 6】

前記リボヌクレオチドが、リボースを含み、前記リボースが、メチル基に共有結合した 2' ヒドロキシル基 (2' - OMe) を含む、請求項 4 に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項 7】

インビボハイブリッドガイド遺伝子編集系であって、

(a) 核酸結合ドメイン及びデアミナーゼを含む遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素、又は前記遺伝子エディタータンパク質若しくは前記その構成要素をコードする核酸と、

40

(b) (i) デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含むスペーサー配列、並びに (ii) 前記遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素のための結合足場を含む、ハイブリッドガイド核酸と、を含み、

(a) 及び (b) が、(a) 又は (b) を含有する脂質ナノ粒子 (LNP) を含む薬学的組成物を構成する構成要素であり、前記 LNP が、アミノ脂質、リン脂質、ステロール、及び PEG 脂質を含む、インビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項 8】

前記スペーサー配列が、標的遺伝子上のプロトスペーサーに対応し、前記標的遺伝子が

50

、ANGPTL3である、請求項7に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項9】

前記リボヌクレオチドが、リボースを含み、前記リボースが、メチル基に共有結合した2'ヒドロキシル基(2'-OMe)を含む、請求項7に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項10】

前記スペーサー配列が、非改変リボヌクレオチドを含む、請求項1～9のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項11】

前記遺伝子エディタータンパク質若しくは前記その構成要素をコードする前記核酸が、mRNAである、請求項1～10のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

10

【請求項12】

前記遺伝子エディタータンパク質若しくは前記その構成要素が、単一融合タンパク質又は2つ以上のタンパク質を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項13】

前記スペーサー配列が、ホスホロチオエート骨格改変(PS)を含む、請求項1～12のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項14】

20

前記スペーサー配列が、(2'-OMe)PS(2'-OMe)PS(DNA)PS(DNA)(RNA)(DNA)(DNA)(DNA)モチーフを含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項15】

前記(2'-OMe)PS(2'-OMe)PS(DNA)PS(DNA)(RNA)(DNA)(DNA)(DNA)モチーフが、前記スペーサー配列の5'末端に位置する、請求項14に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項16】

前記スペーサー配列が、配列番号30又は31の少なくとも約80%、約90%、約95%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

30

【請求項17】

前記スペーサー配列が、(2'-OMe)PS(2'-OMe)PS(DNA)PS(DNA)(RNA)(DNA)(DNA)モチーフを含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項18】

前記(2'-OMe)PS(2'-OMe)PS(DNA)PS(DNA)(RNA)(DNA)(DNA)モチーフが、前記スペーサー配列の5'末端に位置する、請求項17に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

40

【請求項19】

前記スペーサー配列が、配列番号28又は29の少なくとも約80%、約90%、約95%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項20】

前記スペーサー配列が、(2'-OMe)PS(2'-OMe)PS(DNA)PS(DNA)(DNA)(DNA)(DNA)モチーフを含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項21】

50

前記(2'-OMe)PS(2'-OMe)PS(DNA)PS(DNA)(DNA)(DNA)(DNA)モチーフが、前記スペーサー配列の5'末端に位置する、請求項20に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項22】

前記スペーサー配列が、配列番号5、11又は12の少なくとも約80%、約90%、約95%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項23】

前記ハイブリッドガイド核酸が、配列番号110～113からなる群から選択される配列の少なくとも約80%、約90%、約95%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項24】

前記ハイブリッドガイド核酸が、配列番号106～109からなる群から選択される配列の少なくとも約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項25】

前記ガイド核酸が、配列番号79～82からなる群から選択される配列の少なくとも約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項26】

前記核酸結合ドメインが、DNAに結合することができる、請求項1～25のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項27】

前記核酸結合ドメインが、RNAに結合することができる、請求項1～25のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項28】

前記デオキシリボヌクレオチドが、前記スペーサー配列の5'末端から位置3、4、6、7又は8に位置する、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項29】

前記スペーサー配列が、前記スペーサー配列の5'末端から位置3、4、6及び7にデオキシリボヌクレオチドを含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項30】

前記スペーサー配列が、前記スペーサー配列の5'末端から位置3及び4にデオキシリボヌクレオチドを含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項31】

前記スペーサー配列が、前記スペーサー配列の5'末端から位置6及び7にデオキシリボヌクレオチドを含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項32】

前記スペーサー配列が、前記スペーサー配列の5'末端から位置3、4、6、7及び8にデオキシリボヌクレオチドを含む、請求項1～13のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項33】

10

20

30

40

50

前記スパーサー配列が、1～10個のデオキシリボヌクレオチドを含む、請求項1～32のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項34】

前記スパーサー配列が、1～5個のデオキシリボヌクレオチドを含む、請求項1～32のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項35】

前記DNA結合ドメインが、CRISPRタンパク質又はその断片を含む、請求項1～34のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項36】

前記DNA結合ドメインが、触媒的に損なわれたヌクレアーゼを含む、請求項1～34のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。 10

【請求項37】

前記DNA結合ドメインが、プライム編集タンパク質又はその断片を含む、請求項1～34のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項38】

前記遺伝子エディタータンパク質又は前記その構成要素が、前記デオキシリボヌクレオチドを含まない対応するgRNAを含む遺伝子編集系と比較して、全てのオフターゲット部位に対して約10%未満、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、又は約1%未満の編集に影響を及ぼす、請求項1～34のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。 20

【請求項39】

前記遺伝子エディタータンパク質又は前記その構成要素が、前記デオキシリボヌクレオチドを含まない対応するgRNAを含む遺伝子編集系と比較して、前記標的遺伝子に対して約50%を超える、約60%を超える、約70%を超える、約80%を超える、約90%を超える、又は約95%を超える編集に影響を及ぼす、請求項1～38のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項40】

前記遺伝子エディタータンパク質又は前記その構成要素が、前記デオキシリボヌクレオチドを含まない対応するgRNAを含む遺伝子編集系と比較して、前記標的遺伝子に対して約95%を超える、約96%を超える、約97%を超える、約98%を超える、又は約99%を超える編集に影響を及ぼす、請求項1～38のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。 30

【請求項41】

前記遺伝子エディタータンパク質又は前記その構成要素が、前記デオキシリボヌクレオチドを含まない対応するgRNAを含む遺伝子編集系と比較して、前記標的遺伝子に対して約95%～約99%の編集に影響を及ぼす、請求項1～38のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項42】

前記LNPが、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）脂質受容体標的化コンジュゲートを含む、請求項1～41のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。 40

【請求項43】

前記標的遺伝子が、肝臓、又は肝臓起源の細胞若しくは組織で発現される、請求項1～42のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項44】

前記標的遺伝子が、非肝臓器官、又は非肝臓起源の細胞若しくは組織で発現される、請求項1～43のいずれか1項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系。

【請求項45】

アテローム動脈硬化性心血管疾患を治療又は予防することを必要とする対象においてそれを行うための方法であって、前記方法が、前記対象に、治療有効量の請求項1～44の 50

いずれか 1 項に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系を投与することを含む、方法。

【請求項 4 6】

前記対象が、霊長類である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記霊長類が、ヒトである、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

遺伝子編集系であって、

(a) 核酸結合ドメインを含む遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素、又は前記遺伝子エディタータンパク質若しくは前記その構成要素をコードする核酸と、

10

(b) スペーサー配列を含むハイブリッドガイド核酸であって、前記スペーサー配列が、デオキシリボヌクレオチド、及びリボースを含むリボヌクレオチドを含み、前記リボースの 2' ヒドロキシル基が、メチル基に共有結合している (2'-OMe)、ハイブリッドガイド核酸と、を含む、遺伝子編集系。

【請求項 4 9】

遺伝子編集系であって、

(a) 核酸結合ドメインを含む遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素、又は前記遺伝子エディタータンパク質若しくは前記その構成要素をコードする核酸と、

(b) スペーサー配列を含むハイブリッドガイド核酸であって、前記スペーサー配列が、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含み、前記スペーサー配列が、A N G P T L 3 遺伝子上のプロトスペーサーに対応する、ハイブリッドガイド核酸と、を含む、遺伝子編集系。

20

【請求項 5 0】

遺伝子編集系であって、

(a) 核酸結合ドメイン及びデアミナーゼを含む遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素、又は前記遺伝子エディタータンパク質若しくは前記その構成要素をコードする核酸と、

(b) スペーサー配列を含むハイブリッドガイド核酸であって、前記スペーサー配列が、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含む、ハイブリッドガイド核酸と、を含む、遺伝子編集系。

30

【請求項 5 1】

遺伝子編集系のためのハイブリッドガイド核酸であって、ハイブリッドガイドが、(i) デオキシリボヌクレオチド、及びリボースを含むリボヌクレオチドを含むスペーサー配列であって、前記リボースの 2' ヒドロキシル基が、メチル基に共有結合している (2'-OMe)、スペーサー配列と、(ii) 結合足場と、を含む、ハイブリッドガイド核酸。

【請求項 5 2】

前記スペーサー配列が、(2'-OMe) P S (2'-OMe) P S (DNA) P S (DNA) (RNA) (DNA) (DNA) (DNA) モチーフを含む、請求項 5 1 に記載のハイブリッドガイド核酸。

【請求項 5 3】

前記 (2'-OMe) P S (2'-OMe) P S (DNA) P S (DNA) (RNA) (DNA) (DNA) (DNA) モチーフが、前記スペーサー配列の 5' 末端に位置する、請求項 5 2 に記載のハイブリッドガイド核酸。

40

【請求項 5 4】

前記スペーサー配列が、配列番号 3 0 又は 3 1 の少なくとも約 8 0 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 9 %、約 9 9 . 5 %、又は約 1 0 0 % の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項 5 1 に記載のハイブリッドガイド核酸。

【請求項 5 5】

前記スペーサー配列が、(2'-OMe) P S (2'-OMe) P S (DNA) P S (DNA) (RNA) (DNA) (DNA) モチーフを含む、請求項 5 1 に記載のハイブリッド

50

ドガイド核酸。

【請求項 56】

前記 (2'-OMe)PS (2'-OMe)PS (DNA)PS (DNA) (RNA) (DNA) (DNA) モチーフが、前記スパーサー配列の 5' 末端に位置する、請求項 55 に記載のハイブリッドガイド核酸。

【請求項 57】

前記スパーサー配列が、配列番号 28 又は 29 の少なくとも約 80 %、約 90 %、約 95 %、約 99 %、約 99.5 %、又は約 100 % の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項 51 に記載のハイブリッドガイド核酸。

【請求項 58】

前記スパーサー配列が、(2'-OMe)PS (2'-OMe)PS (DNA)PS (DNA) (DNA) (DNA) モチーフを含む、請求項 51 に記載のハイブリッドガイド核酸。

【請求項 59】

前記 (2'-OMe)PS (2'-OMe)PS (DNA)PS (DNA) (DNA) (DNA) モチーフが、前記スパーサー配列の 5' 末端に位置する、請求項 58 に記載のハイブリッドガイド核酸。

【請求項 60】

前記スパーサー配列が、配列番号 5、11 又は 12 の少なくとも約 80 %、約 90 %、約 95 %、約 99 %、約 99.5 %、又は約 100 % の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項 51 に記載のハイブリッドガイド核酸。

【請求項 61】

前記ハイブリッドガイド核酸が、配列番号 110 ~ 113 からなる群から選択される配列の少なくとも約 80 %、約 90 %、約 95 %、約 99 %、約 99.5 %、又は約 100 % の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項 51 に記載のハイブリッドガイド核酸。

【請求項 62】

前記ハイブリッドガイド核酸が、配列番号 106 ~ 109 からなる群から選択される配列の少なくとも約 80 %、約 90 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %、又は約 100 % の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項 51 に記載のハイブリッドガイド核酸。

【請求項 63】

前記ガイド核酸が、配列番号 79 ~ 82 からなる群から選択される配列の少なくとも約 80 %、約 90 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、約 99.5 %、又は約 100 % の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む、請求項 51 に記載のハイブリッドガイド核酸。

【請求項 64】

Cas9 ニッケアゼを含む組成物であって、前記 Cas9 ニッケアゼが、変異を含み、前記変異が、配列番号 695 の Cas9 ニッケアゼと比較して、N692A、M694A、Q695A、H698A、K810A、K855A、K848A、K1003A、R1060A からなる群から選択される、組成物。

【請求項 65】

前記 Cas9 ニッケアゼが、配列番号 695 に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列を含む、請求項 64 に記載の組成物。

【請求項 66】

前記 Cas9 ニッケアゼが、配列番号 695 に対して少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含む、請求項 64 に記載の組成物。

【請求項 67】

前記 Cas9 ニッケアゼが、配列番号 695 に対して少なくとも 98 % の同一性を有する配列を含む、請求項 64 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 68】

前記 Cas9 ニッカーゼが、配列番号 695 に対して少なくとも 99% の同一性を有する配列を含む、請求項 64 に記載の組成物。

【請求項 69】

前記 Cas9 ニッカーゼが、配列番号 695 に対して少なくとも 99.5% の同一性を有する配列を含む、請求項 64 に記載の組成物。

【請求項 70】

前記変異が、前記配列番号 695 の Cas9 ニッカーゼと比較して、N692A、M694A、Q695A 及び H698A を含む、請求項 64～69 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 71】

前記変異が、前記配列番号 695 の Cas9 ニッカーゼと比較して、K855A を含む、請求項 64～69 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 72】

前記変異が、前記配列番号 695 の Cas9 ニッカーゼと比較して、K848A、K1003A 及び R1060A を含む、請求項 64～69 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 73】

前記変異が、前記配列番号 695 の Cas9 ニッカーゼと比較して、K810A、K1003A、R1060A を含む、請求項 64～69 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 74】

Cas9 ニッカーゼをコードする核酸を含む組成物であって、前記 Cas9 ニッカーゼをコードする前記核酸が、変異を含み、前記変異が、配列番号 694 の核酸と比較して、コドン 692 の AAC が GCC に変異すること、コドン 694 の AUG が GCC に変異すること、コドン 695 の CAG が GCC に変異すること、コドン 698 の CAC が GCC に変異すること、コドン 855 の AAG が GCC に変異すること、コドン 810 の AAG が GCC に変異すること、コドン 848 の AAG が GCC に変異すること、コドン 1003 の AAG が GCC に変異すること、及びコドン 1060 の CGG が GCC に変異することからなる群から選択される、組成物。

20

【請求項 75】

前記 Cas9 ニッカーゼをコードする前記核酸が、配列番号 694 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含む、請求項 74 に記載の組成物。

30

【請求項 76】

前記 Cas9 ニッカーゼをコードする前記核酸が、配列番号 694 に対して少なくとも 95% の同一性を有する配列を含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 77】

前記 Cas9 ニッカーゼをコードする前記核酸が、配列番号 694 に対して少なくとも 98% の同一性を有する配列を含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 78】

前記 Cas9 ニッカーゼをコードする前記核酸が、配列番号 694 に対して少なくとも 99% の同一性を有する配列を含む、請求項 74 に記載の組成物。

40

【請求項 79】

前記 Cas9 ニッカーゼをコードする前記核酸が、配列番号 694 に対して少なくとも 99.5% の同一性を有する配列を含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 80】

前記変異が、核酸配列番号 694 と比較して、コドン 692 の AAC が GCC に変異すること、コドン 694 の AUG が GCC に変異すること、コドン 695 の CAG が GCC に変異すること、及びコドン 698 の CAC が GCC に変異することを含む、請求項 74～79 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 81】

前記変異が、前記核酸配列番号 694 と比較して、コドン 855 の AAG が GCC に変

50

異することを含む、請求項 7 4 ～ 7 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8 2】

前記変異が、前記核酸配列番号 6 9 4 と比較して、コドン 8 7 8 の A A G が G C C に変異すること、コドン 1 0 0 3 の A A G が G C C に変異すること、及びコドン 1 0 6 0 の C G G が G C C に変異することを含む、請求項 7 4 ～ 7 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8 3】

前記変異が、前記核酸配列番号 6 9 4 と比較して、コドン 8 1 0 の A A G が G C C に変異すること、コドン 1 0 0 3 の A A G が G C C に変異すること、及びコドン 1 0 6 0 の C G G が G C C に変異することを含む、請求項 7 4 ～ 7 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8 4】

遺伝子編集系であって、

(a) C a s 9 ニッカーゼと、

(b) 標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に対応するスペーサー及び前記 C a s 9 ニッカーゼのための結合足場を含むガイド RNA と、を含み、

前記 C a s 9 ニッカーゼが、変異を含み、前記変異が、配列番号 6 9 5 の C a s 9 ニッカーゼと比較して、N 6 9 2 A、M 6 9 4 A、Q 6 9 5 A、H 6 9 8 A、K 8 1 0 A、K 8 5 5 A、K 8 4 8 A、K 1 0 0 3 A、R 1 0 6 0 A からなる群から選択される、遺伝子編集系。

【請求項 8 5】

前記遺伝子編集系が、デアミナーゼを含む、請求項 8 4 に記載の遺伝子編集系。

【請求項 8 6】

前記遺伝子編集系が、ポリメラーゼを含む、請求項 8 4 に記載の遺伝子編集系。

【請求項 8 7】

前記ポリメラーゼが、逆転写酵素である、請求項 8 6 に記載の遺伝子編集系。

【請求項 8 8】

前記標的遺伝子が、P C S K 9 である、請求項 8 4 ～ 8 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 8 9】

前記標的遺伝子が、A N G P T L 3 である、請求項 8 4 ～ 8 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 9 0】

前記 C a s 9 ニッカーゼが、配列番号 6 9 5 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 8 4 ～ 8 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 9 1】

前記 C a s 9 ニッカーゼが、配列番号 6 9 5 に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含む、請求項 8 4 ～ 8 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 9 2】

前記 C a s 9 ニッカーゼが、配列番号 6 9 5 に対して少なくとも 9 8 % の同一性を有する配列を含む、請求項 8 4 ～ 8 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 9 3】

前記 C a s 9 ニッカーゼが、配列番号 6 9 5 に対して少なくとも 9 9 % の同一性を有する配列を含む、請求項 8 4 ～ 8 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 9 4】

前記 C a s 9 ニッカーゼが、配列番号 6 9 5 に対して少なくとも 9 9 . 5 % の同一性を有する配列を含む、請求項 8 4 ～ 8 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 9 5】

前記変異が、前記配列番号 6 9 5 の C a s 9 ニッカーゼと比較して、N 6 9 2 A、M 6 9 4 A、Q 6 9 5 A 及び H 6 9 8 A を含む、請求項 8 4 ～ 9 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 9 6】

前記変異が、前記配列番号 695 の Cas9 ニッカーゼと比較して、K855A を含む、請求項 84～94 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 97】

前記変異が、前記配列番号 695 の Cas9 ニッカーゼと比較して、K848A、K1003A 及び R1060A を含む、請求項 84～94 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 98】

前記変異が、前記配列番号 695 の Cas9 ニッカーゼと比較して、K810A、K1003A、R1060A を含む、請求項 84～94 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 99】

遺伝子編集系であって、

(a) Cas9 ニッカーゼをコードする核酸と、

(b) 標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に対応するスペーサー及び前記 Cas9 ニッカーゼのための結合足場を含むガイド RNA と、を含み、

前記 Cas9 ニッカーゼをコードする前記核酸が、変異を含み、前記変異が、配列番号 694 の核酸と比較して、コドン 692 の AAC が GCC に変異すること、コドン 694 の AUG が GCC に変異すること、コドン 695 の CAG が GCC に変異すること、コドン 698 の CAC が GCC に変異すること、コドン 855 の AAG が GCC に変異すること、コドン 810 の AAG が GCC に変異すること、コドン 848 の AAG が GCC に変異すること、コドン 1003 の AAG が GCC に変異すること、及びコドン 1060 の CGG が GCC に変異することからなる群から選択される、遺伝子編集系。

【請求項 100】

前記遺伝子編集系が、デアミナーゼをコードする核酸を含む、請求項 99 に記載の遺伝子編集系。

【請求項 101】

前記遺伝子編集系が、ポリメラーゼをコードする核酸を含む、請求項 99 に記載の遺伝子編集系。

【請求項 102】

前記ポリメラーゼが、逆転写酵素である、請求項 101 に記載の遺伝子編集系。

【請求項 103】

前記標的遺伝子が、PCSK9 である、請求項 99～102 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 104】

前記標的遺伝子が、ANGPTL3 である、請求項 99～102 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 105】

前記 Cas9 ニッカーゼをコードする前記核酸が、配列番号 694 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列を含む、請求項 99～104 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 106】

前記 Cas9 ニッカーゼをコードする前記核酸が、配列番号 694 に対して少なくとも 95% の同一性を有する配列を含む、請求項 99～104 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 107】

前記 Cas9 ニッカーゼをコードする前記核酸が、配列番号 694 に対して少なくとも 98% の同一性を有する配列を含む、請求項 99～104 のいずれか 1 項に記載の遺伝子編集系。

【請求項 108】

前記 Cas9 ニッカーゼをコードする前記核酸が、配列番号 694 に対して少なくとも

10

20

30

40

50

99%の同一性を有する配列を含む、請求項99～104のいずれか1項に記載の遺伝子編集系。

【請求項109】

前記Cas9ニッカーゼをコードする前記核酸が、配列番号694に対して少なくとも99.5%の同一性を有する配列を含む、請求項99～104のいずれか1項に記載の遺伝子編集系。

【請求項110】

前記変異が、前記核酸配列番号694と比較して、コドン692のAACがGCCに変異すること、コドン694のAUGがGCCに変異すること、コドン695のCAGがGCCに変異すること、及びコドン698のCACがGCCに変異することを含む、請求項99～109のいずれか1項に記載の遺伝子編集系。

10

【請求項111】

前記変異が、前記核酸配列番号694と比較して、コドン855のAAGがGCCに変異することを含む、請求項99～109のいずれか1項に記載の遺伝子編集系。

【請求項112】

前記変異が、前記核酸配列番号694と比較して、コドン878のAAGがGCCに変異すること、コドン1003のAAGがGCCに変異すること、及びコドン1060のCGGがGCCに変異することを含む、請求項99～109のいずれか1項に記載の遺伝子編集系。

【請求項113】

前記変異が、前記核酸配列番号694と比較して、コドン810のAAGがGCCに変異すること、コドン1003のAAGがGCCに変異すること、及びコドン1060のCGGがGCCに変異することを含む、請求項99～109のいずれか1項に記載の遺伝子編集系。

20

【請求項114】

前記核酸が、配列番号723、725、727及び729からなる群から選択される配列を含む、塩基エディタータンパク質をコードする核酸。

【請求項115】

前記塩基エディタータンパク質が、配列番号724、726、728及び730からなる群から選択される配列を含む、塩基エディタータンパク質。

30

【請求項116】

ヒト対象のための薬学的組成物であって、

(a) 塩基エディタータンパク質をコードするmRNAであって、前記塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNAと、

(b) 前記核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイドRNAと、

(c) アミノ脂質、PEG脂質、リン脂質及びステロールを含むLNPと、を含み、

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約0.01mg/kg～約3mg/kgである、薬学的組成物。

【請求項117】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約0.1mg/kg～約3mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。

40

【請求項118】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約0.01mg/kg～約2mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。

【請求項119】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約0.1mg/kg～約2mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。

【請求項120】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約0.01mg/kg～約1.5mg/kg

50

kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 121】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.1 mg/kg ~ 約 1.5 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 122】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.01 mg/kg ~ 約 1.25 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 123】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.1 mg/kg ~ 約 1.25 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 124】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.01 mg/kg ~ 約 1 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 125】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.1 mg/kg ~ 約 1 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 126】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.1 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 127】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.2 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

20

【請求項 128】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.3 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 129】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.4 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 130】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.5 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 131】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.6 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 132】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.7 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 133】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.8 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 134】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 0.9 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 135】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 1 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 136】

前記ガイド RNA 及び前記 mRNA の総量が、約 1 mg/kg ~ 約 3 mg/kg である、請求項 116 に記載の薬学的組成物。

【請求項 137】

50

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約1.1mg/kg～約3mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。

【請求項138】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約1.2mg/kg～約3mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。

【請求項139】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約1.3mg/kg～約3mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。

【請求項140】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約1.4mg/kg～約3mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。 10

【請求項141】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約1.5mg/kg～約3mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。

【請求項142】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約1.6mg/kg～約3mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。

【請求項143】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約1.7mg/kg～約3mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。 20

【請求項144】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約1.8mg/kg～約3mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。

【請求項145】

前記ガイドRNA及び前記mRNAの総量が、約1.9mg/kg～約3mg/kgである、請求項116に記載の薬学的組成物。

【請求項146】

ヒト対象のための薬学的組成物であって、

(a) 塩基エディタータンパク質をコードするmRNAであって、前記塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNAと、 30

(b) 前記核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイドRNAと、

(c) アミノ脂質、PEG脂質、リン脂質及びステロールを含むLNPと、を含み、
前記遺伝子編集系の投与が、約0.05µg/mL～約5µg/mLである前記ヒト対象における前記mRNAの血漿Cmaxをもたらす、薬学的組成物。

【請求項147】

前記ヒト対象における前記mRNAの前記血漿Cmaxが、約0.1µg/mL～約5µg/mLである、請求項146に記載の薬学的組成物。

【請求項148】

前記ヒト対象における前記mRNAの前記血漿Cmaxが、約0.2µg/mL～約5µg/mLである、請求項146に記載の薬学的組成物。 40

【請求項149】

前記ヒト対象における前記mRNAの前記血漿Cmaxが、約0.5µg/mL～約5µg/mLである、請求項146に記載の薬学的組成物。

【請求項150】

前記ヒト対象における前記mRNAの前記血漿Cmaxが、約1µg/mL～約5µg/mLである、請求項146に記載の薬学的組成物。

【請求項151】

前記ヒト対象における前記mRNAの前記血漿Cmaxが、約2µg/mL～約5µg/mLである、請求項146に記載の薬学的組成物。 50

【請求項 152】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記血漿 Cmax が、約 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～ 約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 146 に記載の薬学的組成物。

【請求項 153】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記血漿 Cmax が、約 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～ 約 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 146 に記載の薬学的組成物。

【請求項 154】

ヒト対象のための薬学的組成物であって、

(a) 塩基エディタータンパク質をコードする mRNA であって、前記塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNA と、

(b) 前記核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイド RNA と、

(c) アミノ脂質、PEG 脂質、リン脂質及びステロールを含む LNP と、を含み、

前記遺伝子編集系の投与が、約 $1 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $100 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である前記ヒト対象における前記 mRNA の AUC をもたらす、薬学的組成物。

【請求項 155】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $1 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $50 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 154 に記載の薬学的組成物。

【請求項 156】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $1 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $20 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 154 に記載の薬学的組成物。

【請求項 157】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $1 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $10 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 154 に記載の薬学的組成物。

【請求項 158】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $10 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $100 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 154 に記載の薬学的組成物。

【請求項 159】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $10 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $50 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 154 に記載の薬学的組成物。

【請求項 160】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $10 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $20 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 154 に記載の薬学的組成物。

【請求項 161】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $20 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $100 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 154 に記載の薬学的組成物。

【請求項 162】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $20 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $50 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 154 に記載の薬学的組成物。

【請求項 163】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $20 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $30 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 154 に記載の薬学的組成物。

【請求項 164】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $30 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $100 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 154 に記載の薬学的組成物。

【請求項 165】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $30 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 $50 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 154 に記載の薬学的組成物。

【請求項 166】

前記ヒト対象における前記 mRNA の前記 AUC が、約 $50 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～ 約 100

10

20

30

40

50

$\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である、請求項154に記載の薬学的組成物。

【請求項167】

ヒト対象のための薬学的組成物であって、

(a) 塩基エディタータンパク質をコードするmRNAであって、前記塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNAと、

(b) 前記核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイドRNAと、

(c) アミノ脂質、PEG脂質、リン脂質及びステロールを含むLNPと、を含み、

前記遺伝子編集系の投与が、約 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ ～約 $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ である前記ヒト対象における前記アミノ脂質の血漿Cmaxをもたらす、薬学的組成物。

10

【請求項168】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記血漿Cmaxが、約 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ ～約 $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項167に記載の薬学的組成物。

【請求項169】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記血漿Cmaxが、約 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ ～約 $30 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項167に記載の薬学的組成物。

【請求項170】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記血漿Cmaxが、約 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ ～約 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項167に記載の薬学的組成物。

【請求項171】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記血漿Cmaxが、約 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ ～約 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項167に記載の薬学的組成物。

20

【請求項172】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記血漿Cmaxが、約 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ ～約 $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項167に記載の薬学的組成物。

【請求項173】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記血漿Cmaxが、約 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ ～約 $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項167に記載の薬学的組成物。

【請求項174】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記血漿Cmaxが、約 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ ～約 $30 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項167に記載の薬学的組成物。

30

【請求項175】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記血漿Cmaxが、約 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ ～約 $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項167に記載の薬学的組成物。

【請求項176】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記血漿Cmaxが、約 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ ～約 $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項167に記載の薬学的組成物。

【請求項177】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記血漿Cmaxが、約 $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ ～約 $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項167に記載の薬学的組成物。

40

【請求項178】

ヒト対象のための薬学的組成物であって、

(a) 塩基エディタータンパク質をコードするmRNAであって、前記塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNAと、

(b) 前記核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイドRNAと、

(c) アミノ脂質、PEG脂質、リン脂質及びステロールを含むLNPと、を含み、

前記遺伝子編集系の投与が、約 $100 \mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ～約 $10000 \mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である前記ヒト対象における前記アミノ脂質のAUCをもたらす、薬学的組成物。

【請求項179】

50

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記AUCが、約 $100\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $5000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である、請求項178に記載の薬学的組成物。

【請求項180】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記AUCが、約 $100\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $2000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である、請求項178に記載の薬学的組成物。

【請求項181】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記AUCが、約 $100\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $1000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である、請求項178に記載の薬学的組成物。

【請求項182】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記AUCが、約 $100\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $500\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である、請求項178に記載の薬学的組成物。

【請求項183】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記AUCが、約 $500\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $10000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である、請求項178に記載の薬学的組成物。

【請求項184】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記AUCが、約 $500\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $5000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である、請求項178に記載の薬学的組成物。

【請求項185】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記AUCが、約 $500\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $2000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である、請求項178に記載の薬学的組成物。

【請求項186】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記AUCが、約 $500\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $1000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である、請求項178に記載の薬学的組成物。

【請求項187】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記AUCが、約 $1000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $10000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である、請求項178に記載の薬学的組成物。

【請求項188】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記AUCが、約 $1000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $5000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である、請求項178に記載の薬学的組成物。

【請求項189】

前記ヒト対象における前記アミノ脂質の前記AUCが、約 $5000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $10000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である、請求項178に記載の薬学的組成物。

【請求項190】

ヒト対象のための薬学的組成物であって、

(a) 塩基エディタータンパク質をコードするmRNAであって、前記塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNAと、

(b) 前記核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイドRNAと、

(c) アミノ脂質、PEG脂質、リン脂質及びステロールを含むLNPと、を含み、

前記遺伝子編集系の投与が、約 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ である前記ヒト対象における前記PEG脂質の血漿Cmaxをもたらす、薬学的組成物。

【請求項191】

前記ヒト対象における前記PEG脂質の前記血漿Cmaxが、約 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項190に記載の薬学的組成物。

【請求項192】

前記ヒト対象における前記PEG脂質の前記血漿Cmaxが、約 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項190に記載の薬学的組成物。

【請求項193】

前記ヒト対象における前記PEG脂質の前記血漿Cmaxが、約 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項190に記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 194】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記血漿 Cmax が、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 190 に記載の薬学的組成物。

【請求項 195】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記血漿 Cmax が、約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 190 に記載の薬学的組成物。

【請求項 196】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記血漿 Cmax が、約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 190 に記載の薬学的組成物。

【請求項 197】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記血漿 Cmax が、約 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 190 に記載の薬学的組成物。

【請求項 198】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記血漿 Cmax が、約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 190 に記載の薬学的組成物。

【請求項 199】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記血漿 Cmax が、約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 190 に記載の薬学的組成物。

【請求項 200】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記血漿 Cmax が、約 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 190 に記載の薬学的組成物。

【請求項 201】

ヒト対象のための薬学的組成物であって、

(a) 塩基エディタータンパク質をコードする mRNA であって、前記塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNA と、

(b) 前記核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイド RNA と、

(c) アミノ脂質、PEG 脂質、リン脂質及びステロールを含む LNP と、を含み、

前記遺伝子編集系の投与が、約 $10 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～約 $5000 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の AUC をもたらす、薬学的組成物。

【請求項 202】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記 AUC が、約 $10 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～約 $2000 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 201 に記載の薬学的組成物。

【請求項 203】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記 AUC が、約 $10 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～約 $1000 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 201 に記載の薬学的組成物。

【請求項 204】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記 AUC が、約 $10 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～約 $500 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 201 に記載の薬学的組成物。

【請求項 205】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記 AUC が、約 $10 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～約 $100 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 201 に記載の薬学的組成物。

【請求項 206】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記 AUC が、約 $100 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～約 $5000 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 201 に記載の薬学的組成物。

【請求項 207】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記 AUC が、約 $100 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～約 $2000 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ である、請求項 201 に記載の薬学的組成物。

【請求項 208】

前記ヒト対象における前記 PEG 脂質の前記 AUC が、約 $100 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$ ～約 1

10

20

30

40

50

0 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である、請求項 2 0 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 0 9】

前記ヒト対象における前記 P E G 脂質の前記 A U C が、約 1 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ～ 約 5 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である、請求項 2 0 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 0】

前記ヒト対象における前記 P E G 脂質の前記 A U C が、約 5 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ～ 約 5 0 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である、請求項 2 0 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 1】

前記ヒト対象における前記 P E G 脂質の前記 A U C が、約 5 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ～ 約 2 0 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である、請求項 2 0 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 2】

前記ヒト対象における前記 P E G 脂質の前記 A U C が、約 5 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ～ 約 1 0 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である、請求項 2 0 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 3】

前記ヒト対象における前記 P E G 脂質の前記 A U C が、約 1 0 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ～ 約 5 0 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である、請求項 2 0 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 4】

前記ヒト対象における前記 P E G 脂質の前記 A U C が、約 1 0 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ～ 約 2 0 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である、請求項 2 0 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 5】

前記ヒト対象における前記 P E G 脂質の前記 A U C が、約 2 0 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ～ 約 5 0 0 0 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である、請求項 2 0 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 6】

前記リン脂質が、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C) である、請求項 1 1 6 ～ 2 1 5 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 7】

前記ステロールが、コレステロールである、請求項 1 1 6 ～ 2 1 6 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 8】

前記 L N P が、N - アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 脂質受容体標的化コンジュゲートを含む、請求項 1 1 6 ～ 2 1 7 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 9】

アテローム動脈硬化性心血管疾患を治療又は予防することを必要とするヒト対象においてそれを行うための方法であって、前記方法が、前記対象に、治療有効量の請求項 1 1 6 ～ 2 1 8 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物を投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

[0 0 0 1] 本出願は、2 0 2 1 年 9 月 2 2 日に提出された仮出願番号第 6 3 / 2 4 7 , 2 3 6 号、2 0 2 1 年 1 0 月 1 3 日に提出された仮出願番号第 6 3 / 2 5 5 , 3 3 3 号、及び 2 0 2 2 年 7 月 1 5 日に提出された仮出願番号第 6 3 / 3 8 9 , 6 7 9 号からの米国特許法第 1 1 9 条に基づく利益を請求し、それらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【0 0 0 2】

[0 0 0 2] インビボハイブリッドガイド遺伝子編集系であって、(a) 核酸結合ドメインを含む遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素、又は遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素をコードする核酸と、(b) (i) デオキシリボヌクレオチド、及びリボースを含むリボヌクレオチドを含むスペーサー配列であって、リボースの 2 ' ,

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

50

[0005]いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、非改変リボヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素をコードする核酸は、mRNAである。いくつかの実施形態では、遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素は、単一融合タンパク質又は2つ以上のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、ホスホロチオエート骨格改変（PS）を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、（2'-OMe）PS（2'-OMe）PS（DNA）PS（DNA）（RNA）（DNA）（DNA）（DNA）モチーフを含む。いくつかの実施形態では、（2'-OMe）PS（2'-OMe）PS（DNA）PS（DNA）（RNA）（DNA）（DNA）（DNA）モチーフは、スペーサー配列の5'末端に位置する。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、配列番号30又は31の少なくとも約80%、約90%、約95%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、（2'-OMe）PS（2'-OMe）PS（DNA）PS（DNA）（RNA）（DNA）（DNA）モチーフを含む。いくつかの実施形態では、（2'-OMe）PS（2'-O

Me) PS (DNA) PS (DNA) (RNA) (DNA) (DNA) モチーフは、スパーサー配列の 5' 末端に位置する。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、配列番号 28 又は 29 の少なくとも約 80%、約 90%、約 95%、約 99%、約 99.5%、又は約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、(2'-OMe) PS (2'-OMe) PS (DNA) PS (DNA) (DNA) (DNA) (DNA) モチーフを含む。いくつかの実施形態では、(2'-OMe) PS (2'-OMe) PS (DNA) PS (DNA) (DNA) (DNA) (DNA) モチーフは、スパーサー配列の 5' 末端に位置する。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、配列番号 5、11 又は 12 の少なくとも約 80%、約 90%、約 95%、約 99%、約 99.5%、又は約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ハイブリッドガイド核酸は、配列番号 110~113 からなる群から選択される配列の少なくとも約 80%、約 90%、約 95%、約 99%、約 99.5%、又は約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ハイブリッドガイド核酸は、配列番号 106~109 からなる群から選択される配列の少なくとも約 80%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、又は約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、配列番号 79~82 からなる群から選択される配列の少なくとも約 80%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、又は約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。

10

20

【0006】

【0006】いくつかの実施形態では、核酸結合ドメインは、DNA に結合することができる。いくつかの実施形態では、核酸結合ドメインは、RNA に結合することができる。いくつかの実施形態では、デオキシリボヌクレオチドは、スパーサー配列の 5' 末端から位置 3、4、6、7 又は 8 に位置する。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、スパーサー配列の 5' 末端から位置 3、4、6 及び 7 にデオキシリボヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、スパーサー配列の 5' 末端から位置 3 及び 4 にデオキシリボヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、スパーサー配列の 5' 末端から位置 6 及び 7 にデオキシリボヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、スパーサー配列の 5' 末端から位置 3、4、6、7 及び 8 にデオキシリボヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、1~10 個のデオキシリボヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、1~5 個のデオキシリボヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、DNA 結合ドメインは、CRISPR タンパク質又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、DNA 結合ドメインは、触媒的に損なわれたヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、DNA 結合ドメインは、プライム編集タンパク質又はその断片を含む。

30

【0007】

【0007】いくつかの実施形態では、遺伝子エディタータンパク質又はその構成要素は、デオキシリボヌクレオチドを含まない対応する gRNA を含む遺伝子編集系と比較して、全てのオフターゲット部位に対して約 10% 未満、約 9% 未満、約 8% 未満、約 7% 未満、約 6% 未満、約 5% 未満、約 4% 未満、約 3% 未満、約 2% 未満、又は約 1% 未満の編集に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、遺伝子エディタータンパク質又はその構成要素は、デオキシリボヌクレオチドを含まない対応する gRNA を含む遺伝子編集系と比較して、標的遺伝子に対して約 50% を超える、約 60% を超える、約 70% を超える、約 80% を超える、約 90% を超える、又は約 95% を超える編集に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、遺伝子エディタータンパク質又はその構成要素は、デオキシリボヌクレオチドを含まない対応する gRNA を含む遺伝子編集系と比較して、標的遺伝子に対して約 95% を超える、約 96% を超える、約 97% を超える、約 98% を超える、又は約 99% を超える編集に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、遺伝子エディタータンパク質又はその構成要素は、デオキシリボヌクレオチドを含まない対応する gRNA を含

40

50

む遺伝子編集系と比較して、標的遺伝子に対して約95%～約99%の編集に影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、LNPは、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）脂質受容体標的化コンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、肝臓、又は肝臓起源の細胞若しくは組織で発現される。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、非肝臓器官、又は非肝臓起源の細胞若しくは組織で発現される。

【0008】

【0008】アテローム動脈硬化性心血管疾患を治療又は予防することを必要とする対象においてそれを行うための方法であって、本方法が、対象に、治療有効量の本明細書に記載のインビボハイブリッドガイド遺伝子編集系を投与することを含む、方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、対象は、霊長類である。いくつかの実施形態では、霊長類は、ヒトである。

10

【0009】

【0009】遺伝子編集系であって、（a）核酸結合ドメインを含む遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素、又は遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素をコードする核酸と、（b）スパーサー配列を含むハイブリッドガイド核酸であって、スパーサー配列が、デオキシリボヌクレオチド、及びリボースを含むリボヌクレオチドを含み、リボースの2'ヒドロキシル基が、メチル基に共有結合している（2'-OMe）、ハイブリッドガイド核酸と、を含む、遺伝子編集系が本明細書に記載される。

【0010】

【0010】遺伝子編集系であって、（a）核酸結合ドメインを含む遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素、又は遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素をコードする核酸と、（b）スパーサー配列を含むハイブリッドガイド核酸であって、スパーサー配列が、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含み、スパーサー配列が、ANGPTL3遺伝子上のプロトスパーサーに対応する、ハイブリッドガイド核酸と、を含む、遺伝子編集系が本明細書に記載される。

20

【0011】

【0011】遺伝子編集系であって、（a）核酸結合ドメイン及びデアミナーゼを含む遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素、又は遺伝子エディタータンパク質若しくはその構成要素をコードする核酸と、（b）スパーサー配列を含むハイブリッドガイド核酸であって、スパーサー配列が、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含む、ハイブリッドガイド核酸と、を含む、遺伝子編集系が本明細書に記載される。

30

【0012】

【0012】遺伝子編集系のためのハイブリッドガイド核酸であって、ハイブリッドガイドが、（i）デオキシリボヌクレオチド、及びリボースを含むリボヌクレオチドを含むスパーサー配列であって、リボースの2'ヒドロキシル基が、メチル基に共有結合している（2'-OMe）、スパーサー配列と、（ii）結合足場と、を含む、ハイブリッドガイド核酸が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、（2'-OMe）PS（2'-OMe）PS（DNA）PS（DNA）（RNA）（DNA）（DNA）（DNA）モチーフを含む。いくつかの実施形態では、（2'-OMe）PS（2'-OMe）PS（DNA）PS（DNA）（RNA）（DNA）（DNA）（DNA）（DNA）モチーフは、スパーサー配列の5'末端に位置する。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、配列番号30又は31の少なくとも約80%、約90%、約95%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、（2'-OMe）PS（2'-OMe）PS（DNA）PS（DNA）（RNA）（DNA）（DNA）モチーフを含む。いくつかの実施形態では、（2'-OMe）PS（2'-OMe）PS（DNA）PS（DNA）（RNA）（DNA）（DNA）モチーフは、スパーサー配列の5'末端に位置する。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、配列番号28又は29の少なくとも約80%、約90%、約95%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、（2'-OMe）PS（2' 50

－OMe)PS(DNA)PS(DNA)(DNA)(DNA)(DNA)モチーフを含む。いくつかの実施形態では、(2'-OMe)PS(2'-OMe)PS(DNA)PS(DNA)(DNA)(DNA)(DNA)モチーフは、スパーサー配列の5'末端に位置する。いくつかの実施形態では、スパーサー配列は、配列番号5、11又は12の少なくとも約80%、約90%、約95%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ハイブリッドガイド核酸は、配列番号110～113からなる群から選択される配列の少なくとも約80%、約90%、約95%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ハイブリッドガイド核酸は、配列番号106～109からなる群から選択される配列の少なくとも約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、配列番号79～82からなる群から選択される配列の少なくとも約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.5%、又は約100%の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含む。

10

20

30

40

50

【0013】

[0013] Cas9ニッカーゼを含む組成物であって、Cas9ニッカーゼが、変異を含み、変異が、配列番号695のCas9ニッカーゼと比較して、N692A、M694A、Q695A、H698A、K810A、K855A、K848A、K1003A、R1060Aからなる群から選択される、組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼは、配列番号695に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼは、配列番号695に対して少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼは、配列番号695に対して少なくとも98%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼは、配列番号695に対して少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼは、配列番号695に対して少なくとも99.5%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、変異は、配列番号695のCas9ニッカーゼと比較して、N692A、M694A、Q695A及びH698Aを含む。いくつかの実施形態では、変異は、配列番号695のCas9ニッカーゼと比較して、K855Aを含む。いくつかの実施形態では、変異は、配列番号695のCas9ニッカーゼと比較して、K848A、K1003A及びR1060Aを含む。いくつかの実施形態では、変異は、配列番号695のCas9ニッカーゼと比較して、K810A、K1003A、R1060Aを含む。

【0014】

[0014] Cas9ニッカーゼをコードする核酸を含む組成物であって、Cas9ニッカーゼをコードする核酸が、変異を含み、変異が、配列番号694の核酸と比較して、コドン692のAACがGCCに変異すること、コドン694のAUGがGCCに変異すること、コドン695のCAGがGCCに変異すること、コドン698のCACがGCCに変異すること、コドン855のAAGがGCCに変異すること、コドン810のAAGがGCCに変異すること、コドン848のAAGがGCCに変異すること、コドン1003のAAGがGCCに変異すること、コドン1060のCGGがGCCに変異することからなる群から選択される、組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼをコードする核酸は、配列番号694に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼをコードする核酸は、配列番号694に対して少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼをコードする核酸は、配列番号694に対して少なくとも98%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼをコードする核酸は、配列番号694に対して少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼをコードする核酸は、配列番号694に対して少なくとも99.5%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、変

異は、核酸配列番号694と比較して、コドン692のAACがGCCに変異すること、コドン694のAUGがGCCに変異すること、コドン695のCAGがGCCに変異すること、及びコドン698のCACがGCCに変異することを含む。いくつかの実施形態では、変異は、核酸配列番号694と比較して、コドン855のAAGがGCCに変異することを含む。いくつかの実施形態では、変異は、核酸配列番号694と比較して、コドン878のAAGがGCCに変異すること、コドン1003のAAGがGCCに変異すること、及びコドン1060のCGGがGCCに変異することを含む。いくつかの実施形態では、変異は、核酸配列番号694と比較して、コドン810のAAGがGCCに変異すること、コドン1003のAAGがGCCに変異すること、及びコドン1060のCGGがGCCに変異することを含む。

10

【0015】

【0015】遺伝子編集系であって、(a) Cas9ニッケアゼと、(b) 標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に対応するスペーサー及びCas9ニッケアゼのための結合足場を含むガイドRNAと、を含み、Cas9ニッケアゼが、変異を含み、変異が、配列番号695のCas9ニッケアゼと比較して、N692A、M694A、Q695A、H698A、K810A、K855A、K848A、K1003A、R1060Aからなる群から選択される、遺伝子編集系が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集系は、デアミナーゼを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子編集系は、ポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、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、標的遺伝子は、PCSK9である。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、ANGPTL3である。いくつかの実施形態では、Cas9ニッケアゼは、配列番号695に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッケアゼは、配列番号695に対して少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッケアゼは、配列番号695に対して少なくとも98%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッケアゼは、配列番号695に対して少なくとも99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas9ニッケアゼは、配列番号695に対して少なくとも99.5%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、変異は、配列番号695のCas9ニッケアゼと比較して、N692A、M694A、Q695A及びH698Aを含む。いくつかの実施形態では、変異は、配列番号695のCas9ニッケアゼと比較して、K855Aを含む。いくつかの実施形態では、変異は、配列番号695のCas9ニッケアゼと比較して、K848A、K1003A及びR1060Aを含む。いくつかの実施形態では、変異は、配列番号695のCas9ニッケアゼと比較して、K810A、K1003A、R1060Aを含む。

20

30

【0016】

【0016】遺伝子編集系であって、(a) Cas9ニッケアゼをコードする核酸と、(b) 標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に対応するスペーサー及びCas9ニッケアゼのための結合足場を含むガイドRNAと、を含み、Cas9ニッケアゼをコードする核酸が、変異を含み、変異が、配列番号694の核酸と比較して、コドン692のAACがGCCに変異すること、コドン694のAUGがGCCに変異すること、コドン695のCAGがGCCに変異すること、コドン698のCACがGCCに変異すること、コドン855のAAGがGCCに変異すること、コドン810のAAGがGCCに変異すること、コドン848のAAGがGCCに変異すること、コドン1003のAAGがGCCに変異すること、コドン1060のCGGがGCCに変異することからなる群から選択される、遺伝子編集系が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集系は、デアミナーゼをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子編集系は、ポリメラーゼをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、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、標的遺伝子は、PCSK9である。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、ANGPTL3である。いくつかの実施形態では、Cas9ニッケアゼをコードする核酸は、配列番号694に対して少なくとも90%の同一性を有する配列

40

50

を含む。いくつかの実施形態では、C a s 9 ニッカーゼをコードする核酸は、配列番号 6 9 4 に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、C a s 9 ニッカーゼをコードする核酸は、配列番号 6 9 4 に対して少なくとも 9 8 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、C a s 9 ニッカーゼをコードする核酸は、配列番号 6 9 4 に対して少なくとも 9 9 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、C a s 9 ニッカーゼをコードする核酸は、配列番号 6 9 4 に対して少なくとも 9 9 . 5 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、変異は、核酸配列番号 6 9 4 と比較して、コドン 6 9 2 の A A C が G C C に変異すること、コドン 6 9 4 の A U G が G C C に変異すること、コドン 6 9 5 の C A G が G C C に変異すること、及びコドン 6 9 8 の C A C が G C C に変異することを含む。いくつかの実施形態では、変異は、核酸配列番号 6 9 4 と比較して、コドン 8 5 5 の A A G が G C C に変異することを含む。いくつかの実施形態では、変異は、核酸配列番号 6 9 4 と比較して、コドン 8 7 8 の A A G が G C C に変異すること、コドン 1 0 0 3 の A A G が G C C に変異すること、及びコドン 1 0 6 0 の C G G が G C C に変異することを含む。いくつかの実施形態では、変異は、核酸配列番号 6 9 4 と比較して、コドン 8 1 0 の A A G が G C C に変異すること、コドン 1 0 0 3 の A A G が G C C に変異すること、及びコドン 1 0 6 0 の C G G が G C C に変異することを含む。

10

【0017】

【0017】配列番号 7 2 3、7 2 5、7 2 7 及び 7 2 9 からなる群から選択される配列を含む核酸が、本明細書に記載される。

20

【0018】

【0018】塩基エディタータンパク質が、配列番号 7 2 4、7 2 6、7 2 8 及び 7 3 0 からなる群から選択される配列を含む、塩基エディタータンパク質が本明細書に記載される。

【0019】

【0019】ヒト対象のための薬学的組成物であって、(a) 塩基エディタータンパク質をコードする mRNA であって、塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNA と、(b) 核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイド RNA と、(c) アミノ脂質、PEG 脂質、リン脂質及びステロールを含む LNP と、を含み、ガイド RNA 及び mRNA の総量が、約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 3 m g / k g である、薬学的組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 3 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 2 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 2 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 1 . 5 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 1 . 5 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 1 . 2 5 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 1 . 2 5 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 1 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 1 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 1 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 2 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 3 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 4 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 5 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 6 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA の総量は、約 0 . 7 m g / k g である。いくつかの実施形態では、ガイ

30

40

50

ドRNA及びmRNAの総量は、約0.8mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約0.9mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約1mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約1mg/kg～約3mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約1.1mg/kg～約3mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約1.2mg/kg～約3mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約1.3mg/kg～約3mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約1.4mg/kg～約3mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約1.5mg/kg～約3mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約1.6mg/kg～約3mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約1.7mg/kg～約3mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約1.8mg/kg～約3mg/kgである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAの総量は、約1.9mg/kg～約3mg/kgである。

【0020】

【0020】ヒト対象のための薬学的組成物であって、(a)塩基エディタータンパク質をコードするmRNAであって、塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNAと、(b)核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイドRNAと、(b)アミノ脂質、PEG脂質、リン脂質及びステロールを含むLNPと、を含み、遺伝子編集系の投与が、約0.05µg/mL～約5µg/mLであるヒト対象におけるmRNAの血漿C_{max}をもたらす、薬学的組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAの血漿C_{max}は、約0.1µg/mL～約5µg/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAの血漿C_{max}は、約0.2µg/mL～約5µg/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAの血漿C_{max}は、約0.5µg/mL～約5µg/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAの血漿C_{max}は、約1µg/mL～約5µg/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAの血漿C_{max}は、約2µg/mL～約5µg/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAの血漿C_{max}は、約3µg/mL～約5µg/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAの血漿C_{max}は、約4µg/mL～約5µg/mLである。

【0021】

【0021】ヒト対象のための薬学的組成物であって、(a)塩基エディタータンパク質をコードするmRNAであって、塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNAと、(b)核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイドRNAと、(c)アミノ脂質、PEG脂質、リン脂質及びステロールを含むLNPと、を含み、遺伝子編集系の投与が、約1µg×h/mL～約100µg×h/mLであるヒト対象におけるmRNAのAUCをもたらす、薬学的組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約1µg×h/mL～約50µg×h/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約1µg×h/mL～約20µg×h/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約1µg×h/mL～約10µg×h/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約10µg×h/mL～約100µg×h/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約10µg×h/mL～約50µg×h/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約10µg×h/mL～約20µg×h/mLである。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約20µg×h/mL～約100µg×h/mLである。いくつかの実施形態で

は、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約 $20\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $50\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約 $20\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約 $30\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $100\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約 $30\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $50\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるmRNAのAUCは、約 $50\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $100\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。

【0022】

【0022】ヒト対象のための薬学的組成物であって、(a)塩基エディタータンパク質をコードするmRNAであって、塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNAと、(b)核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイドRNAと、(c)アミノ脂質、PEG脂質、リン脂質及びステロールを含むLNPと、を含み、遺伝子編集系の投与が、約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ であるヒト対象におけるアミノ脂質の血漿Cmaxをもたらす、薬学的組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質の血漿Cmaxは、約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質の血漿Cmaxは、約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質の血漿Cmaxは、約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質の血漿Cmaxは、約 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質の血漿Cmaxは、約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質の血漿Cmaxは、約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質の血漿Cmaxは、約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質の血漿Cmaxは、約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質の血漿Cmaxは、約 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質の血漿Cmaxは、約 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

【0023】

【0023】ヒト対象のための薬学的組成物であって、(a)塩基エディタータンパク質をコードするmRNAであって、塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNAと、(b)核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイドRNAと、(c)アミノ脂質、PEG脂質、リン脂質及びステロールを含むLNPと、を含み、遺伝子編集系の投与が、約 $100\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $10000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ であるヒト対象におけるアミノ脂質のAUCをもたらす、薬学的組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質のAUCは、約 $100\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $5000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質のAUCは、約 $100\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $2000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質のAUCは、約 $100\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $1000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質のAUCは、約 $100\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $500\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質のAUCは、約 $500\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $10000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質のAUCは、約 $500\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $5000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質のAUCは、約 $500\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $2000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質のAUCは、約 $500\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $1000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質のAUCは、約 $1000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $10000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質のAUCは、約 $1000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$ ～約 $5000\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$

である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるアミノ脂質のAUCは、約5000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約10000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。

【0024】

【0024】ヒト対象のための薬学的組成物であって、(a) 塩基エディタータンパク質をコードするmRNAであって、塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNAと、(b) 核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイドRNAと、(c) アミノ脂質、PEG脂質、リン脂質及びステロールを含むLNPと、を含み、遺伝子編集系の投与が、約0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ であるヒト対象におけるPEG脂質の血漿Cmaxをもたらし、薬学的組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質の血漿Cmaxは、約0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質の血漿Cmaxは、約0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質の血漿Cmaxは、約0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質の血漿Cmaxは、約0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質の血漿Cmaxは、約1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質の血漿Cmaxは、約1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質の血漿Cmaxは、約1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質の血漿Cmaxは、約10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質の血漿Cmaxは、約10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質の血漿Cmaxは、約25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ である。

【0025】

【0025】ヒト対象のための薬学的組成物であって、(a) 塩基エディタータンパク質をコードするmRNAであって、塩基エディタータンパク質が、核酸結合ドメインを含む、mRNAと、(b) 核酸結合ドメインを標的遺伝子上のプロトスペーサー配列に誘導するのに役立つガイドRNAと、(c) アミノ脂質、PEG脂質、リン脂質及びステロールを含むLNPと、を含み、遺伝子編集系の投与が、約10 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約5000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ であるヒト対象におけるPEG脂質のAUCをもたらし、薬学的組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約10 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約2000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約10 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約1000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約10 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約500 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約10 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約100 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約100 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約2000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約100 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約1000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約100 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約500 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約500 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約5000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約500 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約2000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約500 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約1000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約1000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約5000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約1000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約2000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。いくつかの実施形態では、ヒト対象におけるPEG脂質のAUCは、約2000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ~ 約5000 $\mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。

は、約 $2000 \mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ ～ 約 $5000 \mu\text{g} \times \text{h} / \text{mL}$ である。

【0026】

【0026】いくつかの実施形態では、リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) である。いくつかの実施形態では、ステロールは、コレステロールである。いくつかの実施形態では、LNP は、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 脂質受容体標的化コンジュゲートを含む。

【0027】

【0027】アテローム動脈硬化性心血管疾患を治療又は予防することを必要とするヒト対象においてそれを行うための方法であって、本方法が、対象に、治療有効量の請求項 116 ～ 219 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物を投与することを含む、方法が本明細書に記載される。

10

【0028】

参照による組み込み

【0028】本出願で言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各個々の刊行物、特許、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ているかのように同じ程度まで、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0029】

【0029】本発明の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に述べられる。本開示の特徴及び利点のより良好な理解が、本開示の原理が使用される例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、及び添付の図面を参照することによって得られる。

20

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】【0030】1:1 の mRNA : gRNA 重量比で mRNA MA004 及びガイド RNA GA346 のペイロードを含み、複数のロットの初代ヒト肝細胞 (PHH) 細胞及び初代カニクイザル肝細胞 (PCH) 細胞に対して異なる濃度で滴定された LNP PCSK9 塩基エディター製剤を使用して、初代非ヒト霊長類肝細胞 (例えば、PCH) と比較した場合の PHH における PCSK9 の編集率を示すインビトロ効力試験からのデータを示す。図1に示されるように、投与された PCSK9 塩基エディター製剤は、非ヒト霊長類肝細胞よりもヒトにおいて、より効力が高いように見える。

【図2】【0031】単回用量の $0.75 \text{ mg} / \text{kg}$ を静脈内注入された4匹のNHPの第1の群、単回用量の $1.5 \text{ mg} / \text{kg}$ を静脈内注入された22匹のNHPの第2の群、並びに gRNA 及び mRNA 薬物基質ペイロードを含まない単回用量の同じ LNP 送達ビヒクルを静脈内注入された10匹のNHPの第3の群 (「ビヒクル対照」) を伴う、1:1 の mRNA : gRNA 重量比で mRNA MA004 及びガイド RNA GA346 のペイロードを含む LNP PCSK9 塩基エディター製剤を使用した試験プロトコルを示す。用量は、対象の体重に対する mRNA 及び gRNA の総重量によって測定される。

30

【図3】【0032】注入後15日目の全肝臓DNA編集及び注入後14日目の PCSK9 タンパク質減少を評価する肝生検によるベースラインからの PCSK9 編集変化率、図2に記載の試験から得られたデータである。

【図4】延長された注入後の期間にわたる PCSK9 タンパク質減少を示す、図2に記載の試験から得られたデータである。

40

【図5】延長された注入後の期間にわたる LDL-C 減少、図2に記載の試験から得られたデータである。

【図6】延長された注入後の期間にわたる ALT 酵素レベル、図2に記載の試験から得られたデータである。

【図7】延長された注入後の期間にわたる空腹時グルコースレベルを示す、図2に記載の試験から得られたデータである。

【図8】【0033】マウス試験プロトコルを示す。図8～図9に示されるグラフ内の各ドットは、マウスを表す。

【図9】静脈内注入後の再生された PCSK9 編集肝臓細胞における、本明細書に記載の

50

PCSK9塩基エディターLNP製剤を使用した肝臓編集の耐久性を裏付ける試験から生成されたデータを示す(図9～図10)。図8～図9に示されるグラフ内の各ドットは、マウスを表す。

【図10】静脈内注入後の再生されたPCSK9編集肝臓細胞における、本明細書に記載のPCSK9塩基エディターLNP製剤を使用した肝臓編集の耐久性を裏付ける試験から生成されたデータを示す(図9～図10)。

【図11】[0034]本明細書に記載のPCSK9塩基エディターLNP製剤の静脈内注入後の性的に成熟した雄NHPからの精子における編集の証拠を示さないNHP試験からのデータを示す。

【図12】[0035]本明細書に記載のPCSK9塩基エディター製剤の潜在的なオフターゲット候補部位を評価することから生成される試験プロトコル及びデータである。本明細書に記載のPCSK9塩基エディター製剤による実際のオフターゲット編集の存在を評価するために使用される実験方法を示す概略図である。

【図13】本明細書に記載のPCSK9塩基エディター製剤の潜在的なオフターゲット候補部位を評価することから生成される試験プロトコル及びデータである。使用される検証アッセイの高い感度を示す。

【図14】本明細書に記載のPCSK9塩基エディター製剤の潜在的なオフターゲット候補部位を評価することから生成される試験プロトコル及びデータである。オフターゲットプロトコルから生成されたジッタープロットであり、使用された検証アッセイは、特定された上位244のオフターゲット候補部位の中に、初代ヒト肝臓及び脾臓細胞において検出可能なオフターゲット編集が存在しないことを示している。

【図15】本明細書に記載のPCSK9塩基エディター製剤の潜在的なオフターゲット候補部位を評価することから生成される試験プロトコル及びデータである。オフターゲットプロトコルから生成されたジッタープロットであり、使用された検証アッセイは、特定された上位244のオフターゲット候補部位の中に、初代ヒト肝臓及び脾臓細胞において検出可能なオフターゲット編集が存在しないことを示している。

【図16】[0036]ABE mRNA MA004及びガイドRNA GA346で構築された単回の1mg/kgのLNPを静脈内投与されたNHPの生体内分布試験からのデータを示す。NHPを注入後15日目に安楽死させ、組織試料を採取し、PCSK9遺伝子のアデニン編集について分析した。PCSK9編集が主に肝臓に分布することが観察された。

【図17】[0037]ヒト初代肝細胞におけるANGPTL3に指向された開示されるgRNAバリエーションの効力、及び位置6におけるANGPTL3のそれらのオンターゲット編集割合を示す。データ参照位置6で使用する「位置6」は、プロトスペーサー配列の5'末端(すなわち、PAMから反対側の端)からカウントして6番目の位置を指すことが理解されるべきである。gRNAバリエーションを、本明細書に記載の方法で、そこに示される濃度のABE mRNA MA004とともにヒト初代肝細胞にトランスフェクトした。

【図18】[0038]切断されたガイドRNA GA441(n-1:GA475、n-2:GA576、n-3:GA477)の効力、並びに選択されたオフターゲット候補部位(OT#1、OT#2、OT#3、OT#4)での潜在的なオフターゲット編集の観察された対応する減少と組み合わせた、ヒト初代肝細胞の所望の編集位置におけるANGPTL3のオンターゲット編集割合。gRNA切断バリエーションを、本明細書に記載の方法でmRNA MA004とともにヒト初代肝細胞にトランスフェクトし、mRNA GA441のそのような切断バリエーションが、オンターゲット編集よりも潜在的なオフターゲット部位にどのように影響するかを示した。

【図19】[0039]gRNA GA441でトランスフェクトされた例示的な改変ABEバリエーション、本明細書に記載の方法で、そこに示される濃度の特定されたABEバリエーションとともにgRNA GA441でトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞(PHH)における位置6でのANGPTL3のオンターゲット編集割合を示す。各試料を、濃度当たりそれぞれのMA004 ABE mRNA試料に対して正規化した。示されているグラ

10

20

30

40

50

フ中の各々の列のセットは、凡例のハッシュマークによって更に表されるように、左から右へ読み取られる順に、MA004、MA040、MA041、MA045、MA064、MA065、MA066、及びMA067に対応する。

【図20A】[0040]様々なANGPTL3 gRNA並びにABE mRNAであるmRNA MA004及びそれらのバリエーションMA040、MA041及びMA045を使用して生成されたデータを示し、示された濃度でトランスフェクトされたヒト初代肝細胞におけるANGPTL3のgRNAとmRNAの各々の組み合わせに対するオンターゲット編集の相対的効力を示す。ABE8.8をコードするMA004、ABE8.8 D1135EをコードするMA040、及びABE8.8 R691A/D1135EをコードするMA041を使用した実験1からの結果であり、ANGPTL3は、gRNA凡例に指定されるように、gRNA GA441、GA442、GA472、GA473、GA474、GA475、GA476及びGA477を標的としており、グラフに左から右への順に示される。

10

【図20B】様々なANGPTL3 gRNA並びにABE mRNAであるmRNA MA004及びそれらのバリエーションMA040、MA041及びMA045を使用して生成されたデータを示し、示された濃度でトランスフェクトされたヒト初代肝細胞におけるANGPTL3のgRNAとmRNAの各々の組み合わせに対するオンターゲット編集の相対的効力を示す。ABE8.8をコードするMA004、ABE8.8 D1135EをコードするMA040、及びABE8.8 R691A/D1135EをコードするMA041を使用した実験1からの結果であり、ANGPTL3は、gRNA凡例に指定されるように、gRNA GA441、GA442、GA472、GA473、GA474、GA475、GA476及びGA477を標的としており、グラフに左から右への順に示される。

20

【図20C】様々なANGPTL3 gRNA並びにABE mRNAであるmRNA MA004及びそれらのバリエーションMA040、MA041及びMA045を使用して生成されたデータを示し、示された濃度でトランスフェクトされたヒト初代肝細胞におけるANGPTL3のgRNAとmRNAの各々の組み合わせに対するオンターゲット編集の相対的効力を示す。ABE8.8をコードするMA004、ABE8.8 D1135EをコードするMA040、及びABE8.8 R691A/D1135EをコードするMA041を使用した実験1からの結果であり、ANGPTL3は、gRNA凡例に指定されるように、gRNA GA441、GA442、GA472、GA473、GA474、GA475、GA476及びGA477を標的としており、グラフに左から右への順に示される。

30

【図20D】様々なANGPTL3 gRNA並びにABE mRNAであるmRNA MA004及びそれらのバリエーションMA040、MA041及びMA045を使用して生成されたデータを示し、示された濃度でトランスフェクトされたヒト初代肝細胞におけるANGPTL3のgRNAとmRNAの各々の組み合わせに対するオンターゲット編集の相対的効力を示す。ABE8.8をコードするMA004、及びABE8.8 R691AをコードするMA045を使用した実験2からの結果である。

【図20E】様々なANGPTL3 gRNA並びにABE mRNAであるmRNA MA004及びそれらのバリエーションMA040、MA041及びMA045を使用して生成されたデータを示し、示された濃度でトランスフェクトされたヒト初代肝細胞におけるANGPTL3のgRNAとmRNAの各々の組み合わせに対するオンターゲット編集の相対的効力を示す。ABE8.8をコードするMA004、及びABE8.8 R691AをコードするMA045を使用した実験2からの結果である。

40

【図21】[0041]参照gRNAバリエーションでトランスフェクトされたヒト初代肝細胞とABE mRNA MA004との、示された4種類の濃度におけるPCSK9のオンターゲット編集率を示す比較グラフである。このグラフは、ヒト初代肝細胞における異なるgRNA間の相対的効力を示す。グラフの左から右に、4種類の濃度でのgRNAバリエーションは、それぞれ、GA346、GA376、GA377、GA380、GA381、G

50

A 3 8 2、G A 3 8 3、G A 3 8 4、G A 3 8 5、G A 3 8 6、G A 3 8 7、G A 3 8 8、G A 3 8 9、及び G A 3 9 1 である。

【図 2 2】[0042] 参照 gRNA バリエーションでトランスフェクトされたカニクイザル初代肝細胞と ABE mRNA MA004 との、示された 4 種類の濃度における PCSK9 のオンターゲット編集率を示す比較グラフである。このグラフは、参照 gRNA バリエーションに具現化された gRNA GA346 のスパーサーと tracr 化学バリエーションとの間の初代肝細胞における相対的効力を示す。グラフの左から右に、4 種類の濃度での gRNA バリエーションは、それぞれ、GA346、GA376、GA377、GA380、GA381、GA382、GA383、GA384、GA385、GA386、GA387、GA388、GA389、及び GA391 である。

10

【図 2 3】[0043] 312.5 ng / TA / mL ~ 2500 ng / TA / mL のガイド濃度の gRNA である GA376、GA377、GA380 - GA389、GA391 及び GA066 (左から右) と組み合わせた ABE mRNA M004 でトランスフェクトされた初代肝細胞の PCSK9 のオンターゲット編集率を示す比較グラフである。この試験では、4 種類の異なるロットの GA066 を使用した。GA376、GA377、GA380、GA383、GA385 及び GA386 は、GA066 と同等の用量応答を示した。このグラフは、ヒト初代肝細胞における gRNA 間の相対的効力を示す。

【図 2 4】[0044] ヒトにおける ABE mRNA MA004 及びガイド RNA GA346 で構成される LNP の予測曝露を示す表である。本明細書に開示される NHP データを使用した薬物動態 (「PK」) モデリングを使用して、ヒト対象における曝露相関及び潜在的な安全性マージンを予測した。略称: AUC = 血漿濃度 - 時間曲線下の面積、血漿 C_{max} = 血漿最大濃度、NHP = 非ヒト霊長類。モデリングには、以下の仮定を採用した。(a) 段階的な注入: 最初の 15 分間の注入速度 (体積に関して) は、1 mL / 分である。残りの注入時間については、注入速度は、3 mL / 分である。(b) 75 kg の人についての予測曝露。(c) NHP の場合、2 mg / kg (単回投薬血漿 C_{max} 及び AUC_{inf} は、平均値であった。

20

【図 2 5】[0045] 予測 PK - PD モデリングに基づいて本明細書に記載の LNP に製剤化され、ヒト対象の体重によって、NHP よりもヒトにおいて等価及び 3 倍高い効力で破壊された、異なる用量の ABE mRNA MA004 及びガイド RNA 346 での PCSK9 ヒト対象における減少率を示す表である。PCSK9 減少 % = 100 % - ベースラインに対して残った PCSK9 %。これは、ヒト投薬及び他の因子を予測する 1 つの方法に過ぎず、使用される特定の mRNA 及び実施されるアッセイに影響を及ぼし得る。

30

【図 2 6】[0046] 参照 ABE mRNA 並びに示されている ANGPTL3 ガイド RNA である GA441、GA475 及び GA476 でトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット候補部位 B2 の相対的編集割合を示す。各試料の相対的編集割合を、部位 B2 の GA441 / MA004 試料に対して正規化した。

【図 2 7】[0047] 参照 ABE mRNA 並びに示されている ANGPTL3 ガイド RNA である GA441、GA475 及び GA476 でトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット候補部位 B6 の相対的編集割合を示す。各試料の相対的編集割合を、部位 B6 の GA441 / MA004 試料に対して正規化した。

40

【図 2 8 A】[0048] ガイド核酸を含む遺伝子編集系の例示的なスキームを示す。ガイド核酸は、第 1 の例示的なモチーフを有するスパーサー配列を含む。本明細書に開示される gRNA である GA837、GA693 及び GA749 は、このモチーフの実施形態である。

【図 2 8 B】[0049] ガイド核酸を含む遺伝子編集系の別の例示的なスキームを示す。ガイド核酸は、第 2 の例示的なモチーフを有するスパーサー配列を含む。本明細書に開示される gRNA である GA745、GA692 及び GA748 は、このモチーフの実施形態である。

【図 2 8 C】[0050] ガイド核酸を含む遺伝子編集系の別の例示的なスキームを示す。ガイド核酸は、第 3 の例示的なモチーフを有するスパーサー配列を含む。本明細書に開示さ

50

れる gRNA である GA682、GA723 及び GA746 は、このモチーフの実施形態である。

【図28D】[0051]ガイド核酸を含む遺伝子編集系の別の例示的なスキームを示す。ガイド核酸は、第4の例示的なモチーフを有するスペーサー配列を含む。本明細書に開示される gRNA である GA691、GA724 及び GA747 は、このモチーフの実施形態である。

【図29】[0052] MessengerMax トランスフェクション条件下でのスペーサー配列を含むガイド核酸（ガイド核酸 GA675-GA684）についての初期のオンターゲットインビトロスクリーニングからの標的遺伝子 ANGPTL3 結果の標的編集率を示す。GA441 を対照として使用した。初代ヒト肝細胞（PHH）細胞（ロット STL）をこの試験に使用した。各ガイドを、5, 000 ng/mL、2, 500 ng/mL、1, 250 ng/mL、及び 625 ng/mL の濃度でスクリーニングし、その結果は、各ガイドについてグラフ内で左から右へ濃度低下順に列で表される。

10

【図30】[0053] PHH 細胞（ロット STL）における MessengerMax トランスフェクション条件下でのスペーサー配列を含むガイド核酸（ガイド核酸 GA685-GA694）及び対照ガイド RNA GA441 についての初期のオンターゲットスクリーニングからの標的遺伝子 ANGPTL3 結果の標的編集率を示す。各ガイドを、5, 000 ng/mL、2, 500 ng/mL、1, 250 ng/mL、及び 625 ng/mL の濃度でスクリーニングし、その結果は、各ガイドについてグラフ内で左から右へ濃度低下順に列で表される。

20

【図31】[0054] PHH 細胞（ロット STL）における MessengerMax トランスフェクション条件下での GA675-GA684 のスペーサー配列を含む ANGPTL3 ガイド核酸及び対照ガイド RNA GA441 に基づくインビトロオフターゲット（OT1）編集の結果を示す。

【図32】[0055] PHH 細胞（ロット STL）における MessengerMax トランスフェクション条件下での GA685-GA694 のスペーサー配列を含む ANGPTL3 ガイド核酸及び対照ガイド RNA GA441 に基づくインビトロオフターゲット（OT1）編集の結果を示す。

【図33】[0056] PHH 細胞（ロット STL）における MessengerMax トランスフェクション条件下による GA695-GA715 の追加のスペーサー配列を含む ANGPTL3 ガイド核酸及び対照ガイド RNA GA441 についての初期のインビトロオンターゲットスクリーニングからの結果を示す。

30

【図34】[0057] PHH 細胞（ロット IRZ）における MessengerMax トランスフェクションによる、選択されたスペーサー配列を含むガイド核酸（GA675、GA677、GA678、GA680、GA682、GA683、GA685-GA695）及び ANGPTL3 対照ガイド RNA GA441 を用いたフォローアップ実験からの、インビトロオンターゲット並びに選択されたオフターゲット（OT1 及び OT3 部位）編集結果を示す。

【図35A】[0058] PHH 細胞（ロット IRZ）における MessengerMax トランスフェクション条件下での選択されたスペーサー配列を含む 16 種類の ANGPTL3 ガイド核酸及び ANGPTL3 対照ガイド RNA GA441 の 50 ng の DNA インプットを使用した、標的及びオフターゲット（OT1、OT2、OT3 及び他の OT）編集の SureSelect インビトロ試験の結果を示す。

40

【図35B】[0059] PHH 細胞（ロット IRZ）における MessengerMax トランスフェクション条件下での選択されたスペーサー配列を含む 10 種類の ANGPTL3 ガイド核酸及び ANGPTL3 対照ガイド RNA GA441 の 150 ng の DNA インプットを使用した、オンターゲット及びオフターゲット（OT1、OT2、OT3 及び他の OT）編集の SureSelect インビトロ試験の結果を示す。

【図36A】[0060] 様々な ANGPTL3 ガイドを使用した LNP トランスフェクション実験からの結果を示す。2つの異なる用量の LNP での PHH 細胞（ロット IRZ）に

50

おけるトランスフェクションのための L N P の使用からのオンターゲットインビトロ編集結果を示す。

【図 3 6 B】様々な A N G P T L 3 ガイドを使用した L N P トランスフェクション実験からの結果を示す。対照の場合を除き、1 回の用量のみの同じ L N P トランスフェクション実験から得られたオフターゲット編集を示す。これらの試験で使用した L N P を表 5 に記載している。

【図 3 7】[0061] P H H 細胞（ロット I R Z）における L N P トランスフェクション実験から得られた A N G P T L 3 オンターゲット及びオフターゲット（O T 1、O T 2、O T 3 及び他の O T）編集の S u r e S e l e c t インビトロ試験の結果を示す。これらの試験で使用した L N P を表 5 に記載している。

10

【図 3 8 A】[0062] P H H 細胞（ロット I R Z）における L N P トランスフェクション実験の S u r e S e l e c t インビトロオンターゲット並びにオフターゲット（O T 1、O T 2、O T 3 及び他の O T）編集結果のサブセットを示す。これらの試験で使用した L N P を表 5 に記載している。

【図 3 8 B】[0063] L N P トランスフェクション実験の同じサブセットデータの標的化アンプリコンインビトロオンターゲット及び O T 1 編集結果を示す。

【図 3 9 A】[0064] P H H 細胞（ロット I R Z）における M e s s e n g e r M a x トランスフェクション実験の S u r e S e l e c t インビトロオンターゲット並びにオフターゲット（O T 1、O T 2、O T 3 及び他の O T）編集結果のサブセットを示す。

【図 3 9 B】[0065] M e s s e n g e r M a x トランスフェクション実験の同じサブセットデータの標的化アンプリコンインビトロオンターゲット並びにオフターゲット O T 1 及び O T 3 編集結果を示す。

20

【図 4 0】[0066] 標的化アンプリコン配列決定を使用して評価された P H H 細胞（ロット I R Z）におけるスペーサー改変 A N G P T L 3 ガイド核酸を含む異なる L N P 製剤によって生成される A N G P T L 3 編集のインビトロオンターゲット用量応答試験の結果を示す。製剤、g R N A 及び m R N A I D の後続く小数点の後ろの 3 桁は、それぞれの製剤、g R N A 及び m R N A のロット又はバッチ番号を示す。これらの試験に使用した L N P を表 5 に記載している。

【図 4 1】[0067] 本明細書に指定され、記載される様々な改変スペーサー配列を有する A N G P T L 3 ガイド核酸を含む異なる L N P 製剤によって生成されるオフターゲット編集割合データの比較図である。図 4 1 A は、O T 1 プライマーを使用したインビトロオフターゲット編集結果を示す。これらの試験に使用した L N P を表 5 に記載している。図 4 1 B は、O T 3 プライマーを使用したオフターゲット編集結果を示す。製剤、g R N A 及び m R N A I D の後続く小数点の後ろの 3 桁は、それぞれの製剤、g R N A 及び m R N A のロット又はバッチ番号を示す。これらの試験に使用した L N P を表 5 に記載している。

30

【図 4 2】[0068] 標的化アンプリコン配列決定を使用して評価された 4 名の異なるドナーからの P H H 細胞（ロット N F X、G N A、I R Z、及び L F Q）における G A 8 3 7 及び M A 0 7 9 を含有する L N P を使用した A N G P T L 3 編集のインビトロオンターゲット用量応答試験の結果を示す。L N P（V F 1 5 4 2）は表 5 に記載している。

40

【図 4 3 A】[0069] 2 つの生物学的複製物についての P H H 細胞（ロット I R Z）において、単回用量でトランスフェクトされた G A 8 3 7 及び M A 0 7 9 を含有する L N P の（治療試料から未治療試料を引いた正味の編集としての）インビトロオンターゲット A N G P T L 3 編集結果の結果を示す。各棒グラフの上に示されている平均の正味の編集 % は、2 つの技術的複製物から導出される。L N P（V F 1 5 4 2）は表 5 に記載している。

【図 4 3 B】[0070] 図 4 3 A の A N G P T L 3 編集データの同じサブセットの 1 つの複製物（複製物 1）からのゲノム DNA の O G M（光学ゲノムマッピング）分析を示す。C i r c o s プロットは、個々の未治療対象（左）及び A B E 治療（すなわち、L N P（V F 1 5 4 2）治療）（中央）試料についての全ての S V（構造変異）カテゴリー（挿入、複製、欠失、反転、及び転座）を示す。B i o n a n o D u a l 分析パイプラインを使

50

用して、治療状態に固有のSVを特定した。明確なABE未治療対照のCircosプロット（右）によって示されるように、特に固有のSVは特定されなかった。gRNA、mRNA、及びLNP製剤は、図43Aと同じである。

【図44A】[0071]LNP治療されたNHPにおいて同じスペーサー配列を含む選択された（カニクイザル等価物）スペーサー改変ガイド核酸GA347、GA663、GA666、GA668、GA665、GA720、及びmRNA MA004による肝臓ANGPTL3オンターゲット編集を示す。

【図44B】LNPの単回用量IV投与後15日目の対応するANGPTL3タンパク質減少を示す。この試験に使用したLNPを表6に記載している。

【図45】[0072]PCH中のLNPにおける、選択された（カニクイザル等価物）スペーサー改変ガイド核酸GA347、GA663、GA666、GA668、GA665、GA720によるインビトロオンターゲット編集割合を示す。等価なスペーサー配列を有する対応するヒトgRNA IDを下側に列挙する。この試験に使用したLNPを表6に記載している。

【図46】[0073]同じスペーサー配列を含む選択されたスペーサー改変ガイド核酸GA347、GA668、GA748及びGA749、並びにmRNA MA079で構築されたLNPの単回用量をIV注入した後のNHPにおける肝臓ANGPTL3オンターゲット編集を示す。カニクイザルへの注射後15日目に編集をアッセイし、54%以上の肝臓ANGPTL3編集を達成した。この試験に使用したLNPを表6に記載している。

【図47】[0074]同じスペーサー配列を含むスペーサー改変ガイド核酸が、NHP投与後15日目に血漿ANGPTL3タンパク質の有意な減少を達成したことを示す。全てのスペーサー改変ガイド核酸は、評価された全ての用量レベルで血漿ANGPTL3タンパク質の90%を超える減少をもたらした。この試験に使用したLNPを表6に記載している。

【発明を実施するための形態】

【0031】

[0075]本説明のある特定の詳細は、様々な態様及び実施形態のより完全な理解を提供するために記載される。しかしながら、当業者は、本開示が、本明細書に開示されるある特定の詳細を用いず実施され得ることを理解するであろう。他の事例では、実施形態の説明を不必要に不明瞭にすることを回避するために、周知の構造が示されておらず、又は詳細に説明されていない。

【0032】

[0076]別途定義されない限り、本明細書に使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する当該技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様又は等価の方法及び材料を、本開示の実施又は試験に使用することができるが、好適な方法及び材料を、以下に記載する。更に、本明細書で提供される見出しは、単に便宜上のものであり、特許請求される開示の範囲又は意味を解釈するものではない。本明細書で論じられる任意の実施形態は、本開示の任意の方法又は組成物に関して実施することができ、逆もまた同様であることが企図される。更に、本開示の組成物を使用して、本開示の方法を達成することができる。

【0033】

定義

[0077]本開示の理解を容易にするために、いくつかの用語及び語句が、以下に定義される。

【0034】

[0078]本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈から明らかにそうではない限り、複数の指示対象を含む。

【0035】

[0079]また、「又は」という用語は、内容が別途明確に指示しない限り、「及び／又は」を含むその意味で一般に使用されることに留意されたい。「及び／又は」及び「それ

10

20

30

40

50

らの任意の組み合わせ」という用語、並びに本明細書で使用されるそれらの文法的等価物は、互換的に使用され得る。これらの用語は、任意の組み合わせが具体的に企図されていることを伝えることができる。単に例示的な目的のために、以下の「A、B、及び／又はC」又は「A、B、C、又はそれらの任意の組み合わせ」という語句は、「個別的にA、個別的にB、個別的にC、A及びB、B及びC、A及びC、並びにA、B、及びC」を意味することができる。「又は」という用語は、文脈が具体的に選言的使用を指す場合を除いて、接続的又は選言的に使用され得る。

【0036】

【0080】「約」又は「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値に対する許容可能な誤差範囲内であることを意味することができ、これは、その値が、どのように測定又は決定されるか、すなわち、測定システムの制限に一部依存する。例えば、「約」は、当該技術分野における慣例に従って、1以内又は1を超える標準偏差を意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の20%まで、10%まで、5%まで、又は1%までの範囲を意味し得る。あるいは、特に生体系又はプロセスに関して、この用語は、値の1桁以内、5倍以内、より好ましくは2倍以内であることを意味し得る。本出願及び特許請求の範囲において特定の値が記載される場合、別途記載されない限り、特定の値について許容可能な誤差範囲内であることを意味する「約」という用語が、想定されるべきである。

10

【0037】

【0081】本明細書及び特許請求の範囲（複数可）で使用される場合、「含む（comprising）」（並びに「含む（comprise）」及び「含む（comprises）」などの、含むの任意の形態）、「有する（having）」（並びに「有する（have）」及び「有する（has）」などの、有するの任意の形態）、「含む（including）」（並びに「含む（includes）」及び「含む（include）」などの、含むの任意の形態）又は「含有する（containing）」（並びに「含有する（contains）」及び「含有する（contain）」などの、含有するの任意の形態）という単語は、包括的又はオープンエンドであり、追加の、列挙されていない要素又は方法ステップを除外しない。

20

【0038】

【0082】本明細書で使用される場合、「いくつかの実施形態」、「ある実施形態」、「一実施形態」、「複数の実施形態」又は「他の実施形態」への言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徵、構造、又は特性が、本開示の少なくともいくつかの実施形態に含まれるが、必ずしも全ての実施形態に含まれるわけではないことを意味する。

30

【0039】

【0083】本明細書で使用される「核酸」という用語は、一本鎖又は二本鎖のいずれかの形態で少なくとも2つのヌクレオチド（すなわち、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド）を含有するポリマーを指し、DNA及びRNA、DNA及びRNAのハイブリッド、並びにそれらの組み合わせを含む。本明細書で使用される「核酸」という用語はまた、一本鎖又は二本鎖のいずれかの形態で少なくとも2つの化学的に改変されたヌクレオチド（すなわち、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド）を含有するポリマーを指し、DNA及びRNA、DNA及びRNAのハイブリッド、並びにそれらの組み合わせを含む。

40

【0040】

【0084】「ヌクレオチド」という用語は、糖デオキシリボース（DNA）又はリボース（RNA）、塩基、及びリン酸基を含有する分子を指す。ヌクレオチドは、リン酸基を介して一緒に連結される。「塩基」には、プリン及びピリミジンが含まれ、天然化合物であるアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、及び天然類似体、並びにプリン及びピリミジンの合成誘導体が更に含まれ、限定されないが、新しい反応性基（これらに限定されないが、アミン、アルコール、チオール、カルボキシレート、及びハロゲン化アルキルなど）を配置する修飾が含まれる。

50

【0041】

[0085] 核酸は、任意のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含み、断片は、一般にオリゴヌクレオチドと称される最大60個のヌクレオチドを含有し、より長い断片は、ポリヌクレオチドと称される。デオキシリボースオリゴヌクレオチドは、デオキシリボースと呼ばれる5炭素糖からなり、この糖の5'炭素及び3'炭素でホスフェートに共有結合されて、交互に分岐していないポリマーを形成する。リボオリゴヌクレオチドは、5炭素糖がリボースである類似の反復構造からなる。したがって、「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然に存在する塩基、糖及び糖間（骨格）結合からなるヌクレオチド又はヌクレオシドモノマーのポリマー又はオリゴマーを指し得る。加えて、核酸は、既知のヌクレオチド類似体又は改変骨格残基若しくは結合を含有する核酸を含み、これらは、合成、非標準、及び／又は天然に存在せず、参照核酸と同様の結合特性を有する。核酸は、塩基部分（例えば、典型的には相補的ヌクレオチドと水素結合を形成するために利用可能な1つ以上の原子、及び／又は典型的には相補的ヌクレオチドと水素結合を形成することができない1つ以上の原子）、糖部分、又はリン酸骨格で改変され得る。骨格改変には、限定されないが、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデート、ホスホラミデート、及びホスホロジアミデート結合が含まれ得る。ホスホロチオエート結合は、リン酸骨格中の非架橋酸素の硫黄原子を置き換え、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ分解を遅らせる。ホスホロジアミデート結合（N3'→P5'）は、ヌクレアーゼの認識及び分解を防止することを可能にする。骨格改変はまた、骨格構造中にリンの代わりにペプチド結合（例えば、ペプチド核酸中のペプチド結合によって連結されたN-（2-アミノエチル）-グリシン単位）を有すること、又はカルバメート、アミド、並びに直鎖及び環状炭化水素基を含む連結基を有するものを含み得る。改変骨格を有するオリゴヌクレオチドは、Micklefield, Backbone modification of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications, Curr. Med. Chem., 8(10):1157-79, 2001及びLyer et al., Modified oligonucleotides-synthesis, properties and applications, Curr. Opin. Mol. Ther., 1(3):344-358, 1999にまとめられている。

10

20

30

【0042】

[0086] 本明細書に記載される核酸分子は、天然に存在するヌクレオチドに存在するような、リボース又はデオキシリボースを含む糖部分、又は改変糖部分若しくは糖類似体を含有し得る。改変糖部分の例としては、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル、2'-O-アミノエチル、2'-フルオロ、N3'→P5'ホスホラミデート、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、2',2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ、2'-グアニジニウム、2'-O-グアニジニウムエチル、カルバメート改変糖、及び二環式改変糖が挙げられるが、これらに限定されない。2'-O-メチル又は2'-O-メトキシエチル改変は、オリゴヌクレオチド中のA型又はRNA様コンフォメーションを促進し、RNAへの結合親和性を増加させ、ヌクレアーゼ耐性を増強した。改変糖部分はまた、余分な架橋結合（例えば、ロックド核酸中のリボースの2'-O及び4'-C原子を接続するメチレン架橋）又はモルホリン環などの糖類似体（例えば、ホスホロジアミデートモルホリンのような）を有するものを含み得る。そのような類似体及び／又は改変残基の例としては、ジアミノプリン、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2'-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチル

40

50

アミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、2,6-ジアミノプリン、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸(PNA)などが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合では、ヌクレオチドは、三リン酸部分への改変を含む、そのリン酸部分における改変を含み得る。そのような改変の非限定的な例としては、より長い長さのリン酸鎖(例えば、4、5、6、7、8、9、10個又はそれよりも多くのリン酸部分を有するリン酸鎖)、及びチオール部分(例えば、アルファ-チオトリホフェート及びベータ-チオトリホスフェート)による改変が挙げられる。そのような改変又は置換オリゴヌクレオチドは、例えば、増強された細胞取り込み、減少した免疫原性、及びヌクレアーゼの存在下での増加した安定性などの特性のために、天然形態よりも好ましいことが多い。したがって、「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語はまた、同様に機能する天然に存在しないモノマー、又はその一部を含むポリマー又はオリゴマーを含み得る。

10

【0043】

【0087】別途指示されない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的に改変されたバリエーション(例えば、縮重コドン置換)、対立遺伝子、オルソログ、SNP、及び相補配列、並びに明示的に示される配列を暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された(又は全ての)コドンの第3の位置が混合塩基及び/又はデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成され得る(Batzer et al., Nucleic Acid Res., 19:5081 (1991)、Ohtsuka et al., J. Biol. Chem., 260:2605-2608 (1985)、Rossolini et al., Mol. Cell. Probes, 8:91-98 (1994))。

20

【0044】

【0088】「ヌクレオシド」という用語は、デオキシリボース又はリボースと組み合わせた塩基からなる化合物を指す。ヌクレオシドには、リボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオシドが含まれるが、これらに限定されない。ヌクレオシドをリン酸化して、ヌクレオチドを得る。リボヌクレオシドとしては、アデノシン(A)、グアノシン(G)、5-メチルウリジン(m⁵U)、ウリジン(U)、及びシチジン(C)が挙げられる。デオキシリボヌクレオシドとしては、デオキシアデノシン(dA)、デオキシグアノシン(dG)、デオキシチミジン(dT)、デオキシウリジン(dU)、デオキシシチジン(dC)が挙げられる。デオキシリボース又はリボース(すなわち、糖部分)を改変し得る。改変糖部分の例としては、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル、2'-O-アミノエチル、2'-フルオロ、N3'→P5'ホスホラミデート、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、2'-2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ、2'-グアニジニウム、2'-O-グアニジニウムエチル、カルバメート改変糖、及び二環式改変糖が挙げられるが、これらに限定されない。2'-O-メチル又は2'-O-メトキシエチル改変は、オリゴヌクレオチド中のA型又はRNA様コンフォメーションを促進し、RNAへの結合親和性を増加させ、ヌクレアーゼ耐性を増強した。改変糖部分はまた、余分な架橋結合(例えば、ロックド核酸中のリボースの2'-O及び4'-C原子を接続するメチレン架橋)又はモルホリン環などの糖類似体(例えば、ホスホロジアミデートモルホリンのような)を有するものを含み得る。そのような類似体及び/又は改変残基の例としては、ジアミノプリン、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルア

30

40

50

ミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオン6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、2,6-ジアミノプリン、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸(PNA)などが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0045】

【0089】「デオキシリボヌクレオチド」及び「2'-デオキシリボヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され、別途指定されない限り、非改変デオキシリボヌクレオチド及び化学的に改変されたデオキシリボヌクレオチドの両方を指す。

【0046】

【0090】「モチーフ」という用語は、本明細書で使用される場合、特定のヌクレオチドのパターン又は配置を指し、例えば、モチーフは、(i)スパーサー内の1つ以上の2'-デオキシリボヌクレオチド、(ii)スパーサー内の1つ以上の2'-デオキシリボヌクレオチド及び1つ以上のリボヌクレオチドの組み合わせ、(iii)スパーサー内の1つ以上の2'-デオキシリボヌクレオチド、1つ以上のリボヌクレオチド、及び1つ以上の2'-OMeリボヌクレオチドの組み合わせ(ここで、2'-OMeリボヌクレオチドは、2'-デオキシリボヌクレオチドの5'末端又は3'末端にあり得る)、(iv)スパーサー内の1つ以上の2'-デオキシリボヌクレオチド及び1つ以上の2'-OMeリボヌクレオチドの組み合わせ(ここで2'-OMeリボヌクレオチドは、2'デオキシヌクレオチドの5'末端又は3'末端に配置/位置し得る)、又は(v)ホスホノチオエート骨格を更に含む、先に開示された(i~iv)のモチーフのいずれかを指し得る。

20

【0047】

【0091】「ベクター」という用語は、本明細書で使用される場合、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。いくつかの例では、ベクターは、それらが作動可能に連結された核酸の発現を指示することができる発現ベクターである。「作動可能に連結された」という用語は、本明細書で使用される場合、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする方法で調節配列(複数可)に連結されていることを意味する。「調節配列」という用語には、本明細書で使用される場合、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御エレメントが含まれるが、これらに限定されない。そのような調節配列は当該技術分野で周知であり、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。発現ベクターの例としては、プラスミドベクター、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、SV40、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、レトロウイルスに基づくウイルスベクター(例えば、マウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、及びラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、及び乳房腫瘍ウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクター)、並びに他の組換えベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0048】

【0092】本明細書で使用される「オフターゲットティング」、「オフサイトターゲットティング」、又は「オフターゲット効果」という用語は、ガイド核酸のスパーサーが、スパーサー

50

が特異的に結合するように設計された標的配列以外のゲノムの配列に結合する場合を指す。結果として生じる意図しない結合は、標的遺伝子以外の遺伝子の意図しない編集を引き起こすであろう。

【0049】

[0093] 本明細書で使用される場合、「タンパク質」、「ポリペプチド」、及び「ペプチド」という用語は、互換的に使用され、ペプチド結合を介して連結され、2つ以上のポリペプチド鎖で構成され得るアミノ酸残基のポリマーを指す。「ポリペプチド」、「タンパク質」、及び「ペプチド」という用語は、アミド結合を介して一緒に接続された少なくとも2つのアミノ酸モノマーのポリマーを指す。アミノ酸は、L-光学異性体又はD-光学異性体であり得る。より具体的には、「ポリペプチド」、「タンパク質」、及び「ペプチド」という用語は、特定の順序（例えば、タンパク質をコードする遺伝子又はRNAのヌクレオチドの塩基配列によって決定される順序）での2つ以上のアミノ酸で構成される分子を指す。タンパク質は、体の細胞、組織、及び器官の構造、機能、及び調節に不可欠であり、各タンパク質は、固有の機能を有する。例としては、ホルモン、酵素、抗体、及びそれらの任意の断片がある。いくつかの場合では、タンパク質は、タンパク質の一部、例えば、タンパク質のドメイン、サブドメイン、又はモチーフであり得る。いくつかの場合では、タンパク質は、タンパク質のバリエーション（又は変異）であってもよく、1つ以上のアミノ酸残基は、タンパク質の天然に存在する（又は少なくとも既知の）アミノ酸配列に挿入されるか、それから欠失されるか、及び／又はそれに置換される。タンパク質又はそのバリエーションは、天然に存在するか、又は組換えであり得る。生物学的材料中のポリペプチドの検出及び／又は測定のための方法は、当該技術分野で周知であり、限定されないが、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、ELISA、RIA、及び様々なプロテオミクス技術を含む。ポリペプチドを測定又は検出するための例示的な方法は、ELISAなどのイムノアッセイである。この種類のタンパク質定量化は、特異的抗原を捕捉することができる抗体と、捕捉された抗原を検出することができる第2の抗体とに基づくことができる。ポリペプチドの検出及び／又は測定のための例示的なアッセイは、Harlow, E. and Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*, (1988), Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載されている。

【0050】

[0094] 本明細書で使用される場合、「配列同一性」という用語は、2つの異なる配列の間で正確に一致するヌクレオチド又はアミノ酸の量を指す。RNA配列とDNA配列を比較する場合、ウラシル塩基及びチミン塩基は、同じ塩基であるとみなされる。ギャップはカウントされず、測定は典型的には、2つの配列のうちのより短い方に関連している。例えば、ヌクレオチド配列の場合、

A: A A G G C T T

B: A A G G C

C: A A G G C A T

ここで、同一性(A, B) = 100% (5個の同一のヌクレオチド／最小(長さ(A), 長さ(B)))。

同一性(B, C) = 100%であるが、同一性(A, C) = 85% (6個の同一のヌクレオチド／7個)。したがって、100%の同一性は、2つの配列が同じであることを意味するものではない。

アミノ酸配列の場合、

A: Ala Ala Gly Gly Gln His His

B: Ala Ala Gly Gly Gln

C: Ala Ala Gly Gly Gln Ala His

ここで、同一性(A, B) = 100% (5個の同一のアミノ酸／最小(長さ(A), 長さ(B)))。

同一性(B, C) = 100%であるが、同一性(A, C) = 85% (6個の同一のアミノ

酸／7個)。

【0051】

[0095]本明細書で使用される場合、「配列類似性」という用語は、1つの配列を、アラインメントされる他の配列の正確なコピー（編集距離）に変換するための最小数の編集操作（挿入、欠失、及び置換）を見つける最適なマッチング問題として説明することができる。これを使用して、上の例の配列類似性の割合は、 $\text{sim}(A, B) = 60\%$ 、 $\text{sim}(B, C) = 60\%$ 、 $\text{sim}(A, C) = 86\%$ である（セミグローバル、 $\text{sim} = 1 - (\text{編集距離} / \text{短い方の配列のアラインメントされていない長さ})$ ）である。

【0052】

[0096]それを必要とする「対象」とは、疾患、疾患の症状、又は疾患に向かう素因を有し、疾患、疾患の症状、又は疾患に向かう素因を治癒し、癒し、緩和し、和らげ、変化させ、治療し、改善し、改良し、又は影響を及ぼすことを目的とする個体を指す。いくつかの実施形態では、対象は、高コレステロール血症を有する。いくつかの実施形態では、対象は、アテローム動脈硬化性血管疾患を有する。いくつかの実施形態では、対象は、高トリグリセリド血症を有する。いくつかの実施形態では、対象は、糖尿病を有する。「対象」又は「患者」という用語は、哺乳動物を包含する。哺乳動物の例としては、限定されないが、哺乳類の任意のメンバー、ヒト、チンパンジー、及び他の類人猿及びサル種などの非ヒト霊長類；ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどの農場動物；ウサギ、イヌ、及びネコなどの飼育動物；ラット、マウス、及びモルモットなどのげっ歯類を含む実験動物などが挙げられる。

【0053】

[0097]「状態」という用語は、本明細書で使用される場合、疾患、障害、及び感受性を含む。いくつかの実施形態では、状態は、アテローム動脈硬化性血管疾患である。いくつかの実施形態では、状態は、高トリグリセリド血症である。いくつかの実施形態では、状態は、糖尿病である。

【0054】

[0098]「アテローム性動脈硬化」又は「アテローム動脈硬化性血管疾患」という用語は、本明細書で使用される場合、プラークの蓄積に起因して動脈の内側が狭くなる疾患を指す。いくつかの事例では、それにより、冠動脈疾患、卒中、末梢動脈疾患、又は腎臓の問題を引き起こす場合がある。

【0055】

[0099]「高トリグリセリド血症 (hypertriglyceridemia)」という用語は、本明細書で使用される場合、ほとんどの生物において最も豊富な脂肪分子であるトリグリセリド (triglyceride) の高い (hyper-) 血液濃度 (emia) を指す。トリグリセリドレベルの上昇は、高コレステロール血症 (高いコレステロールレベル) が存在しない場合であっても、アテローム性動脈硬化症に関連する可能性があり、心血管疾患の素因となり得る。非常に高いトリグリセリドレベルは、急性膵炎のリスクを高める可能性がある。高トリグリセリド血症は、過食、肥満、糖尿病及びインスリン抵抗性、過剰なアルコール摂取、腎不全、ネフローゼ症候群、遺伝的素因（例えば、家族性複合型高脂血症、すなわち、II型高脂血症）、リポタンパク質リパーゼ欠乏症、リソソーム酸リパーゼ欠乏症、コレステリルエステル貯蔵疾患、ある特定の医薬（例えば、イソトレチノイン、ヒドロクロロチアジド利尿薬、ベータ遮断薬、プロテアーゼ阻害剤）、甲状腺機能低下症（甲状腺機能不全）、全身性エリテマトーゼ及び関連する自己免疫応答、グリコーゲン貯蔵疾患1型、プロボフォール、又はHIV医薬と関連付けられ得る。

【0056】

[0100]「糖尿病」という用語は、本明細書で使用される場合、長期間にわたる高血糖レベルを特徴とする代謝性障害の一群を指す。糖尿病は、ベータ細胞の喪失に起因する膵臓の十分なインスリン産生の失敗から生じる1型糖尿病であり得る。糖尿病は、細胞がインスリンに適切に応答しない状態であるインスリン抵抗性を特徴とする2型糖尿病であり

得る。糖尿病は、糖尿病の既往歴のない妊婦が高血糖レベルを発症したときに発生する妊娠糖尿病であり得る。

【0057】

【0101】「低密度リポタンパク質（LDL）」という用語は、本明細書で使用される場合、リポタンパク質の外側リム及びコレステロール中心から構成される顕微鏡的な塊を指す。LDLは、リノレートとして知られる多価不飽和脂肪酸と、数百～数千のエステル化及び非エステル化コレステロール分子とから構成される高度に疎水性のコアを有し得る。LDLのコアはまた、トリグリセリド及び他の脂肪を運ぶことができ、リン脂質及び非エステル化コレステロールのシェルに囲まれている場合がある。

【0058】

【0102】「高密度リポタンパク質（HDL）」という用語は、本明細書で使用される場合、最小のリポタンパク質粒子を指す。血漿酵素レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）は、遊離コレステロールをコレステロールに変換し、次いでリポタンパク質粒子のコアに捕捉され、最終的に新しく合成されたHDLを球形にする。HDL粒子は、血流を循環し、細胞及び他のリポタンパク質からより多くのコレステロール及びリン脂質分子を組み込むにつれて、サイズが大きくなる可能性がある。

【0059】

【0103】「コレステロール」という用語は、本明細書で使用される場合、嵩高いステロイド構造を形成する4つの連結した炭化水素環から構成される固有の構造を有する脂質を指す。「トリグリセリド」という用語は、本明細書で使用される場合、3つの脂肪酸分子に結合したグリセロールから構成されるトリエステルを指す。いくつかの実施形態では、脂肪酸は、飽和又は不飽和の脂肪酸である。

【0060】

【0104】「治療する」、「治療すること」、又は「治療」という用語、及び本明細書で使用されるその文法的等価語は、疾患又は状態の少なくとも1つの症状を緩和、軽減、又は改善すること、追加の症状を予防すること、疾患又は状態を阻害すること、例えば、疾患又は状態の発症又は進行を遅延、低下、抑制、弱める、減らす、抑制する、又は安定化させること、疾患又は状態を和らげること、疾患又は状態の退縮を起こさせること、疾患又は状態によって引き起こされる状態を和らげること、疾患の重症度を減少させること、あるいは疾患又は状態の症状を予防的及び／又は治療的のいずれかで停止させることを含み得る。「治療すること」はまた、疾患若しくは状態及び／又は疾患若しくは状態に関連する副作用に関連する任意の症状若しくは他の悪影響の発生若しくは再発の頻度、又は重症度を低下させることを含む。「治療すること」は、必ずしも治癒結果を必要とするわけではない。除外されないが、障害又は状態を治療することはまた、それに関連する障害、状態、又は症状が完全に排除されることを必要としないことを理解されたい。「治療すること」という用語は、患者における特定の疾患又は障害の重症度を減少させること、又はその再発を遅延させること、例えば、疾患に罹患していた患者における寛解期間を延長することを指す「管理すること」の概念を包含する。「治療すること」は、疾患又は状態の発生又は疑いのある発生の後の対象への適用又は投与又は組成物を指し得る。

【0061】

【0105】「治療すること」という用語は、「予防する」、「予防すること」、及び「予防」の概念を更に包含する。「予防する」、「予防すること」、及び「予防」という用語は、本明細書で使用される場合、疾患又は状態を有していないが、疾患又は状態を発症するリスクがあるか、又は発症しやすい対象における状態の病的状態の発生の低下を指す。予防は、完全であってもよく、例えば、対象における状態の病的状態の完全な不存在であってもよい。予防はまた、対象における状態の病的状態の発生が本開示なしで発生したであろうものよりも少ないように、部分的であってもよい。

【0062】

【0106】「状態を治療又は予防すること」とは、例えば、等価な未治療対照と比較して、障害の症状を緩和することは、任意の標準的な技術によって測定される場合、少なくとも

10

20

30

40

50

も 3 %、5 %、10 %、20 %、40 %、50 %、60 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、99.5 %、99.9 %、又は 100 % の減少又は予防の程度を伴い得る。いくつかの実施形態では、ある障害の症状を緩和することは、等価な未治療対照と比較して、少なくとも 2、3、4、5、10、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、又は 10000 倍の減少又は予防の程度を伴い得る。

【0063】

【0107】本明細書で使用される場合、疾患の発症を「遅延させること」は、疾患の発症を先送り、阻害、緩徐化、減速、安定化、及び／又は延期することを意味する。この遅延は、治療される疾患及び／又は個体の病歴に応じて、様々な時間の長さであり得る。疾患の発症を「遅延させる」か、又は緩和するか、又は疾患の発生を遅延させる方法は、その方法を使用しない場合と比較して、所与の時間枠内に疾患の 1 つ以上の症状を発症する可能性を減少させる方法であり、及び／又は所与の時間枠内の症状の程度を減少させる方法である。そのような比較は、典型的には、統計的に有意な結果を与えるのに十分な数の対象を使用した、臨床研究に基づいている。

10

【0064】

【0108】疾患の「発症」又は「進行」は、疾患の初期の発現及び／又はそれに続く進行を意味する。疾患の発症は、当該技術分野で周知の標準的な臨床技術を使用して検出可能であり、評価可能である。しかしながら、発症は、検出できない場合がある進行も指す。本開示の目的のために、発症又は進行は、症状の生物学的経過を指す。「発症」には、発生 (occurrence)、再発、及び発生 (onset) が含まれる。

20

【0065】

【0109】本明細書で使用される場合、疾患の「発生 (onset)」又は「発生 (occurrence)」は、初期発症及び／又は再発を含む。

【0066】

【0110】本明細書で使用される「投与すること」及びその文法的等価語は、本明細書に記載される薬学的組成物を対象又は患者に提供することを指し得る。医学分野の当業者に既知の従来する方法を使用して、治療される疾患の種類又は疾患の部位に応じて、組成物を対象に投与することができる。例えば、組成物は、例えば、経口、非経口、吸入スプレーによって、局所的に、直腸、経鼻、口腔、膣、インプラントしたリザーバを介して、又は注入によって投与され得る。1 つ以上のそのような経路を使用することができる。

30

【0067】

【0111】本明細書で使用される「非経口」という用語は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、腹腔内、真皮内、動脈内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、血管内、病巣内、及び頭蓋内注射又は注入技術を含む。加えて、1、3、又は 6 ヶ月のデポー注射可能又は生分解可能な材料及び方法を使用するなどの注射可能なデポー投与経路を介して対象に投与することができる。

【0068】

【0112】「同時投与すること」とは、1 つ以上の追加の治療レジメン又は薬剤又は治療、又は 1 つ以上の追加の治療剤の効果を増強するのに十分に近い時間での本開示の治療及び組成物を投与することを意味し、あるいはその逆である。この観点で、本明細書に記載の本開示の組成物は、1 つ以上の追加の治療レジメン又は薬剤又は治療と同時に、異なる時間に、又は全く異なる治療スケジュールで投与することができる (例えば、第 1 の治療は毎日行うことができるが、追加の治療は毎週である)。例えば、複数の実施形態では、二次治療レジメン又は薬剤又は治療は、本開示の組成物と同時、その前、又はその後に投与される。

40

【0069】

【0113】「薬学的組成物」という用語及び本明細書で使用されるその文法的等価語は、治療有効量の活性薬学的成分を、1 つ以上の薬学的に許容される賦形剤、担体、及び／又

50

は対象、例えば、それを必要とするヒトに投与される治療剤とともに含む混合物又は溶液を指し得る。

【0070】

【0114】本明細書で使用される「薬学的に許容される」という用語及びその文法上の等価語は、一般に安全、非毒性、かつ生物学的にも望ましくないものではなく、かつ獣医学的にもヒトの薬学的使用においても許容される薬学的組成物の調製において有用な材料の属性を指すことができる。「薬学的に許容される」は、化合物の生物学的活性又は特性を無効にせず、比較的非毒性である、すなわち、望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、又はそれが含有される薬学的組成物の構成要素のいずれかと有害な方法で相互作用することなく、対象に投与され得る、担体又は希釈剤などの材料を指し得る。

10

【0071】

【0115】「薬学的に許容される賦形剤、担体、又は希釈剤」は、薬剤とともに対象に投与することができ、その薬理学的活性を破壊せず、治療量の薬剤を送達するのに十分な用量で投与された場合に非毒性である賦形剤、担体、又は希釈剤を指す。

【0072】

【0116】「薬学的に許容される塩」は、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答、又は他の問題又は合併症を伴わずに、ヒト又は動物の組織と接触して使用するのに好適であるとして一般に当該技術分野で考えられる酸塩又は塩基塩であり得る。そのような塩には、アミンなどの塩基性残基の無機酸塩及び有機酸塩、並びにカルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩又は有機塩が含まれる。特定の薬学的塩には、塩酸、リン酸、臭化水素酸、リンゴ酸、グリコール酸、フマル酸、硫酸、スルファミン酸、スルファニル酸、ギ酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエチルスルホン酸、硝酸、安息香酸、2-アセトキシ安息香酸、クエン酸、酒石酸、乳酸、ステアリン酸、サリチル酸、グルタミン酸、アスコルビン酸、パモ酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、プロピオン酸、ヒドロキシマレイン酸、ヒドロヨード酸、フェニル酢酸、アルカン酸、例えば酢酸、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ (n は0~4である)などの酸の塩が含まれるが、これらに限定されない。同様に、薬学的に許容されるカチオンには、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウム、リチウム、及びアンモニウムが含まれるが、これらに限定されない。当業者であれば、本開示及び当業者の知識から、更なる薬学的に許容される塩としては、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985)に列挙されるものが挙げられることを認識するだろう。一般に、薬学的に許容される酸塩又は塩基塩は、任意の従来の化学的方法によって塩基性部分又は酸性部分を含有する親化合物から合成することができる。簡潔に述べると、そのような塩は、適切な溶媒中、これらの化合物の遊離酸若しくは塩基形態を、化学量論量の適切な塩基若しくは酸と反応させることによって調製することができる。

20

30

【0073】

【0117】「治療剤」という用語は、対象に投与されたときに、治療、診断、及び／又は予防効果を有する、及び／又は所望の生物学的及び／若しくは薬理学的効果を誘発する任意の薬剤を指し得る。治療剤は、「活性物質」又は「活性剤」とも称され得る。そのような薬剤には、限定されないが、細胞毒素、放射性イオン、化学療法剤、小分子薬物、タンパク質、及び核酸が含まれる。

40

【0074】

【0118】本明細書で使用される「治療有効量」は、単独で、又は1つ以上の他の治療薬と組み合わせて、対象に治療効果を与えるために必要な本開示の各組成物の量を指す。したがって、本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、ある疾患、障害、及び／又は状態に罹患しているか、又はその影響を受けやすい対象に投与された場合、その疾患、障害、及び／又は状態の発生を治療し、その症状を改良し、診断し、予防し、及び／又は遅延させるのに十分な送達される薬剤（例えば、核酸、組成物、治療剤、予防剤

50

など)の量を意味する。治療の観点で、「治療有効量」は、ある疾患又は状態、例えば、アテローム動脈硬化性血管疾患、高トリグリセリド血症、又は糖尿病の進行を緩和するか、改善するか、安定化するか、逆行させるか、又は遅らせるのに十分な量である。「治療有効量」は、当業者によって認識されるように、治療される特定の状態、状態の重症度、年齢、身体状態、サイズ、性別及び体重を含む個々の対象のパラメータ、治療の期間、同時療法の性質(存在する場合)、特定の投与経路などの医療従事者の知識及び専門知識内の同様の因子に応じて変化する。これらの因子は、当業者に周知であり、日常的な実験を超えない実験で対処することができる。一般に、個々の構成要素又はそれらの組み合わせの最大用量、すなわち、健全な医学的判断に従って最高安全用量が使用されることが好ましい。しかしながら、対象は、医学的理由、心理的理由、又は実質的に任意の他の理由から、より低い用量又は許容用量を主張し得ることは、当業者には理解されよう。加えて、患者が受けることができる他の医薬は、投与する治療薬の治療有効量の決定に影響を及ぼす。半減期などの経験的考察は、一般に、投薬量の決定に寄与するであろう。「治療有効量」は、単独で、又は状態を治療するために使用される1つ以上の薬剤と組み合わせて使用される本開示の組成物のいずれかの治療有効量であり得る。治療有効量は、1回以上の投与で投与することができる。

10

【0075】

【0119】「治療有効量」を決定する効果的な初期方法は、細胞培養アッセイ(例えば、神経細胞を使用して)を行うことによって、又は動物モデル(例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ又はブタ)を使用することによるものであり得る。用量は、細胞培養で決定されるように、IC50(すなわち、症状の半最大阻害を達成する組成物の濃度)を含む濃度範囲を達成するために、動物モデルで製剤化されてもよい。そのような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。本開示の組成物が治療上有効であるための適切な濃度範囲を決定することに加えて、動物モデルはまた、最大の有効性を与える好ましい投与経路などの他の関連情報をもたらし得る。上記の方法及び他の方法に基づいて、ヒトにおいて最大の有効性を達成するために用量を調整することは、十分に当業者の能力の範囲内である。

20

【0076】

【0120】本明細書で提供される範囲は、その範囲内の全ての値の略記であると理解される。例えば、1~50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50からなる群からの任意の数、数の組み合わせ、又は部分範囲、並びに例えば、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、及び1.9などの上述の整数の間の全てのその間の10進法の値を含むと理解される。部分範囲に関して、範囲のいずれかの端点から延びる「中に含まれる部分範囲」が具体的に企図される。例えば、1~50の例示的な範囲の中に含まれる部分範囲は、一方向に1~10、1~20、1~30、及び1~40、又は他方向に50~40、50~30、50~20、及び50~10を含み得る。

30

40

【0077】

【0121】本明細書で使用される「プロトスペーサー」又は「標的配列」という用語、及びそれらの文法的等価語は、標的遺伝子のDNA配列を指し得る。天然状態では、プロトスペーサーは、PAM(プロトスペーサー隣接モチーフ)に隣接している。RNAガイドヌクレアーゼによる切断部位は、プロトスペーサー配列内にある。

【0078】

【0122】「スペーサー」又は「スペーサー配列」という用語は、相補的であり、かつ標的遺伝子の相補鎖に結合する核酸配列を指す。スペーサーは、ガイド核酸(例えば、gRNA、gDRNA)内にあり得る。

【0079】

50

[0123]本明細書で使用される「塩基編集」、「遺伝子編集」、「ゲノム編集」、又は「遺伝子改変」という用語及びその文法的等価語は、1つ以上のヌクレオチドがゲノムから挿入、置き換え、又は除去される遺伝子操作を指し得る。遺伝子編集は、ヌクレアーゼ（例えば、天然に存在するヌクレアーゼ又は人工的に操作されたヌクレアーゼ）を使用し、行うことができる。遺伝子改変は、二本鎖切断、ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライス部位変化、又はポリヌクレオチド配列、例えば、標的ポリヌクレオチド配列の反転の導入を含み得る。

【0080】

[0124]本明細書で使用される「塩基エディター」という用語は、ポリヌクレオチドに結合し、核酸塩基改変活性を有する薬剤を指し得る。塩基エディターは、ガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドRNA）と併せて、核酸塩基改変ポリペプチド（例えば、デアミナーゼ）及び核酸プログラマブルヌクレオチド結合ドメイン、又はプログラマブルヌクレオチド結合ドメイン及びデアミナーゼをコードする核酸を含み得る。薬剤は、塩基編集活性を有するタンパク質ドメイン、すなわち、核酸分子（例えば、DNA）内の塩基（例えば、A、T、C、G、又はU）を改変することができるドメインを含む生体分子複合体、又はそれらをコードする核酸であり得る。ポリヌクレオチドプログラマブルDNA結合ドメインは、デアミナーゼドメインに融合又は連結されてもよく、塩基エディター融合タンパク質をもたらす。塩基エディターは、塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸、例えば、塩基エディター融合タンパク質をコードするmRNAを含み得る。塩基エディター融合タンパク質は、1つ以上のリンカー、例えば、ペプチドリリンカーを含み得る。薬剤は、塩基編集活性を有するドメインを含む融合タンパク質であり得る。塩基編集活性を有するタンパク質ドメインは、ガイドRNAに連結され得る（例えば、ガイドRNA上のRNA結合モチーフ及びデアミナーゼに融合されたRNA結合ドメインを介して）。いくつかの事例では、塩基編集活性を有するドメインは、核酸分子内の塩基を脱アミノ化することができる。いくつかの事例では、塩基エディターは、DNA分子内の1つ以上の塩基を脱アミノ化することができる。いくつかの事例では、塩基エディターは、DNA内のアデノシン（A）を脱アミノ化することができる。塩基エディターは、アデノシン塩基エディター（ABE）であり得る。いくつかの事例では、塩基エディターは、DNA内のシトシン（C）を脱アミノ化することができる。塩基エディターは、シトシン塩基エディター（CBE）であり得る。

【0081】

[0125]「塩基エディター系」という用語は、標的ヌクレオチド配列の単一の核酸塩基を編集するための遺伝子編集系を指す。様々な実施形態では、塩基エディター系は、（1）ポリヌクレオチドプログラマブルヌクレオチド結合ドメイン（例えば、Cas9）と、（2）上述の核酸塩基を脱アミノ化するためのデアミナーゼドメイン（例えば、アデノシンデアミナーゼ又はシチジンデアミナーゼ）と、（3）1つ以上のガイドポリヌクレオチド（例えば、ガイドRNA）と、を含む。いくつかの実施形態では、塩基エディター系は、（1）及び（2）を含む塩基エディター融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドプログラマブルヌクレオチド結合ドメインは、ポリヌクレオチドプログラマブルDNA結合ドメインである。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、アデニン又はアデノシン塩基エディター（ABE）である。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、シチジン塩基エディター（CBE）である。

【0082】

[0126]本明細書で使用される「プライム編集」という用語は、二本鎖DNA切断（DSB）又はドナーDNAテンプレートを必要とせずに、直接的で不可逆的な標的化された小さな挿入、欠失、及び塩基スワッピングを可能にする正確なゲノム編集の形態を指す。DNAプライムエディターは、逆転写酵素に融合された触媒的に無効なCas9ヌクレアーゼを含む。プライム編集は、CRISPR Cas9編集に使用される標準的なsgRNAよりも実質的に大きいプライム編集ガイドRNA（pegRNA）を伴う。pegRNAは、プライマー結合配列（PBS）と、3'末端に付加された所望のRNA配列を含

有するテンプレートと、を含む。

【0083】

[0127]本明細書における「CRISPR RNA」(crRNA)という用語は、1つ以上のCasタンパク質(例えば、Cas9)と複合体を形成することができ、かつその複合体にDNA結合特異性を提供するRNA配列を指す。crRNAは、DNA標的配列の鎖に相補的である「スペーサー配列」を含有するため、DNA結合特異性を提供する。crRNAは、crRNAの由来となるCRISPR遺伝子座の反復領域によってコードされる「反復配列」(「tracrRNAメイト配列」)を更に含む。crRNAの反復配列は、tracrRNAの5'末端で配列にアニーリングすることができる。天然CRISPR系におけるcrRNAは、CRISPR遺伝子座から転写された「プレcrRNA」に由来する。プレcrRNAは、スペーサー領域及び反復領域を含み、スペーサー領域は、DNA標的部位配列に相補的な固有の配列を含有する。天然系におけるプレcrRNAは、複数の異なるcrRNAに処理され、各crRNAは、反復配列の一部とともにガイド配列を有する。CRISPR系は、例えば、DNA標的化特異性のためにcrRNAを利用する。

10

【0084】

[0128]本明細書における「トランス活性化CRISPR RNA」(tracrRNA)という用語は、II型のCRISPR系で使用される非コードRNAを指し、5'-3'方向に、(i)CRISPR II型のcrRNAの反復領域とアニーリングする配列と、(ii)ステムループ含有部分と、を含有する(Deltcheva et al., Nature 471:602-607)。改変tracrRNAは、改変リボヌクレオチド(例えば、2-OMe改変RNA)を有するtracrRNAを指す。

20

【0085】

[0129]本明細書で使用される場合、「ガイド核酸」という用語は、Casエンドヌクレアーゼと複合体を形成することができ、かつCasエンドヌクレアーゼがDNA標的部位を認識し、任意選択的に切断することを可能にするポリヌクレオチド配列に関する。ガイド核酸は、単一分子であっても二重分子であり得る。ガイド核酸配列は、DNAのみ(gDNA)であり得る。DNAは、改変又は非改変であり得る。ガイド核酸配列は、RNAのみ(gRNA)であり得る。RNAは、改変又は非改変であり得る。ガイド核酸配列は、DNA及びRNAの組み合わせであり得る。任意選択的に、ガイド核酸は、限定されないが、少なくとも1つのヌクレオチド、ホスホジエステル結合、又は結合改変、例えば、限定されないが、ロックド核酸(LNA)、5-メチルdC、2,6-ジアミノプリン、2'-フルオロA、2'-フルオロU、2'-O-メチルRNA、ホスホロチオエート結合、コレステロール分子への結合、ポリエチレングリコール分子への結合、スペーサー18(ヘキサエチレングリコール鎖)分子への結合、又は環化をもたらす5'-3'共有結合などを含み得る。リボ核酸のみを含むガイド核酸は、「ガイドRN」と称される。RNA及びDNAの両方を含むガイド核酸は、「ガイドRDNA」と称される。

30

【0086】

[0130]「部分肝切除術」は、本明細書で使用される場合、肝臓の一部を除去する手術を指す。いくつかの実施形態では、部分肝切除術は、インビボでの肝臓再生をモデリングするために使用される。

40

【0087】

[0131]本明細書で使用される場合、プロトスペーサーに対応するスペーサー配列は、標的プロトスペーサー核酸配列の相補鎖内の塩基に対する改変を行うことができる。プロトスペーサー配列に対応するスペーサー配列は、プロトスペーサー配列と同一であっても実質的に同一であってもよい。

【0088】

[0132]本明細書で使用される場合、「対応する」は、異なる配列又は構成ヨウ素が反応し得るか、又は結合し得る領域を指す。例えば、ガイドRNAの足場構成要素に対するCas9ニッカーゼの対応する領域は、ガイドRNAの足場構成要素に反応して結合する

50

ことができる Cas9 ニッカーゼの領域を指す。別の例では、スペーサー配列は、プロトスペーサー配列に対応し、スペーサー配列がプロトスペーサー配列に結合するという事実を指す。結合は、1つ以上のミスマッチを有する可能性がある。

【0089】

遺伝子編集系

【0133】クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (CRISPR) 系は、遺伝子編集のために採用され、バイオテクノロジー及びライフサイエンス分野に革命をもたらした。強力な遺伝子編集ツールであるにもかかわらず、CRISPR には、それ自体に欠点がある。主な課題の1つは、系によって引き起こされるオフターゲット変異である。(Yin et al., Nature Chemical Biology 14, 311-316 (2018))。ガイドRNAからのRNAヌクレオチド (リボヌクレオチド) をDNAヌクレオチド (デオキシリボヌクレオチド) で部分的に置き換えると、非改変ガイドRNAと比較してオフターゲット活性が低下する可能性があることが分かっている。そのようなDNA-RNAキメラガイドは、CRISPRハイブリッドDNA-RNA (chRNA) としても知られている。しかしながら、chRNAは、オフターゲット効果を減少させることができるが、多くの場合、オンターゲット編集効率を犠牲にすることによって行われる。したがって、特にインビボでは、低いオフターゲット効果で強力なオンターゲット編集効率を維持するCRISPR系のために最適化されたガイド核酸を見つけることが緊急に必要とされている。

【0090】

【0134】本開示は、オフターゲット編集の制限を克服しつつ、遺伝子編集のためにCRISPR系を使用することの多くの利点、すなわち、非常に効率的なプログラマブル遺伝子編集を提供する新規の遺伝子編集系を提供する。本明細書に記載の新規の遺伝子編集系は、新規のガイド核酸を使用して、遺伝子エディタータンパク質が標的遺伝子への変化に影響を及ぼすように指示することによって、オフターゲット効果を減少させた効率的な遺伝子編集結果を達成する。本明細書に開示されるように、新規のガイド核酸は、標的遺伝子にハイブリダイズする能力を維持しつつ、スペーサー配列内の少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチド及び少なくとも1つのリボヌクレオチドを含むスペーサー配列内のデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの混合物を含むように操作される。ガイド核酸内のデオキシリボヌクレオチド及び／又はリボヌクレオチドの数、位置、及び特異的改変は、ガイド核酸を含む遺伝子編集系が高いオンターゲット効率ではあるが低いオフターゲット効果で遺伝子編集を行うことが可能なように最適化される。いくつかの実施形態では、リボヌクレオチドのリボース上の2'ヒドロキシル基は、メチル基に共有結合するように改変され得る。図28A～図28Dは、本明細書に開示される例示的なスペーサー配列を含むガイド核酸を有する例示的な遺伝子編集系を提供する。図28Aに示されるように、例示的な遺伝子編集系(100)は、標的遺伝子(110)及びガイド核酸(120)に結合することができる核酸結合ドメインを含有する遺伝子エディタータンパク質(150)を含む。代表的なガイド核酸(120)は、リボヌクレオチド(RNA)及びデオキシリボヌクレオチド(DNA)の両方から構成されるスペーサー配列(130)を含む。スペーサー配列(130)は、標的遺伝子(110)からのプロトスペーサー(160)に相補的である。スペーサー配列(130)のいくつかの特定の位置で、デオキシリボヌクレオチドを有するリボヌクレオチドを、2'-OMe及びホスホロチオエート骨格化学修飾に置き換えると、スペーサー配列(130)に対して5'末端に固有のDNA-RNAハイブリッド配列モチーフがもたらされ、これにより、遺伝子エディタータンパク質(150)を標的配列(160)に導き、オフターゲット効果が減少した部位特異的オンターゲット遺伝子変化を誘発することができる。ここで、スペーサー配列(130)内の例示的なモチーフは、(2'-OMeRNA)(2'-OMeRNA)(DNA)(DNA)(RNA)(DNA)(DNA)(DNA)(DNA)である。特定のホスホロチオエート骨格改変は示されていないことに留意されたい。ガイド核酸(120)は、スペーサー配列(130)の3'末端にtracrRNA(140)又はその等価物を更に含む。tracr

rRNA (140) 又はその等価物は、遺伝子エディタータンパク質 (150) を標的配列 (160) に動員して、標的遺伝子 (110) の変化に影響を及ぼす。tracrRNA (140) は改変され得る。例えば、tracrRNA (140) は、2'-OMeRNA (図示せず) を含み得る。遺伝子エディタータンパク質 (150) は、塩基編集に使用することができるデアミナーゼを含み得る。図1B~図1Dは、他の例示的なスペーサー配列を含むガイド核酸を有する他の例示的な遺伝子編集系を示す。例えば、図28Bは、(2'-OMeRNA) (2'-OMeRNA) (DNA) (DNA) (RNA) (DNA) (DNA) のモチーフを有するスペーサー配列を示す。図28Cは、(2'-OMeRNA) (2'-OMeRNA) (DNA) (DNA) (DNA) (DNA) (DNA) の別のモチーフを有する別のスペーサー配列を示す。図28Dは、(2'-OMeRNA) (2'-OMeRNA) (2'-OMeRNA) (DNA) (DNA) (DNA) (DNA) (DNA) (RNA) (DNA) (DNA) (RNA) (RNA) (DNA) (DNA) の別のモチーフを有する別のスペーサー配列を示す。特定のホスホロチオエート骨格改変は示されていないことに留意されたい。図面は、概略図のみを目的としていることに留意されたい。

10

20

【0091】

【0135】本開示は更に、高いオンターゲット効率及び低いオフターゲット編集を有する、塩基編集のための新規の遺伝子編集系を提供する。本明細書に記載の塩基編集のための新規の遺伝子編集系は、本明細書に記載の新規のガイド核酸を使用して、デアミナーゼを含む遺伝子エディタータンパク質に標的遺伝子中の核酸塩基を改変するように指示することによって、利益を達成する。

【0092】

【0136】本開示は更に、高いオンターゲット効率及び低いオフターゲット編集を有する、ANGPTL3遺伝子を編集するための新規の遺伝子編集系を提供する。本明細書に記載のANGPTL3遺伝子を編集するための新規の遺伝子編集系は、新規のガイド核酸を使用して、遺伝子エディタータンパク質がANGPTL3遺伝子に対する変化に影響を及ぼすように指示することによって、利益を達成する。

【0093】

CRISPR/Cas系

【0137】いくつかの異なるCRISPR/Cas系が存在し、これらの命名法及び分類は、系が更に特徴付けられるにつれて変更される。CRISPR/Cas系は、新しい標的遺伝子座ごとに新規タンパク質操作を必要とし得る、エンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) を含む他のゲノム編集方法よりも優れている。

30

【0094】

【0138】エフェクターモジュールをコードする遺伝子 (すなわち、干渉段階に関与するタンパク質) に基づいて、CRISPR/Cas系は、クラス1又はクラス2のいずれかに配置することができる。クラス1の系は、複数のサブユニットcrRNAエフェクター複合体を有するが、クラス2の系は、単一のタンパク質、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、又はcrRNAエフェクター複合体を有する。クラス1の系は、I型、III型及びIV型の系を含む。クラス2の系は、II型及びV型の系を含む (Makarova et al., Nature Review Microbiology 13: 1-15 (2015))。

40

【0095】

【0139】I型の系は全て、ヘリカーゼ活性及び切断活性を有するCas3タンパク質を有する。I型の系は、7種類の亜型 (I-A~I-F及びI-U) に分けられる。III型の系は、cas10遺伝子を保有し、cas10遺伝子は、多数の核酸ポリメラーゼ及びシクラーゼのコアドメインと相同であり、かつIII型crRNA-エフェクター複合体の最大のサブユニットであるPalmドメイン (RNA認識モチーフ (RRM) のバリエーション) を含有するマルチドメインタンパク質をコードする。全てのIII遺伝子座はま

50

た、小さなサブユニットタンパク質、1つのCas5タンパク質、及び典型的にはいくつかのCas7タンパク質をコードする。III型は、4つのサブタイプIII-A~III-Dに分けることができる。サブタイプIII-Aは、小さなサブユニットをコードするcsm2遺伝子を有し、cas1、cas2及びcas6遺伝子も有する。サブタイプIII-Bは、小さなサブユニットをコードするcmr5遺伝子を有し、典型的には、cas1、cas2及びcas6遺伝子を欠く。サブタイプIII-Cは、不活性シクラゼ様ドメインを有するCas10タンパク質を有し、cas1及びcas2遺伝子を欠く。サブタイプIII-Dは、HDドメインを欠くCas10タンパク質を有し、cas1及びcas2遺伝子を欠き、csx10として知られるcas5様遺伝子を有する。IV型の系は、部分的に分解された大きなサブユニットCsf1、Cas5、Cas7、及びいくつかの場合には、推定される小さなサブユニットを含む最小マルチサブユニットcrRNA-エフェクター複合体をコードする。IV型の系は、cas1及びcas2遺伝子を欠く。IV型の系は、サブタイプを有していないが、2つの異なるバリエーションが存在する。一方のバリエーションは、DinGファミリーヘリカーゼを有するが、他方のバリエーションは、DinGファミリーヘリカーゼを欠くが、小さな α -ヘリカルタンパク質をコードする遺伝子を有する。

10

【0096】

【0140】II型の系は、cas1、cas2及びcas9遺伝子を有する。cas9は、crRNA-エフェクター複合体の機能を標的DNA切断と組み合わせるマルチドメインタンパク質をコードする。II型の系はまた、tracrRNAをコードする。II型の系は、サブタイプII-A、II-B及びII-Cといった3つのサブタイプに分けられる。サブタイプII-Aは、追加の遺伝子csn2を含有する。サブタイプII-Bは、csn2を欠くが、cas4を有する。サブタイプII-Cは、細菌において見出される最も一般的なII型の系であり、Cas1、Cas2及びCas9の3つのタンパク質のみを有する。V型の系は、cpf1遺伝子と、cas1及びcas2遺伝子とを有する。cpf1遺伝子は、Cas9のそれぞれのドメインに相同であるRuvC様ヌクレアーゼドメインを有するが、Cas9タンパク質中に存在するHNHヌクレアーゼドメインを欠くタンパク質Cpf1をコードする。

20

【0097】

【0141】クラス1の系では、発現及び干渉段階は、マルチサブユニットCRISPR RNA (crRNA) -エフェクター複合体を伴う。これらの系では、プレcrRNAは、マルチサブユニットcrRNA-エフェクター複合体に結合し、成熟crRNAへと処理される。I型及びIII型の系では、これは、RNAエンドヌクレアーゼ、例えば、Cas6を伴う。

30

【0098】

【0142】クラス1の系では、crRNAは、crRNA-エフェクター複合体と会合し、RNA結合ドメインによるヌクレアーゼ活性と、crRNAと標的核酸との間の塩基対形成とを組み合わせることによって、干渉を達成する。I型の系では、crRNA及びcrRNA-エフェクター複合体の標的結合は、小さなサブユニットタンパク質に融合されたCas7、Cas5、及びCas8を伴う。I型の系の標的核酸切断は、HDヌクレアーゼドメインを伴い、これが、スーパーファミリー2ヘリカーゼCas3'に融合されるか、又は別個の遺伝子cas3"によってコードされるかのいずれかである。III型の系では、crRNA及びcrRNA-エフェクター複合体の標的結合は、Cas7、Cas5、Cas10及び小さなサブユニットタンパク質を伴う。III型の系の標的核酸切断は、干渉中に一本鎖DNAを切断すると考えられる、Cas10に融合した別個のHDヌクレアーゼドメインを有する、Cas7及びCas10タンパク質の組み合わせた作用を伴う。

40

【0099】

【0143】クラス2の系では、発現及び干渉段階は、単一の大型タンパク質、例えば、Cas9、Cpf1、C2C1、C2C2、又はC2C3を伴う。ほとんどのクラス2のI

50

I型の系では、プレcrRNAは、Cas9に結合し、RNase III及びtracrRNAを伴うステップで、成熟crRNAへと処理される。

【0100】

【0144】クラス2の系では、crRNAは、単一のタンパク質と会合し、RNA結合ドメインによるヌクレアーゼ活性と、crRNAと標的核酸との間の塩基対形成とを組み合わせることによって、干渉を達成する。II型の系では、crRNA及び標的結合は、標的核酸切断と同様にCas9を伴う。II型の系では、Cas9のRuvC様ヌクレアーゼ（RNase H折り畳み）ドメイン及びHNH（McrA様）ヌクレアーゼドメインは各々、標的核酸の鎖の一方を切断する。II型の系のCas9切断活性はまた、tracrRNAへのcrRNAのハイブリダイゼーションを必要とし、Cas9によるcrRNA及び標的結合を容易にする二本鎖を形成する。V型の系では、crRNA及び標的結合は、標的核酸切断と同様にCpf1を伴う。V型の系では、Cpf1のRuvC様ヌクレアーゼドメインは、標的核酸の両方の鎖をずらした構成で切断し、Cas9切断によって生成される平滑末端とは対照的に、5'オーバーハングを生成する。これらの5'オーバーハングは、非相同末端結合（NHEJ）方法によるDNAの挿入を容易にし得る。

10

【0101】

【0145】V型の系のCpf1切断活性はまた、二本鎖を形成するためのcrRNAのtracrRNAへのハイブリダイゼーションを必要とせず、むしろ、V型の系のcrRNAは、内部二本鎖を形成するステムループ構造を有する単一のcrRNAを使用する。Cpf1は、ステムループ及びステムループに隣接する配列、最も顕著には、標的核酸にハイブリダイズするスペーサー配列の5'のヌクレオチドを認識する配列及び構造特異的な方法でcrRNAに結合する。このステムループ構造は、典型的には、長さが15～19ヌクレオチドの範囲である。このステムループ二本鎖を破壊する置換は、切断活性を無効化するが、ステムループ二本鎖を破壊しない他の置換は、切断活性を無効化しない。V型の系では、crRNAは、5'末端にステムループ構造を形成し、3'末端にある配列は、標的核酸中の配列に相補的である。

20

【0102】

【0146】V型のcrRNA並びに標的結合及び切断に関連する他のタンパク質としては、クラス2候補1（C2c1）及びクラス2候補3（C2c3）が挙げられる。C2c1及びC2c3タンパク質は、Cas9及びCpf1と長さが類似しており、およそ1,100個のアミノ酸～およそ1,500個のアミノ酸の範囲である。C2c1及びC2c3タンパク質はまた、RuvC様ヌクレアーゼドメインを含有し、Cpf1と同様のアーキテクチャを有する。C2c1タンパク質は、標的結合及び切断のためにcrRNA及びtracrRNAを必要とする点でCas9タンパク質に類似するが、50℃の最適な切断温度を有する。C2c1タンパク質は、Cpf1と同様に、標的配列の5'であるATリッチPAMを標的とする（Shmakov et al., Molecular Cell 60（3）：385－397（2015））。クラス2の候補2（C2c2）は、他のCRISPRエフェクタータンパク質と配列類似性を共有しないため、推定されるVI型の系に含まれ得る。C2c2タンパク質は、2つのHEPNドメインを有し、RNase活性を有すると予測され、したがって、mRNAを標的とし、切断し得る。C2c2タンパク質は、tracrRNAを必要としないが、標的結合及び切断のためにcrRNAを必要とする点でCpf1タンパク質と同様に見える。また、Cpf1と同様に、C2c2タンパク質の場合のcrRNAは、安定なヘアピン、又はステムループ構造を形成し、これらはC2c2タンパク質との会合を補助し得る。

30

40

【0103】

【0147】本明細書に提供される遺伝子編集系は、リボ核酸タンパク質複合体を含むクラス1又はクラス2の系の構成要素を含み得る。タンパク質のクラス2のCasヌクレアーゼファミリーは、DNAエンドヌクレアーゼ活性を有する酵素であり、それらは、本明細書に更に記載されるように、適切なガイドRNAを設計することによって所望の核酸標的を切断するように指示することができる。クラス2のCRISPR/Cas系の構成要素

50

は、I I 型、I I A 型、I I B 型、I I C 型、V 型、又は V I 型の系に由来し得る。クラス 2 の Cas ヌクレアーゼとしては、例えば、Cas 9 (Csn1 又は Csx12 としても知られる)、Csn2、Cas 4、Cas 12a (Cpf1)、Cas 12b (C2c1)、Cas 12c (C2c3)、Cas 13a (C2c2)、Cas 13b、Cas 13c、及び Cas 13d タンパク質が挙げられる。いくつかの実施形態では、Cas タンパク質は、I I 型の CRISPR/Cas 系に由来するもの、すなわち、CRISPR/Cas 9 系由来の Cas 9 タンパク質、又は V 型の CRISPR/Cas 系に由来するもの、例えば、Cas 12 タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas タンパク質は、クラス 2 の CRISPR/Cas 系、すなわち、Cas 9 タンパク質又は Cas 12a タンパク質などの単一タンパク質 Cas ヌクレアーゼに由来する。Cas タンパク質の他の非限定的な例としては、Cas 1、Cas 1B、Cas 2、Cas 3、Cas 4、Cas 5、Cas 6、Cas 7、Cas 8、Cas 10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、CsO、Csf4、Cpf1、Cas 9 HiFi、それらのホモログ、又はそれらの改変態様が挙げられ得る。

10

【0104】

塩基編集／塩基編集系

【0148】クラス 2 の CRISPR/Cas 系、特に、CRISPR/Cas 9 系は、精密ゲノム編集に使用されてきた。DNA 中の配列 NGG (N は任意の標準的な塩基である) を含む特定のプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) に隣接する標的ゲノム中の DNA の配列 (プロトスペーサーとして知られる) の配列と相同な配列を有するガイド RNA (gRNA) を使用することにより、Cas 9 を使用して、標的化配列で二本鎖切断 (DSB) を作成することができる。DSB における NHEJ を使用して、遺伝子座においてインデルを作製し、遺伝子をノックアウトすることができる。同様に、導入されたテンプレート DNA とともに、遺伝子を挿入するか、又は標的化配列を改変するために、相同性指向性修復 (HDR) を使用することができる。

20

【0105】

【0149】いくつかの態様では、核酸塩基改変が可能な塩基エディター系が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、塩基エディター系は、(i) ガイドポリヌクレオチド、又はそれをコードする核酸と、(ii) プログラマブル DNA 結合ドメイン (例えば、Cas 9 若しくは dCas 9) 及びデアミナーゼを含む塩基エディター融合タンパク質、又はそれをコードする核酸と、を含む。いくつかの実施形態では、塩基エディター系は、ガイドポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、塩基エディター系は、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、塩基エディター系は、プログラマブル DNA 結合ドメイン及びデアミナーゼを含む塩基エディター融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、塩基エディター系は、プログラマブル DNA 結合ドメイン及びデアミナーゼを含む塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸を含む。

30

【0106】

【0150】いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、対象に投与されたときに、塩基エディター系に、インビボで PCSK9 又は ANGPTL3 遺伝子の核酸塩基変化をもたらすように指示する。

40

【0107】

【0151】いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における全肝臓細胞の少なくとも 35% において生じる。

【0108】

【0152】いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における全肝臓細胞の少なくとも 1%、2%、3%、4%

50

、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%、又は99.9%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における全肝臓細胞の最大で1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%、又は99.9%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における全肝臓細胞の1%～99.9%、2%～99.9%、3%～99.9%、4%～99.9%、5%～99.9%、6%～99.9%、7%～99.9%、8%～99.9%、9%～99.9%、10%～99.9%、15%～99.9%、20%～99.9%、25%～99.9%、30%～99.9%、35%～99.9%、40%～99.9%、45%～99.9%、50%～99.9%、55%～99.9%、60%～99.9%、65%～99.9%、70%～99.9%、75%～99.9%、80%～99.9%、85%～99.9%、90%～99.9%、又は95%～99.9%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における全肝臓細胞の1%～99.5%、1%～99%、1%～98%、1%～97%、1%～96%、1%～95%、1%～90%、1%～85%、1%～80%、1%～75%、1%～70%、1%～65%、1%～60%、1%～55%、1%～50%、1%～45%、1%～40%、1%～35%、1%～30%、1%～25%、1%～20%、1%～15%、1%～10%、1%～9%、1%～8%、1%～7%、1%～6%、1%～5%、1%～4%、1%～3%、又は1%～2%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における全肝臓細胞の1%～90%、5%～85%、10%～80%、15%～75%、20%～70%、25%～65%、30%～60%、35%～55%、又は40%～50%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における全肝臓細胞の100%において生じる。

10

20

30

【0109】

【0153】いくつかの実施形態では、塩基変化は、対象の肝細胞において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における肝細胞の少なくとも30%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、対象の肝細胞において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における肝細胞の少なくとも%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における肝細胞の少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%、又は99.9%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における肝細胞の最大で1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%、又は99.9%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における肝細胞の1%～99.9%、2%～99.9%、3%～99.9%、4%～99.9%、5%～99.9%、6%～99.9%、7%～99.9%、8%～99.9%、9%～99.9%

40

50

、10%～99.9%、15%～99.9%、20%～99.9%、25%～99.9%、30%～99.9%、35%～99.9%、40%～99.9%、45%～99.9%、50%～99.9%、55%～99.9%、60%～99.9%、65%～99.9%、70%～99.9%、75%～99.9%、80%～99.9%、85%～99.9%、90%～99.9%、又は95%～99.9%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における肝細胞の1%～99.5%、1%～99%、1%～98%、1%～97%、1%～96%、1%～95%、1%～90%、1%～85%、1%～80%、1%～75%、1%～70%、1%～65%、1%～60%、1%～55%、1%～50%、1%～45%、1%～40%、1%～35%、1%～30%、1%～25%、1%～20%、1%～15%、1%～10%、1%～9%、1%～8%、1%～7%、1%～6%、1%～5%、1%～4%、1%～3%、又は1%～2%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における肝細胞の1%～90%、5%～85%、10%～80%、15%～75%、20%～70%、25%～65%、30%～60%、35%～55%、又は40%～50%において生じる。いくつかの実施形態では、塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における肝細胞の100%において生じる。

10

【0110】

【0154】いくつかの実施形態では、塩基変化は、対象が次世代配列決定によって測定される全肝臓細胞において生じる。いくつかの実施形態では、対象の全肝臓細胞において生じた塩基変化は、サンガー配列決定によって測定される。いくつかの実施形態では、対象の肝細胞において生じた塩基変化は、次世代配列決定によって測定される。いくつかの実施形態では、対象の肝細胞において生じた塩基変化は、サンガー配列決定によって測定される。

20

【0111】

【0155】いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液PCSK9タンパク質レベルの少なくとも35%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液ANGPTL3タンパク質レベルの少なくとも35%の減少をもたらす。

30

【0112】

【0156】いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液PCSK9タンパク質レベルの少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液PCSK9タンパク質レベルの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%、又は99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液PCSK9タンパク質レベルの最大で1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%

40

50

、75%、76%、77%、78%、79%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%、又は99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液PCSK9タンパク質レベルの1%~99.9%、2%~99.9%、3%~99.9%、4%~99.9%、5%~99.9%、6%~99.9%、7%~99.9%、8%~99.9%、9%~99.9%、10%~99.9%、15%~99.9%、20%~99.9%、25%~99.9%、30%~99.9%、31%~99.9%、32%~99.9%、33%~99.9%、34%~99.9%、35%~99.9%、36%~99.9%、37%~99.9%、38%~99.9%、39%~99.9%、40%~99.9%、45%~99.9%、50%~99.9%、55%~99.9%、60%~99.9%、65%~99.9%、70%~99.9%、75%~99.9%、80%~99.9%、85%~99.9%、90%~99.9%、又は95~99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液PCSK9タンパク質レベルの1%~99.5%、1%~99%、1%~98%、1%~97%、1%~96%、1%~95%、1%~90%、1%~85%、1%~80%、1%~79%、1%~78%、1%~77%、1%~76%、1%~75%、1%~74%、1%~73%、1%~72%、1%~71%、1%~70%、1%~65%、1%~60%、1%~55%、1%~50%、1%~45%、1%~40%、1%~39%、1%~38%、1%~37%、1%~36%、1%~35%、1%~34%、1%~33%、1%~32%、1%~31%、1%~30%、1%~25%、1%~20%、1%~15%、1%~10%、1%~9%、1%~8%、1%~7%、1%~6%、1%~5%、1%~4%、1%~3%、又は1%~2%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液PCSK9タンパク質レベルの1%~99.9%、5%~99.5%、10%~99%、15%~97%、20%~95%、25%~90%、30%~85%、31%~80%、32%~79%、33%~78%、34%~77%、35%~76%、36%~76%、37%~75%、38%~74%、39%~73%、40%~72%、45%~71%、50%~70%、又は55%~65%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液PCSK9タンパク質レベルの100%の減少をもたらす。

10

20

30

40

50

【0113】

【0157】いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液PCSK9タンパク質レベルの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、75%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%、290%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%の低下をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液PCSK9タンパク質レベルの少なくとも1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、又は10倍より大きな低下をもたらす。

【0114】

[0158]いくつかの実施形態では、投与前と比較して、対象における血液PCSK9タンパク質レベル又は血液PCSK9タンパク質レベルの減少は、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）によって測定される。いくつかの実施形態では、投与前と比較して、対象における血液PCSK9タンパク質レベル又は血液PCSK9タンパク質レベルの減少は、ウェスタンブロット分析によって測定される。いくつかの実施形態では、投与前と比較して、対象における血液PCSK9タンパク質レベル又は血液PCSK9タンパク質レベルの減少は、LC-MS/MS（液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法）によって測定される。

[0115]

[0159]いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液ANGPTL3タンパク質レベルの少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液ANGPTL3タンパク質レベルの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%、又は99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液ANGPTL3タンパク質レベルの最大で1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%、又は99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液ANGPTL3タンパク質レベルの1%~99.9%、2%~99.9%、3%~99.9%、4%~99.9%、5%~99.9%、6%~99.9%、7%~99.9%、8%~99.9%、9%~99.9%、10%~99.9%、15%~99.9%、20%~99.9%、25%~99.9%、30%~99.9%、31%~99.9%、32%~99.9%、33%~99.9%、34%~99.9%、35%~99.9%、36%~99.9%、37%~99.9%、38%~99.9%、39%~99.9%、40%~99.9%、45%~99.9%、50%~99.9%、55%~99.9%、60%~99.9%、65%~99.9%、70%~99.9%、75%~99.9%、80%~99.9%、85%~99.9%、90%~99.9%、又は95~99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液ANGPTL3タンパク質レベルの1%~99.5%、1%~99%、1%~98%、1%~97%、1%~96%、1%~95%、1%~90%、1%~85%、1%~80%、1%~79%、1%~78%、1%~77%、1%~76%、1%~75%、1%~74%、1%~73%、1%~72%、1%~71%、1%~70%、1%~65%、1%~60%、1%~55%、1%~50%、1%~45%、1%~40%、1%~39%、1%~38%、1%~37%、1%~36%、1%~35%、1%~34%、1%~33%、1%~32%、1%~31%、1%~30%、1%~25%、1%~20%、1%~15%、1%~10%、1%

10

20

30

40

50

～9%、1%～8%、1%～7%、1%～6%、1%～5%、1%～4%、1%～3%、又は1%～2%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液ANGPTL3タンパク質レベルの1%～99.9%、5%～99.5%、10%～99%、15%～97%、20%～95%、25%～90%、30%～85%、31%～80%、32%～79%、33%～78%、34%～77%、35%～76%、36%～76%、37%～75%、38%～74%、39%～73%、40%～72%、45%～71%、50%～70%、又は55%～65%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液ANGPTL3タンパク質レベルの100%の減少をもたらす。

10

【0116】

【0160】いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液ANGPTL3タンパク質レベルの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、75%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%、290%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%の低下をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ELISA、ウェスタンブロット、又はLC-MS/MSによって測定される場合、投与前と比較して、対象において血液ANGPTL3タンパク質レベルの少なくとも1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、又は10倍より大きな低下をもたらす。

20

【0117】

【0161】いくつかの実施形態では、投与前と比較して、対象における血液ANGPTL3タンパク質レベル又は血液ANGPTL3タンパク質レベルの減少は、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）によって測定される。いくつかの実施形態では、投与前と比較して、対象における血液ANGPTL3タンパク質レベル又は血液ANGPTL3タンパク質レベルの減少は、ウェスタンブロット分析によって測定される。いくつかの実施形態では、投与前と比較して、対象における血液ANGPTL3タンパク質レベル又は血液ANGPTL3タンパク質レベルの減少は、LC-MS/MS（液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法）によって測定される。

30

【0118】

【0162】いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液又は低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベルの少なくとも35%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベルの少なくとも35%、40%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベルの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、

40

50

99.8%、又は99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベルの最大で1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%、又は99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベルの1%～99.9%、2%～99.9%、3%～99.9%、4%～99.9%、5%～99.9%、6%～99.9%、7%～99.9%、8%～99.9%、9%～99.9%、10%～99.9%、15%
 ～99.9%、20%～99.9%、25%～99.9%、30%～99.9%、35%
 ～99.9%、40%～99.9%、45%～99.9%、50%～99.9%、55%
 ～99.9%、60%～99.9%、65%～99.9%、70%～99.9%、75%
 ～99.9%、80%～99.9%、85%～99.9%、90%～99.9%、又は95%～99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベルの1%～99.5%、1%～99%、1%～98%、1%～97%、1%～96%、1%
 ～95%、1%～90%、1%～85%、1%～80%、1%～75%、1%～70%、
 1%～65%、1%～60%、1%～55%、1%～50%、1%～45%、1%～40%
 %、1%～35%、1%～30%、1%～25%、1%～20%、1%～15%、1%～
 10%、1%～9%、1%～8%、1%～7%、1%～6%、1%～5%、1%～4%、
 1%～3%、又は1%～2%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベルの1%～99.9%、5%～99.5%、10%～99%、15%～97%
 、20%～95%、25%～90%、30%～85%、35%～80%、40%～75%
 、45%～70%、50%～65%、又は55%～60%の減少をもたらす。いくつかの
 実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベルの100%の減少をもたらす。いくつかの実施
 形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液低密度リポタンパク質
 コレステロール（LDL-C）レベルの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%
 、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%
 %、30%、35%、40%、50%、75%、90%、100%、110%、120%
 、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%
 、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%
 、290%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%
 、1000%の低下をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比
 較して、対象における血液低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベルの
 少なくとも1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、
 1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、
 7倍、8倍、9倍、10倍、又は10倍より大きな低下をもたらす。

10

20

30

40

【0119】

【0163】いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液トリグリセルドレベルの少なくとも35%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液トリグリセルドレベルの少なくとも30%、35%、40%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、又は99%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液トリグリセルドレベルの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%

50

、30%、35%、40%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%、又は99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液トリグリセリドレベルの最大で1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.3%、99.5%、99.7%、99.8%、又は99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液トリグリセリドレベルの1%～99.9%、2%～99.9%、3%～99.9%、4%～99.9%、5%～99.9%、6%～99.9%、7%～99.9%、8%～99.9%、9%～99.9%、10%～99.9%、15%～99.9%、20%～99.9%、25%～99.9%、30%～99.9%、35%～99.9%、40%～99.9%、45%～99.9%、50%～99.9%、55%～99.9%、60%～99.9%、65%～99.9%、70%～99.9%、75%～99.9%、80%～99.9%、85%～99.9%、90%～99.9%、又は95%～99.9%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液トリグリセリドレベルの1%～99.5%、1%～99%、1%～98%、1%～97%、1%～96%、1%～95%、1%～90%、1%～85%、1%～80%、1%～75%、1%～70%、1%～65%、1%～60%、1%～55%、1%～50%、1%～45%、1%～40%、1%～35%、1%～30%、1%～25%、1%～20%、1%～15%、1%～10%、1%～9%、1%～8%、1%～7%、1%～6%、1%～5%、1%～4%、1%～3%、又は1%～2%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液トリグリセリドレベルの1%～99.9%、5%～99.5%、10%～99%、15%～97%、20%～95%、25%～90%、30%～85%、35%～80%、40%～75%、45%～70%、50%～65%、又は55%～60%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液トリグリセリドレベルの100%の減少をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液トリグリセリドレベルの少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、75%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%、290%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%の低下をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、投与前と比較して、対象における血液トリグリセリドレベルの少なくとも1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、又は10倍より大きな低下をもたらす。

10

20

30

40

50

【0120】

[0164]いくつかの実施形態では、投与前と比較した、対象における血液トリグリセリドレベル又は血液トリグリセリドレベルの減少は、任意の標準的な技術によって測定される。いくつかの実施形態では、投与前と比較した、対象における血液低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベル又は血液低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）レベルの減少は、任意の標準的な技術によって測定される。例えば、臨床分析装置を使用して、コレステロール（総C）、トリグリセリド（TG）及び高密度リポタンパク質コレステロール（HDL-C）を酵素的に直接測定することを伴う血清試料中の「脂質パネル」を測定してもよい。各分析物に固有の試薬キットには、緩衝液、校正剤、

ブランク、及び対照が含まれる。本開示で使用される場合、コレステロール、トリグリセリド及びHDL-Cは、特定の酵素反応生成物の吸光度測定値を使用して定量化されてもよい。LDL-Cは、間接的に決定されてもよい。いくつかの事例では、循環コレステロールの大部分は、3つの主要なリポタンパク質画分、すなわち、非常に低密度のリポタンパク質(VLDL)、LDL、及びHDLにおいて見出すことができる。いくつかの実施形態では、総循環コレステロールは、式[総C] = [VLDL-C] + [LDL-C] + [HDL-C]で推定され得る。したがって、LDL-Cは、以下の関係[LDL-C] = [総C] - [HDL-C] - [TG] / 5 (ここで、[TG] / 5は、VLDL-Cコレステロールの推定値である)に従って、総コレステロール、トリグリセリド及びHDL-Cの測定値から計算することができる。緩衝液、校正剤、ブランク及び対照を含有するトリグリセリドに特異的な試薬キットを使用してもよい。本明細書で使用される場合、試験からの血清試料を分析してもよく、一連の組み合わされた酵素反応を用いて、トリグリセリドを測定してもよい。いくつかの実施形態では、H₂O₂を使用して、分析物を最後の分析物の最終生成物として定量化してもよく、500nmでのその吸光度、及び色強度は、トリグリセリド濃度に比例している。

10

20

30

40

50

【0121】

[0165]いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、ガイドRNAであり、ガイドRNAは、0、1、又は2個のミスマッチを有するPCSK9遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、ミスマッチを有しないPCSK9遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、1個のミスマッチを有するPCSK9遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、2個のミスマッチを有するPCSK9遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、3個のミスマッチを有するPCSK9遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、4個のミスマッチを有するPCSK9遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、5個のミスマッチを有するPCSK9遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。

【0122】

[0166]いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、ガイドRNAであり、ガイドRNAは、0、1、又は2個のミスマッチを有するANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、ミスマッチを有しないANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、1個のミスマッチを有するANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、2個のミスマッチを有するANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、3個のミスマッチを有するANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、4個のミスマッチを有するANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、5個のミスマッチを有するANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー配列の相補鎖に結合するスペーサー配列を含む。

【0123】

[0167]いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、正味の核酸塩基編集によって測定される場合に、対象の全肝臓細胞の1%未満においてプロトスペーサー配列の外側にある。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、正味の核酸塩基編集によって測定される場合に、対象の肝細胞の1%未満においてプロトスペーサー配列の外側にある。いくつかの

実施形態では、核酸塩基変化は、正味の核酸塩基編集によって測定される場合に、プロトSpacer配列の内側にのみある。

【0124】

【0168】いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、正味の核酸塩基編集によって測定される場合に、対象の全肝臓細胞の0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0%、9.0%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%未満においてプロトSpacer配列の外側にある。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、正味の核酸塩基編集によって測定される場合に、対象の肝細胞の0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0%、9.0%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%未満においてプロトSpacer配列の外側にある。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、正味の核酸塩基編集によって測定される場合に、対象の細胞の0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0%、8.0%、9.0%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%未満においてプロトSpacer配列の外側にある。

10

20

【0125】

【0169】いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、アデニンデアミナーゼである。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、A・TからG・Cへの変化である。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、アデニンデアミナーゼであり、核酸塩基変化は、A・TからG・Cへの変化である。いくつかの実施形態では、プログラマブルDNA結合ドメインは、ヌクレアーゼ不活性Cas9又はCas9ニックアーゼを含む。いくつかの実施形態では、プログラマブルDNA結合ドメインは、Cas9を含む。

30

【0126】

【0170】いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、PCSK9遺伝子のスプライス部位にある。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、PCSK9遺伝子のスプライスドナー部位にある。いくつかの実施形態では、スプライスドナー部位は、配列番号5に参照されるように、PCSK9イントロン1の5'末端にある。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、PCSK9遺伝子のスプライスアクセプター部位にある。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、PCSK9遺伝子によってコードされる転写産物におけるフレームシフト、未成熟終止コドン、挿入又は欠失をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、PCSK9遺伝子によってコードされる異常な転写産物をもたらす。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、ガイドRNAである。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、化学的に改変されている。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、tracrRNA配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、化学的な改変を含む。化学的な改変を含む例示的なガイドRNAは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT出願公開第WO2021/207712号に見出すことができる。

40

【0127】

【0171】いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ANGPTL3遺伝子のスプライス部位にある。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ANGPTL3遺伝子のスプ

50

ライスドナー部位にある。いくつかの実施形態では、スプライスドナー部位は、配列番号 1 に参照されるように、ANGPTL3 イントロン 6 の 5' 末端にある。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ANGPTL3 遺伝子のスプライスアクセプター部位にある。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ANGPTL3 遺伝子によってコードされる転写産物におけるフレームシフト、未成熟終止コドン、挿入又は欠失をもたらす。いくつかの実施形態では、核酸塩基変化は、ANGPTL3 遺伝子によってコードされる異常な転写産物をもたらす。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、ガイド RNA である。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、化学的に改変されている。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、tracrRNA 配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、化学的な改変を含む。化学的な改変を含む例示的なガイド RNA は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる PCT 出願公開第 WO 2021/207712 号に見出すことができる。

10

【0128】

【0172】いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、ガイド RNA 配列を含む。例示的な追加のガイド RNA 配列は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる PCT 出願公開第 WO 2021/207712 号に見出すことができる。

【0129】

【0173】いくつかの実施形態では、プロトスペーサー配列は、プロトスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、プロトスペーサー配列は、配列 5' - C C C G C A C C T T G G C G C A G C G G - 3' (配列番号 731)、A A G A T A C C T G A A T A A C T C T C - 3' (配列番号 732)、及び 5' - A A G A T A C C T G A A T A A C C C T C - 3' (配列番号 733) を含む。

20

【0130】

【0174】いくつかの実施形態では、塩基エディター融合タンパク質は、配列番号 734 の配列を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、配列番号 734 に示されるアミノ酸配列に対して、又は本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかに対して少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、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%、又は少なくとも 99.5% 同一であるアミノ酸配列を含む。本明細書に提供されるアデノシンデアミナーゼが、1 つ以上の変異 (例えば、本明細書に提供される変異のいずれか) を含み得ることを理解されたい。本開示は、ある特定の同一性パーセント、加えて、本明細書に記載の変異のいずれか又はそれらの組み合わせを有する、任意のデアミナーゼドメインを提供する。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、配列番号 734 に示されるアミノ酸配列、又は本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかと比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 個、又はそれより多くの変異を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、配列番号 734 に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つ、又は本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかと比較して、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 35、少なくとも 40、少なくとも 45、少なくとも 50、少なくとも 60、少なくとも 70、少なくとも 80、少なくとも 90、少なくとも 100、少なくとも 110、少なくとも 120、少なくとも 130、少なくとも 140、少なくとも 150、少なくとも 160、又は少なくとも 170 個の同一の連続アミノ酸残基を有するアミノ酸配列を含む。

30

40

【0131】

【0175】いくつかの実施形態では、塩基エディタータンパク質をコードする核酸は、mRNA である。mRNA は、改変、例えば、mRNA の 3' 又は 5' 末端に改変を含み得る

50

。いくつかの実施形態では、mRNAは、capアナログを含む。

【0132】

【0176】いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも1、2、又は3個のヌクレオチドを5'末端を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも1、2、又は3個のヌクレオチドを5'末端を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも1個のヌクレオチドを5'末端を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも2個のヌクレオチドを5'末端を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも3個のヌクレオチドを5'末端を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも4個のヌクレオチドを5'末端を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも5個のヌクレオチドを5'末端を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも6個のヌクレオチドを5'末端を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも7個のヌクレオチドを5'末端を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも8個のヌクレオチドを5'末端を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも9個のヌクレオチドを5'末端を含む。いくつかの実施形態では、mRNAは、2'-ヒドロキシル基、2'-O-メチル基、若しくは追加の2'化学修飾、又はそれらの組み合わせを含む少なくとも10個のヌクレオチドを5'末端を含む。

【0133】

【0177】いくつかの実施形態では、mRNAは、ポリAテールを含む。ポリAテールは、mRNAの3'末端にあってもよい。

【0134】

【0178】いくつかの実施形態では、mRNA配列のGC%含有量は、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%若しくは90%より大きい、又はそれらに等しい。いくつかの実施形態では、mRNA配列のGC%含有量は、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%若しくは80%より大きい、又はそれらに等しい。

【0135】

【0179】いくつかの実施形態では、mRNA配列は、アデニンとTNAデアミナーゼ(TadA)領域を含む。いくつかの実施形態では、TadA領域のGC%は、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%若しくは90

%より大きいか、又はそれらに等しい。いくつかの実施形態では、T a d A領域のG C%含有量は、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%若しくは80%より大きいか、又はそれらに等しい。

【0136】

【0180】いくつかの実施形態では、mRNA配列は、C a s 9領域を含む。いくつかの実施形態では、C a s 9領域のG C%は、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%若しくは90%より大きいか、又はそれらに等しい。いくつかの実施形態では、C a s 9領域のG C%含有量は、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%若しくは80%より大きいか、又はそれらに等しい。

10

【0137】

【0181】いくつかの実施形態では、mRNA配列は、N L S領域を含む。いくつかの実施形態では、N L S領域のG C%は、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%若しくは90%より大きいか、又はそれらに等しい。いくつかの実施形態では、N L S領域のG C%含有量は、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%若しくは80%より大きいか、又はそれらに等しい。

20

【0138】

【0182】いくつかの実施形態では、mRNA配列は、T a d A領域及びC a s 9領域を接続する第1のリンカー領域を含む。いくつかの実施形態では、第1のリンカー領域のG C%は、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%若しくは90%より大きいか、又はそれらに等しい。いくつかの実施形態では、第1のリンカー領域のG C%含有量は、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%若しくは80%より大きいか、又はそれらに等しい。

30

【0139】

【0183】いくつかの実施形態では、mRNA配列は、C a s 9領域及びN L S領域を接続する第2のリンカー領域を含む。いくつかの実施形態では、第2のリンカー領域のG C%は、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%若しくは90%より大きいか、又はそれらに等しい。いくつかの実施形態では、第2のリンカー領域のG C%含有量は、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%若しくは80%より大きいか、又はそれらに等しい。

40

【0140】

【0184】いくつかの実施形態では、本明細書で提供される塩基エディター系は、ガイドポリヌクレオチド又はガイドポリヌクレオチドをコードする核酸を取り囲む脂質ナノ粒子

50

(LNP) (i) を更に含む。いくつかの実施形態では、LNPは、プログラマブルDNA結合ドメイン及びデアミナーゼ、又はそれらをコードする核酸を含む塩基エディター融合タンパク質 (ii) を更に取り囲む。いくつかの実施形態では、塩基エディター系は、プログラマブルDNA結合ドメイン及びデアミナーゼ、又はそれらをコードする核酸を含む塩基エディター融合タンパク質 (ii) を取り囲む第2のLNPを更に含む。

【0141】

[0185] 本明細書に提供される塩基エディター系は、1つ以上のLNPを含み得る。例えば、塩基エディター系は、ガイドポリヌクレオチドと、塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸、例えば、塩基エディター融合タンパク質をコードするmRNAとを両方とも取り囲むLNPを含み得る。別の例では、塩基エディター系は、ガイドポリヌクレオチド (例えば、ガイドRNA) を取り囲むLNPと、塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸 (例えば、mRNA) を取り囲むLNPと、を含み得る。ガイドポリヌクレオチドと、塩基エディター融合タンパク質又は塩基エディター融合タンパク質をコードするmRNAとを別個に取り囲むLNPは、塩基エディター系の柔軟な投薬及び投与を可能にし得る。例えば、ガイドRNAを取り囲むLNPを最初に投与し、続いて塩基エディター融合タンパク質をコードするmRNAを取り囲むLNPを投与し得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNAを取り囲むLNPと、塩基エディター融合タンパク質をコードするmRNAを取り囲む第2のLNPとを同時に対象に投与する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAを取り囲むLNPと、塩基エディター融合タンパク質をコードするmRNAを取り囲むLNPとを対象に順次投与する。いくつかの実施形態では、塩基エディター融合タンパク質をコードするmRNAを取り囲むLNPを対象に投与し、続いて、1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、7日後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後、7週間後、8週間後、9週間後、10週間後、11週間後、若しくは12週間後、又はそれより後に、ガイドRNAを取り囲む第2のLNPの複数回の投与又は投薬を行う。第2のLNPの複数回の投薬は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20日間、又はそれより長い間隔で投与されてもよい。

【0142】

[0186] いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で約1:10~約101である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で約1:1、1.5:1、2:1、3:1、4:1、1:1.5、1:2、1:3、1:4、又は4:1若しくは1:4の間の任意の比である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の滴定によって決定することができる。

【0143】

[0187] いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、約500:1~約1:500である。

【0144】

[0188] いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で約1000:1~約1:1000である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で約1000:1、950:1、900:1、850:1、800:1、750:1、700:1、650:1、600:1、550:1、500:1、450:1、400:1、350:1、300:1、250:1、200:1、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、19:1、18:1、17:1、17:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2;

1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1.0:1、0.9:1、0.8:1、0.7:1、0.6:1、0.5:1、0.4:1、0.3:1、0.2:1、又は0.1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で約1:0.1、1:0.2、1:0.3、1:0.4、1:0.5、1:0.6、1:0.7、1:0.8、1:0.9、1:1.0、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100、1:150、1:200、1:250、1:300、1:350、1:400、1:450、1:500、1:550、1:600、1:650、1:700、1:750、1:800、1:850、1:900、1:950、又は1:1000である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で少なくとも約1000:1、950:1、900:1、850:1、800:1、750:1、700:1、650:1、600:1、550:1、500:1、450:1、400:1、350:1、300:1、250:1、200:1、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、19:1、18:1、17:1、17:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2;1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1.0:1、0.9:1、0.8:1、0.7:1、0.6:1、0.5:1、0.4:1、0.3:1、0.2:1、又は0.1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で少なくとも約1:0.1、1:0.2、1:0.3、1:0.4、1:0.5、1:0.6、1:0.7、1:0.8、1:0.9、1:1.0、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100、1:150、1:200、1:250、1:300、1:350、1:400、1:450、1:500、1:550、1:600、1:650、1:700、1:750、1:800、1:850、1:900、1:950、又は1:1000である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で最大で約1000:1、950:1、900:1、850:1、800:1、750:1、700:1、650:1、600:1、550:1、500:1、450:1、400:1、350:1、300:1、250:1、200:1、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、19:1、18:1、17:1、17:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2;1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1.0:1、0.9:1、0.8:1、0.7:1、0.6:1、0.5:1、0.4:1、0.3:1、0.2:1、又は0.1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で最大で約1:0.1、1:0.2、1:0.3、1:0.4、1:0

10

20

30

40

50

. 5、1 : 0 . 6、1 : 0 . 7、1 : 0 . 8、1 : 0 . 9、1 : 1 . 0、1 : 1 . 1、1 : 1 . 2、1 : 1 . 3、1 : 1 . 4、1 : 1 . 5、1 : 1 . 6、1 : 1 . 7、1 : 1 . 8、1 : 1 . 9、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6、1 : 7、1 : 8、1 : 9、1 : 10、1 : 11、1 : 12、1 : 13、1 : 14、1 : 15、1 : 16、1 : 17、1 : 18、1 : 19、1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40、1 : 45、1 : 50、1 : 55、1 : 60、1 : 65、1 : 70、1 : 75、1 : 80、1 : 85、1 : 90、1 : 95、1 : 100、1 : 150、1 : 200、1 : 250、1 : 300、1 : 350、1 : 400、1 : 450、1 : 500、1 : 550、1 : 600、1 : 650、1 : 700、1 : 750、1 : 800、1 : 850、1 : 900、1 : 950、又は1 : 1000である。

10

【0145】

[0189]いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、約10000 : 1～約1 : 10000である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、約10000 : 1、9500 : 1、9000 : 1、8500 : 1、8000 : 1、7500 : 1、7000 : 1、6500 : 1、6000 : 1、5500 : 1、5000 : 1、4500 : 1、4000 : 1、3500 : 1、3000 : 1、2500 : 1、2000 : 1、1500 : 1、1000 : 1、950 : 1、900 : 1、850 : 1、800 : 1、750 : 1、700 : 1、650 : 1、600 : 1、550 : 1、500 : 1、450 : 1、400 : 1、350 : 1、300 : 1、250 : 1、200 : 1、190 : 1、180 : 1、170 : 1、160 : 1、150 : 1、140 : 1、130 : 1、120 : 1、110 : 1、100 : 1、95 : 1、90 : 1、85 : 1、80 : 1、75 : 1、70 : 1、69 : 1、68 : 1、67 : 1、66 : 1、65 : 1、64 : 1、63 : 1、62 : 1、61 : 1、60 : 1、59 : 1、58 : 1、57 : 1、56 : 1、55 : 1、54 : 1、53 : 1、52 : 1、51 : 1、50 : 1、49 : 1、48 : 1、47 : 1、46 : 1、45 : 1、44 : 1、43 : 1、42 : 1、41 : 1、40 : 1、39 : 1、38 : 1、37 : 1、36 : 1、35 : 1、34 : 1、33 : 1、32 : 1、31 : 1、30 : 1、29 : 1、28 : 1、27 : 1、26 : 1、25 : 1、24 : 1、23 : 1、22 : 1、21 : 1、20 : 1、19 : 1、18 : 1、17 : 1、16 : 1、15 : 1、14 : 1、13 : 1、12 : 1、11 : 1、10 : 1、9 : 1、8 : 1、7 : 1、6 : 1、5 : 1、4 : 1、3 : 1、2 : 1、1 : 1、0 . 9 : 1、0 . 8 : 1、0 . 7 : 1、0 . 6 : 1、0 . 5 : 1、0 . 4 : 1、0 . 3 : 1、0 . 2 : 1、又は0 . 1 : 1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、少なくとも約1 : 10000、1 : 9500、1 : 9000、1 : 8500、1 : 8000、1 : 7500、1 : 7000、1 : 6500、1 : 6000、1 : 5500、1 : 5000、1 : 4500、1 : 4000、1 : 3500、1 : 3000、1 : 2500、1 : 2000、1 : 1500、1 : 1000、1 : 950、1 : 900、1 : 850、1 : 800、1 : 750、1 : 700、1 : 650、1 : 600、1 : 550、1 : 500、1 : 450、1 : 400、1 : 350、1 : 300、1 : 250、1 : 200、1 : 190、1 : 180、1 : 170、1 : 160、1 : 150、1 : 140、1 : 130、1 : 120、1 : 110、1 : 100、1 : 95、1 : 90、1 : 85、1 : 80、1 : 75、1 : 70、1 : 69、1 : 68、1 : 67、1 : 66、1 : 65、1 : 64、1 : 63、1 : 62、1 : 61、1 : 60、1 : 59、1 : 58、1 : 57、1 : 56、1 : 55、1 : 54、1 : 53、1 : 52、1 : 51、1 : 50、1 : 49、1 : 48、1 : 47、1 : 46、1 : 45、1 : 44、1 : 43、1 : 42、1 : 41、1 : 40、1 : 39、1 : 38、1 : 37、1 : 36、1 : 35、1 : 34、1 : 33、1 : 32、1 : 31、1 : 30、1 : 29、1 : 28、1 : 27、1 : 26、1 : 25、1 : 24、1 : 23、1 : 22、1 : 21、1 : 20、1 : 19、1 : 18、1 : 17、1 : 16、1 : 15、1 : 14、1 : 13、1 : 12、1 : 11、1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、

20

30

40

50

1 : 0 . 9、1 : 0 . 8、1 : 0 . 7、1 : 0 . 6、1 : 0 . 5、1 : 0 . 4、1 : 0 .
 3、1 : 0 . 2、又は1 : 0 . 1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオ
 チドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、少なくとも約100
 00 : 1、9500 : 1、9000 : 1、8500 : 1、8000 : 1、7500 : 1、
 7000 : 1、6500 : 1、6000 : 1、5500 : 1、5000 : 1、4500 :
 1、4000 : 1、3500 : 1、3000 : 1、2500 : 1、2000 : 1、150
 0 : 1、1000 : 1、950 : 1、900 : 1、850 : 1、800 : 1、750 : 1
 、700 : 1、650 : 1、600 : 1、550 : 1、500 : 1、450 : 1、400
 : 1、350 : 1、300 : 1、250 : 1、200 : 1、190 : 1、180 : 1、1
 70 : 1、160 : 1、150 : 1、140 : 1、130 : 1、120 : 1、110 : 1
 、100 : 1、95 : 1、90 : 1、85 : 1、80 : 1、75 : 1、70 : 1、69 :
 1、68 : 1、67 : 1、66 : 1、65 : 1、64 : 1、63 : 1、62 : 1、61 :
 1、60 : 1、59 : 1、58 : 1、57 : 1、56 : 1、55 : 1、54 : 1、53 :
 1、52 : 1、51 : 1、50 : 1、49 : 1、48 : 1、47 : 1、46 : 1、45 :
 1、44 : 1、43 : 1、42 : 1、41 : 1、40 : 1、39 : 1、38 : 1、37 :
 1、36 : 1、35 : 1、34 : 1、33 : 1、32 : 1、31 : 1、30 : 1、29 :
 1、28 : 1、27 : 1、26 : 1、25 : 1、24 : 1、23 : 1、22 : 1、21 :
 1、20 : 1、19 : 1、18 : 1、17 : 1、16 : 1、15 : 1、14 : 1、13 :
 1、12 : 1、11 : 1、10 : 1、9 : 1、8 : 1、7 : 1、6 : 1、5 : 1、4 : 1
 、3 : 1、2 : 1、1 : 1、0 . 9 : 1、0 . 8 : 1、0 . 7 : 1、0 . 6 : 1、0 . 5
 : 1、0 . 4 : 1、0 . 3 : 1、0 . 2 : 1、又は0 . 1 : 1である。いくつかの実施形
 態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモ
 ル比は、少なくとも約1 : 10000、1 : 9500、1 : 9000、1 : 8500、1
 : 8000、1 : 7500、1 : 7000、1 : 6500、1 : 6000、1 : 5500
 、1 : 5000、1 : 4500、1 : 4000、1 : 3500、1 : 3000、1 : 25
 00、1 : 2000、1 : 1500、1 : 1000、1 : 950、1 : 900、1 : 85
 0、1 : 800、1 : 750、1 : 700、1 : 650、1 : 600、1 : 550、1 :
 500、1 : 450、1 : 400、1 : 350、1 : 300、1 : 250、1 : 200、
 1 : 190、1 : 180、1 : 170、1 : 160、1 : 150、1 : 140、1 : 13
 0、1 : 120、1 : 110、1 : 100、1 : 95、1 : 90、1 : 85、1 : 80、
 1 : 75、1 : 70、1 : 69、1 : 68、1 : 67、1 : 66、1 : 65、1 : 64、
 1 : 63、1 : 62、1 : 61、1 : 60、1 : 59、1 : 58、1 : 57、1 : 56、
 1 : 55、1 : 54、1 : 53、1 : 52、1 : 51、1 : 50、1 : 49、1 : 48、
 1 : 47、1 : 46、1 : 45、1 : 44、1 : 43、1 : 42、1 : 41、1 : 40、
 1 : 39、1 : 38、1 : 37、1 : 36、1 : 35、1 : 34、1 : 33、1 : 32、
 1 : 31、1 : 30、1 : 29、1 : 28、1 : 27、1 : 26、1 : 25、1 : 24、
 1 : 23、1 : 22、1 : 21、1 : 20、1 : 19、1 : 18、1 : 17、1 : 16、
 1 : 15、1 : 14、1 : 13、1 : 12、1 : 11、1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 :
 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、1 : 0 . 9、1 : 0 . 8、1 :
 0 . 7、1 : 0 . 6、1 : 0 . 5、1 : 0 . 4、1 : 0 . 3、1 : 0 . 2、又は1 : 0 .
 1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タン
 パク質をコードする核酸のモル比は、最大で約10000 : 1、9500 : 1、9000
 : 1、8500 : 1、8000 : 1、7500 : 1、7000 : 1、6500 : 1、60
 00 : 1、5500 : 1、5000 : 1、4500 : 1、4000 : 1、3500 : 1、
 3000 : 1、2500 : 1、2000 : 1、1500 : 1、1000 : 1、950 : 1
 、900 : 1、850 : 1、800 : 1、750 : 1、700 : 1、650 : 1、600
 : 1、550 : 1、500 : 1、450 : 1、400 : 1、350 : 1、300 : 1、2
 50 : 1、200 : 1、190 : 1、180 : 1、170 : 1、160 : 1、150 : 1
 、140 : 1、130 : 1、120 : 1、110 : 1、100 : 1、95 : 1、90 : 1
 、85 : 1、80 : 1、75 : 1、70 : 1、69 : 1、68 : 1、67 : 1、66 : 1

10

20

30

40

50

、65:1、64:1、63:1、62:1、61:1、60:1、59:1、58:1
 、57:1、56:1、55:1、54:1、53:1、52:1、51:1、50:1
 、49:1、48:1、47:1、46:1、45:1、44:1、43:1、42:1
 、41:1、40:1、39:1、38:1、37:1、36:1、35:1、34:1
 、33:1、32:1、31:1、30:1、29:1、28:1、27:1、26:1
 、25:1、24:1、23:1、22:1、21:1、20:1、19:1、18:1
 、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1
 、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、0.9
 :1、0.8:1、0.7:1、0.6:1、0.5:1、0.4:1、0.3:1、0
 .2:1、又は0.1:1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドと塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、最大で約1:10000、
 1:9500、1:9000、1:8500、1:8000、1:7500、1:7000、1:6500、1:6000、1:5500、1:5000、1:4500、1:4000、1:3500、1:3000、1:2500、1:2000、1:1500、1:1000、1:950、1:900、1:850、1:800、1:750、1:700、1:650、1:600、1:550、1:500、1:450、1:400、1:350、1:300、1:250、1:200、1:190、1:180、1:170、1:160、1:150、1:140、1:130、1:120、1:110、1:100、1:95、1:90、1:85、1:80、1:75、1:70、1:69、1:68、1:67、1:66、1:65、1:64、1:63、1:62、1:61、1:60、1:59、1:58、1:57、1:56、1:55、1:54、1:53、1:52、1:51、1:50、1:49、1:48、1:47、1:46、1:45、1:44、1:43、1:42、1:41、1:40、1:39、1:38、1:37、1:36、1:35、1:34、1:33、1:32、1:31、1:30、1:29、1:28、1:27、1:26、1:25、1:24、1:23、1:22、1:21、1:20、1:19、1:18、1:17、1:16、1:15、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、1:0.9、1:0.8、1:0.7、1:0.6、1:0.5、1:0.4、1:0.3、1:0.2、又は1:0.1である。

10

20

30

【0146】

[0190]いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で約10:1～約1:10である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で約4:1、3:1、2:1、1.5:1、1:1、1:1.5、1:2、1:3、又は1:4である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、約500:1～約1:500である。

【0147】

[0191]いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で約1000:1～約1:1000である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸の比は、重量で約1000:1、950:1、900:1、850:1、800:1、750:1、700:1、650:1、600:1、550:1、500:1、450:1、400:1、350:1、300:1、250:1、200:1、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、19:1、18:1、17:1、17:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1.0:1、0.

40

50

50

. 9、1 : 1 . 0、1 : 1 . 1、1 : 1 . 2、1 : 1 . 3、1 : 1 . 4、1 : 1 . 5、1 : 1 . 6、1 : 1 . 7、1 : 1 . 8、1 : 1 . 9、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6、1 : 7、1 : 8、1 : 9、1 : 10、1 : 11、1 : 12、1 : 13、1 : 14、1 : 15、1 : 16、1 : 17、1 : 18、1 : 19、1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40、1 : 45、1 : 50、1 : 55、1 : 60、1 : 65、1 : 70、1 : 75、1 : 80、1 : 85、1 : 90、1 : 95、1 : 100、1 : 150、1 : 200、1 : 250、1 : 300、1 : 350、1 : 400、1 : 450、1 : 500、1 : 550、1 : 600、1 : 650、1 : 700、1 : 750、1 : 800、1 : 850、1 : 900、1 : 950、又は1 : 1000である。

【0148】

[0192]いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、約10000 : 1 ~ 約1 : 10000である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、約10000 : 1、9500 : 1、9000 : 1、8500 : 1、8000 : 1、7500 : 1、7000 : 1、6500 : 1、6000 : 1、5500 : 1、5000 : 1、4500 : 1、4000 : 1、3500 : 1、3000 : 1、2500 : 1、2000 : 1、1500 : 1、1000 : 1、950 : 1、900 : 1、850 : 1、800 : 1、750 : 1、700 : 1、650 : 1、600 : 1、550 : 1、500 : 1、450 : 1、400 : 1、350 : 1、300 : 1、250 : 1、200 : 1、190 : 1、180 : 1、170 : 1、160 : 1、150 : 1、140 : 1、130 : 1、120 : 1、110 : 1、100 : 1、95 : 1、90 : 1、85 : 1、80 : 1、75 : 1、70 : 1、69 : 1、68 : 1、67 : 1、66 : 1、65 : 1、64 : 1、63 : 1、62 : 1、61 : 1、60 : 1、59 : 1、58 : 1、57 : 1、56 : 1、55 : 1、54 : 1、53 : 1、52 : 1、51 : 1、50 : 1、49 : 1、48 : 1、47 : 1、46 : 1、45 : 1、44 : 1、43 : 1、42 : 1、41 : 1、40 : 1、39 : 1、38 : 1、37 : 1、36 : 1、35 : 1、34 : 1、33 : 1、32 : 1、31 : 1、30 : 1、29 : 1、28 : 1、27 : 1、26 : 1、25 : 1、24 : 1、23 : 1、22 : 1、21 : 1、20 : 1、19 : 1、18 : 1、17 : 1、16 : 1、15 : 1、14 : 1、13 : 1、12 : 1、11 : 1、10 : 1、9 : 1、8 : 1、7 : 1、6 : 1、5 : 1、4 : 1、3 : 1、2 : 1、1 : 1、0 . 9 : 1、0 . 8 : 1、0 . 7 : 1、0 . 6 : 1、0 . 5 : 1、0 . 4 : 1、0 . 3 : 1、0 . 2 : 1、又は0 . 1 : 1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、少なくとも約1 : 10000、1 : 9500、1 : 9000、1 : 8500、1 : 8000、1 : 7500、1 : 7000、1 : 6500、1 : 6000、1 : 5500、1 : 5000、1 : 4500、1 : 4000、1 : 3500、1 : 3000、1 : 2500、1 : 2000、1 : 1500、1 : 1000、1 : 950、1 : 900、1 : 850、1 : 800、1 : 750、1 : 700、1 : 650、1 : 600、1 : 550、1 : 500、1 : 450、1 : 400、1 : 350、1 : 300、1 : 250、1 : 200、1 : 190、1 : 180、1 : 170、1 : 160、1 : 150、1 : 140、1 : 130、1 : 120、1 : 110、1 : 100、1 : 95、1 : 90、1 : 85、1 : 80、1 : 75、1 : 70、1 : 69、1 : 68、1 : 67、1 : 66、1 : 65、1 : 64、1 : 63、1 : 62、1 : 61、1 : 60、1 : 59、1 : 58、1 : 57、1 : 56、1 : 55、1 : 54、1 : 53、1 : 52、1 : 51、1 : 50、1 : 49、1 : 48、1 : 47、1 : 46、1 : 45、1 : 44、1 : 43、1 : 42、1 : 41、1 : 40、1 : 39、1 : 38、1 : 37、1 : 36、1 : 35、1 : 34、1 : 33、1 : 32、1 : 31、1 : 30、1 : 29、1 : 28、1 : 27、1 : 26、1 : 25、1 : 24、1 : 23、1 : 22、1 : 21、1 : 20、1 : 19、1 : 18、1 : 17、1 : 16、1 : 15、1 : 14、1 : 13、1 : 12、1 : 11、1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、1 : 0 . 9、1 : 0 . 8、1 : 0 .

10

20

30

40

50

7、1：0.6、1：0.5、1：0.4、1：0.3、1：0.2、又は1：0.1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、少なくとも約10000：1、9500：1、9000：1、8500：1、8000：1、7500：1、7000：1、6500：1、6000：1、5500：1、5000：1、4500：1、4000：1、3500：1、3000：1、2500：1、2000：1、1500：1、1000：1、950：1、900：1、850：1、800：1、750：1、700：1、650：1、600：1、550：1、500：1、450：1、400：1、350：1、300：1、250：1、200：1、190：1、180：1、170：1、160：1、150：1、140：1、130：1、120：1、110：1、100：1、95：1、90：1、85：1、80：1、75：1、70：1、69：1、68：1、67：1、66：1、65：1、64：1、63：1、62：1、61：1、60：1、59：1、58：1、57：1、56：1、55：1、54：1、53：1、52：1、51：1、50：1、49：1、48：1、47：1、46：1、45：1、44：1、43：1、42：1、41：1、40：1、39：1、38：1、37：1、36：1、35：1、34：1、33：1、32：1、31：1、30：1、29：1、28：1、27：1、26：1、25：1、24：1、23：1、22：1、21：1、20：1、19：1、18：1、17：1、16：1、15：1、14：1、13：1、12：1、11：1、10：1、9：1、8：1、7：1、6：1、5：1、4：1、3：1、2：1、1：1、0.9：1、0.8：1、0.7：1、0.6：1、0.5：1、0.4：1、0.3：1、0.2：1、又は0.1：1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、少なくとも約1：10000、1：9500、1：9000、1：8500、1：8000、1：7500、1：7000、1：6500、1：6000、1：5500、1：5000、1：4500、1：4000、1：3500、1：3000、1：2500、1：2000、1：1500、1：1000、1：950、1：900、1：850、1：800、1：750、1：700、1：650、1：600、1：550、1：500、1：450、1：400、1：350、1：300、1：250、1：200、1：190、1：180、1：170、1：160、1：150、1：140、1：130、1：120、1：110、1：100、1：95、1：90、1：85、1：80、1：75、1：70、1：69、1：68、1：67、1：66、1：65、1：64、1：63、1：62、1：61、1：60、1：59、1：58、1：57、1：56、1：55、1：54、1：53、1：52、1：51、1：50、1：49、1：48、1：47、1：46、1：45、1：44、1：43、1：42、1：41、1：40、1：39、1：38、1：37、1：36、1：35、1：34、1：33、1：32、1：31、1：30、1：29、1：28、1：27、1：26、1：25、1：24、1：23、1：22、1：21、1：20、1：19、1：18、1：17、1：16、1：15、1：14、1：13、1：12、1：11、1：10、1：9、1：8、1：7、1：6、1：5、1：4、1：3、1：2、1：1、1：0.9、1：0.8、1：0.7、1：0.6、1：0.5、1：0.4、1：0.3、1：0.2、又は1：0.1である。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモル比は、最大で約10000：1、9500：1、9000：1、8500：1、8000：1、7500：1、7000：1、6500：1、6000：1、5500：1、5000：1、4500：1、4000：1、3500：1、3000：1、2500：1、2000：1、1500：1、1000：1、950：1、900：1、850：1、800：1、750：1、700：1、650：1、600：1、550：1、500：1、450：1、400：1、350：1、300：1、250：1、200：1、190：1、180：1、170：1、160：1、150：1、140：1、130：1、120：1、110：1、100：1、95：1、90：1、85：1、80：1、75：1、70：1、69：1、68：1、6

7 : 1、6 6 : 1、6 5 : 1、6 4 : 1、6 3 : 1、6 2 : 1、6 1 : 1、6 0 : 1、5
 9 : 1、5 8 : 1、5 7 : 1、5 6 : 1、5 5 : 1、5 4 : 1、5 3 : 1、5 2 : 1、5
 1 : 1、5 0 : 1、4 9 : 1、4 8 : 1、4 7 : 1、4 6 : 1、4 5 : 1、4 4 : 1、4
 3 : 1、4 2 : 1、4 1 : 1、4 0 : 1、3 9 : 1、3 8 : 1、3 7 : 1、3 6 : 1、3
 5 : 1、3 4 : 1、3 3 : 1、3 2 : 1、3 1 : 1、3 0 : 1、2 9 : 1、2 8 : 1、2
 7 : 1、2 6 : 1、2 5 : 1、2 4 : 1、2 3 : 1、2 2 : 1、2 1 : 1、2 0 : 1、1
 9 : 1、1 8 : 1、1 7 : 1、1 6 : 1、1 5 : 1、1 4 : 1、1 3 : 1、1 2 : 1、1
 1 : 1、1 0 : 1、9 : 1、8 : 1、7 : 1、6 : 1、5 : 1、4 : 1、3 : 1、2 : 1
 、1 : 1、0 . 9 : 1、0 . 8 : 1、0 . 7 : 1、0 . 6 : 1、0 . 5 : 1、0 . 4 : 1
 、0 . 3 : 1、0 . 2 : 1、又は0 . 1 : 1である。いくつかの実施形態では、ガイドポ
 リヌクレオチドをコードする核酸と塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸のモ
 ル比は、最大で約1 : 1 0 0 0 0、1 : 9 5 0 0、1 : 9 0 0 0、1 : 8 5 0 0、1 : 8
 0 0 0、1 : 7 5 0 0、1 : 7 0 0 0、1 : 6 5 0 0、1 : 6 0 0 0、1 : 5 5 0 0、1
 : 5 0 0 0、1 : 4 5 0 0、1 : 4 0 0 0、1 : 3 5 0 0、1 : 3 0 0 0、1 : 2 5 0 0
 、1 : 2 0 0 0、1 : 1 5 0 0、1 : 1 0 0 0、1 : 9 5 0、1 : 9 0 0、1 : 8 5 0、
 1 : 8 0 0、1 : 7 5 0、1 : 7 0 0、1 : 6 5 0、1 : 6 0 0、1 : 5 5 0、1 : 5 0
 0、1 : 4 5 0、1 : 4 0 0、1 : 3 5 0、1 : 3 0 0、1 : 2 5 0、1 : 2 0 0、1 :
 1 9 0、1 : 1 8 0、1 : 1 7 0、1 : 1 6 0、1 : 1 5 0、1 : 1 4 0、1 : 1 3 0、
 1 : 1 2 0、1 : 1 1 0、1 : 1 0 0、1 : 9 5、1 : 9 0、1 : 8 5、1 : 8 0、1 :
 7 5、1 : 7 0、1 : 6 9、1 : 6 8、1 : 6 7、1 : 6 6、1 : 6 5、1 : 6 4、1 :
 6 3、1 : 6 2、1 : 6 1、1 : 6 0、1 : 5 9、1 : 5 8、1 : 5 7、1 : 5 6、1 :
 5 5、1 : 5 4、1 : 5 3、1 : 5 2、1 : 5 1、1 : 5 0、1 : 4 9、1 : 4 8、1 :
 4 7、1 : 4 6、1 : 4 5、1 : 4 4、1 : 4 3、1 : 4 2、1 : 4 1、1 : 4 0、1 :
 3 9、1 : 3 8、1 : 3 7、1 : 3 6、1 : 3 5、1 : 3 4、1 : 3 3、1 : 3 2、1 :
 3 1、1 : 3 0、1 : 2 9、1 : 2 8、1 : 2 7、1 : 2 6、1 : 2 5、1 : 2 4、1 :
 2 3、1 : 2 2、1 : 2 1、1 : 2 0、1 : 1 9、1 : 1 8、1 : 1 7、1 : 1 6、1 :
 1 5、1 : 1 4、1 : 1 3、1 : 1 2、1 : 1 1、1 : 1 0、1 : 9、1 : 8、1 : 7、
 1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、1 : 0 . 9、1 : 0 . 8、1 : 0 .
 7、1 : 0 . 6、1 : 0 . 5、1 : 0 . 4、1 : 0 . 3、1 : 0 . 2、又は1 : 0 . 1で
 ある。

10

20

30

【0149】

[0193]精密ゲノム編集は、工業、農業、及び生物医学での用途が拡大しつつある分野
 である。今日利用可能な有力なゲノム編集系の1つは、クラスター化して規則的な配置の
 短い回文配列リピート (C R I S P R) - C R I S P R関連9 (C a s 9) である。D N A
 中の配列N G G (Nは任意の標準的な塩基である) を含む特定のプロトスペーサー隣接
 モチーフ (P A M) に隣接する標的ゲノム中のDNAの配列 (プロトスペーサーとして知
 られる) の配列と相同な配列を有するガイドRNA (g R N A) を使用することにより、
 C a s 9を使用して、標的化配列で二本鎖切断 (D S B) を作成することができる。D S
 Bにおける非相同末端結合 (N H E J) を使用して、遺伝子座においてインデルを作製し
 、遺伝子をノックアウトすることができる。同様に、導入されたテンプレートDNAとと
 もに、遺伝子を挿入するか、又は標的化配列を改変するために、相同性指向性修復 (H D
 R) を使用することができる。DNAをメチル化するか、より広い配列空間を認識するか
 、又は一本鎖ニックを作成するツールを含む、様々なC a s 9ベースのツールが近年開発
 されている。2016年に、Komor et al. は、テンプレートDNA鎖を導入
 せずに、かつD S Bを必要とせずに、シトシン塩基をチミン塩基に変換するためのC R I
 S P R - C a s 9の使用を記載した (Komor AC, Kim YB, Packer
 MS, et al. Programmable editing of a targe
 t base in genomic DNA without double-str
 anded DNA cleavage. Nature, 2016, 533: 420-4
 、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。ラットA P O B E C 1のシチジンデ

40

50

アミナーゼドメインを、リンカーXTEENを使用して触媒死Cas9 (dCas9) のN末端に融合させた (塩基エディター1、又はBE1と呼ばれる融合タンパク質をもたらした) 後、DNAの20ntプロトスペーサー領域内の位置4と位置8との間でシトシンからウラシルへの変換が観察された (又は、それを異なる方法で発現させるために、PAMの上流の13~17ヌクレオチド)。注目すべきことに、この「ウィンドウ」内の任意のシトシン塩基は、編集可能であり、その結果、どの程度多くのシトシン、また、どのシトシンが編集されたかに応じて様々な結果をもたらした。DNA複製又は修復の後、各ウラシルをチミンに置き換え、CからTの塩基の編集を完了した。3。次のバージョンの塩基エディター (BE2) は、dCas9のC末端に融合されたウラシルグリコシラーゼ阻害剤を組み込み、シチジンデアミナーゼ活性から生じるウラシル塩基の塩基除去修復 (そう

でなければ、元々のシトシン塩基を回復するように作用する) を阻害するのを助けた。これにより、CからTの塩基編集の効率が改良された。最終バージョンのBE3は、dCas9ではなくCas9ニッカーゼを使用した。ニッカーゼは、編集されたCからT塩基の反対側の未編集鎖を切断し、真核生物ミスマッチ修復を介して対立するグアニジンの除去を刺激する。BE2及びBE3塩基編集は、ヒト細胞株及びマウス細胞株の両方において観察された。塩基編集の特異性は、Cas9ニッカーゼへの変異の付加によって更に改良されている。同様の方法で、Cas9は、編集ウィンドウの幅をおよそ5ヌクレオチドからわずか1~2ヌクレオチドに狭めるように変異されている (Rees HA, Komor AC, Yeh WH, et al. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery Nat Commun, 2017, 8:15790, Kim YB, Komor AC, Levy JM, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. Nat Biotechnol, 2017, 35:371-6、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)。

10

20

30

40

50

【0150】

【0194】代替のシトシン塩基編集プラットフォームは、活性化誘導シトシンデアミナーゼドメインPmCDA1をdCas9 (Target-AID) に連結することによるものであり、酵母における標的化されたCからTの塩基編集を示すことができた。更に、デアミナーゼドメインをCas9に融合させることなく、代替のCからTの塩基編集戦略も示すことができた。代わりに、SH3 (Src3相同性) ドメインをdCas9のC末端に付加し、SHL (SH3相互作用リガンド) をPmCDA1.6に付加した。効率の最適化は、dCas9ではなくCas9ニッカーゼを使用することによって達成された。更に、ウラシルDNAグリコシラーゼ阻害剤を添加して、哺乳動物CHO細胞株における塩基編集を増強した。得られたプラットフォームは、PAM配列の上流の18番目のヌクレオチドの3~5塩基内の塩基を一貫して編集することができた (Nishida K et al., Science, 2016, 353:aaf8729)。

【0151】

【0195】別個のシトシン塩基編集プラットフォームは、RNA誘導エンドヌクレアーゼとしてCas9の代わりにCpf1 (Cas12aとしても知られる) を使用した。触媒不活性Cpf1をAPOBEC1 (dLbCpf1-BE0) に融合し、ヒト細胞株におけるCからTへの変換をもたらした。Cas9塩基エディターバリエーションBE3及び標的-AIDが、PAM配列NGGを認識するが、dLbCpf1-BE0は、Trich PAM配列TTTVを認識する。塩基編集が、dLbCpf1-BE0を有するプロトスペーサー配列の位置8と13との間で観察されたが、Cpf1への追加の変異の導入は、ウィンドウを位置10~12に減少させることができた。しかしながら、塩基編集ウィンドウを狭めることは、編集効率の低下と相関していた (Li X et al., Nat Biotechnol, 2018, 36:324-7)。

【0152】

[0196] シトシン塩基編集は、完全に予測可能なものではない。インデルは、CからTの編集エディターについて観察されたものよりも低い頻度ではあるが、標的部位で生じ得る。更に、シトシン編集エディターは、予想されるCからTの編集ではなく、CからA又はCからGの編集を時折引き起こし得る。Cas9ニッカーゼとラットAPOBEC1シトシンデアミナーゼドメインとの間に16アミノ酸から32アミノ酸までのリンカー長を追加し、Cas9ニッカーゼとウラシルグリコシラーゼ阻害剤との間に4アミノ酸から9アミノ酸までのリンカーを追加し、第2のウラシルグリコシラーゼ阻害剤を使用して、別の9アミノ酸リンカーを使用して新しいシトシン塩基エディターのC末端に付加して、「BE4」と称されるシトシン塩基エディターを改良した (Komor AC et al., Sci Adv, 2017, 3: eaao4774)。

10

【0153】

[0197] *Escherichia coli* アデニン tTNAデアミナーゼ TadA (ecTadA) を dCas9 に融合させ、編集活性についての選択と組み合わせで、ecTadAドメインの変異誘発を行うことにより、ABE7.10と称される、A106V及びD108N変異が、DNAにおけるアデニンからグアニンへの編集を可能にする塩基エディターが得られたことを明らかにした (Gaudelli NM et al., Nature, 2017, 551: 464-71)。Koblan et al. は、核局在化シグナル及びコドン最適化の改変によってABE7.10の効率を改良して、ABE maxと呼ばれるバージョンを得た。同様のアプローチは、シトシン塩基エディターBE4.10の効率を改良した。Huang et al. は、代替的なPAMを使用し、それらの編集ウィンドウを拡張するためのアデニン及びシトシン両方の塩基エディターの更なる開発を行い、それによって、それらの標的範囲が増加している (Koblan LW et al., Nat Biotechnol, 2018, 36: 843-6)。同じgRNAを使用するCas9、シトシン塩基エディター、及びアデニン塩基エディターの比較は、異なるオフターゲットプロファイルを示しているが、塩基エディターについても同様に当てはまることが判明している (12~14)。

20

【0154】

[0198] 同じgRNAを使用するCas9、シトシン塩基エディター、及びアデニン塩基エディターの比較は、異なるオフターゲットプロファイルを示しているが、塩基エディターについても同様に当てはまることが判明している。

30

【0155】

[0199] 様々な研究は、(Cas9-gRNA複合体によるDNAの関与を必要とせず) 単独で作用するデアミナーゼドメインによって引き起こされる、gRNA非依存性オフターゲット塩基編集に関する懸念を提起している。更なる研究は、塩基エディターのgRNA非依存性オフターゲット効果がDNAに限定されないことを示した。シトシン塩基エディター又はアデニン塩基エディターのいずれかで処理された細胞のRNA配列決定は、RNAのトランスクリプトームワイドオフターゲット編集を明らかにし、このアデニン塩基 (例えば、R106W) エディターのデアミナーゼドメインにおけるアミノ酸置換の導入は、オンターゲットDNA塩基編集効率を実質的に減少させることなく、RNAのオフターゲット編集を減少させた。Zuo E, Sun Y, Wei W, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. Science, 2019, 364: 289-92、Jin S, Zong Y, Gao Q, et al. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. Science, 2019, 364: 292-5、Grunewald J, Zhou R, Garcia SP, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA

40

50

base editors. *Nature*, 2019, 569:433-7、Grune
wald J, Zhou R, Iyer S, et al. CRISPR DNA ba
se editors with reduced RNA off-target a
nd self-editing activities. *Nat Biotechnol*, 2019, 37:1041-8、Zhou C, Sun Y, Yan R, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA
base editing and its elimination by muta
genesis. *Nature*, 2019, 571:275-8、Rees HA, Wi
lson C, Doman JL, et al. Analysis and minim
ization of cellular RNA editing by DNA ad
enine base editors. *Sci Adv*, 2019, 5:eaax57
17 (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)。

【0156】

[0200]標準的なCas9ゲノム編集による精密編集を介した疾患を引き起こす変異の
修正は、主にHDRを必要とする。HDRは、有糸分裂のS期又はG2期の細胞に限定さ
れるため、非有糸分裂細胞の精密編集は困難である。しかしながら、塩基エディターは、
HDRに依存していない。マウスにおける有糸分裂後蝸牛細胞の編集は、シトシン塩基エ
ディターBE3により実現可能である。カチオン性リポソームを介して事前に組み立てら
れたリボ核タンパク質の形態でBE3及びgRNAを注射することによって、ベータ-カ
テニン中のセリン-33をフェニルアラニンに編集し(TTTに編集されたTCTコドン
)、支持細胞から有毛細胞への分化転換を可能にした。蝸牛組織の塩基編集は、配列決定
によって確認され、蝸牛の領域に応じて、0.7%~3.0%の間の編集率を示している
。対照的に、HDRを介した標準的なCas9編集は、蝸牛細胞における有効性の無視で
きるほどの徴候を示した。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを介して肝臓に送達さ
れるSaBE3のバリエーションは、Pah遺伝子における病原性のTからCの変異を、29
%の高い編集率で直接修正し、それによって、成体マウスにおける疾患フェニルケトン尿
症を治療することが報告された。アデニン塩基編集はまた、マウスにおいて変異を生成す
ることが示されている。Yeh WH, Chiang H, Rees HA, et al.
. *In vivo base editing of post-mitotic se
nsory cells. Nat Commun*, 2018, 9:2184、Villi
ger L, Grisch-Chan HM, Lindsay H, et al. Tre
atment of a metabolic liver disease by in
vivo genome base editing in adult mice. *N
at Med*, 2018, 24:1519-25、Ryu SM, Koo T, Kim
K, et al. Adenine base editing in mouse em
bryos and an adult mouse model of Duchenn
e muscular dystrophy. *Nat Biotechnol*, 2018
, 36:536-9、Song CQ, Jiang T, Richter M, et
al. Adenine base editing in an adult mouse
model of tyrosinaemia. *Nat Biomed Eng*, 202
0, 4:125-30、Pisciotta L, Favari E, Magnolo
L, et al. Characterization of three kindre
ds with familial combined hypolipidemia
caused by loss-of-function mutations of
ANGPTL3. *Circ Cardiovasc Genet*, 2012, 5:42-
50 (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)。

【0157】

[0201]標的ヌクレオチド配列内の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、又はU)への
改変又は変換を行うことができる核酸塩基エディタータンパク質、複合体、又は化合物を
含む核酸塩基エディター系の組成物が本明細書で提供される。

【0158】

【0202】核酸塩基エディター又は塩基エディター（BE）は、核酸配列（例えば、DNA又はRNA）内の塩基（例えば、A、T、C、G、又はU）への改変を行うことができるポリペプチドを含む薬剤を指す。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、核酸内の塩基を脱アミノ化することができる。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、DNA分子内の塩基を脱アミノ化することができる。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、DNA内のアデニン（A）を脱アミノ化することができる。

【0159】

【0203】いくつかの実施形態では、塩基エディターは、アデノシンデアミナーゼに融合されたプログラマブルDNA結合タンパク質を含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、Cas9タンパク質及びアデノシンデアミナーゼを含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、アデノシンデアミナーゼに融合されたCas9ニッカーゼ（nCas9）である。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、アデノシンデアミナーゼに融合されたヌクレアーゼ不活性Cas9（dCas9）である。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、シチジンデアミナーゼに融合されたプログラマブルDNA結合タンパク質を含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、Cas9タンパク質及びシチジンデアミナーゼを含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、シチジンデアミナーゼに融合されたCas9ニッカーゼ（nCas9）である。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、シチジンデアミナーゼに融合されたヌクレアーゼ不活性Cas9（dCas9）である。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、塩基除去修復の阻害剤、例えば、UGIドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、デアミナーゼに融合されたCas9ニッカーゼと、塩基除去修復の阻害剤、例えば、UGI又はdISNDドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のdCas9ドメインは、野生型SpCas9アミノ酸配列において付番される場合、D10A及びH840A変異を含む。いくつかの実施形態では、UGIは、以下のアミノ酸配列を含む。

【0160】

【0204】>spLP14739IUNGI_BPPB2_Uracil-DNAグリコシラーゼ阻害剤
MTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESD
ILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDS
NGENKIKML（配列番号735）。

【0161】

【0205】いくつかの実施形態では、本明細書で提供される塩基エディター系は、塩基エディター融合タンパク質を含む。例えば、塩基エディター融合タンパク質は、プログラマブルDNA結合タンパク質と、デアミナーゼ、例えば、アデノシンデアミナーゼと、を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される融合タンパク質のいずれかが、塩基エディターである。いくつかの実施形態では、プログラマブルDNA結合タンパク質は、Cas9ドメイン、Cpf1ドメイン、CasXドメイン、CasYドメイン、Cas12bドメイン、C2c2ドメイン、aC2c3ドメイン、又はArgonauteドメインである。いくつかの実施形態では、プログラマブルDNA結合タンパク質は、Cas9ドメインである。Cas9ドメインは、本明細書で提供されるCas9ドメイン又はCas9タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ不活性Cas9若しくはCas9ニッカーゼ、又は任意の種由来のCas9バリエーション）のいずれかであってもよい。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるCas9ドメイン又はCas9タンパク質のうちのいずれかは、本明細書で提供されるデアミナーゼのうちのいずれかと融合してもよい。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、リンカーを介して接続された、デアミナーゼ（例えば、アデノシンデアミナーゼ）と、プログラマブルDNA結合タンパク質（例えば、Cas9ドメイン）とを含む。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、リンカーを介

して接続された、デアミナーゼ（例えば、アデノシンデアミナーゼ）と、プログラマブル DNA 結合タンパク質（例えば、Cas9 ドメイン）を含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ペプチドリinkerである。いくつかの実施形態では、リンカーは、デアミナーゼドメインと Cas9 ドメインとの間に存在する。いくつかの実施形態では、デアミナーゼ及びプログラマブル DNA 結合ドメインは、本明細書で提供されるペプチドリinkerのうちのいずれかを介して融合される。例えば、アデノシンデアミナーゼ及び Cas9 ドメインは、1～200 個のアミノ酸を含むリンカーを介して融合されてもよい。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼ及びプログラマブル DNA 結合タンパク質は、1～5、1～10、1～20、1～30、1～40、1～50、1～60、1～80、1～100、1～150、1～200、5～10、5～20、5～30、5～40、5～60、5～80、5～100、5～150、5～200、10～20、10～30、10～40、10～50、10～60、10～80、10～100、10～150、10～200、20～30、20～40、20～50、20～60、20～80、20～100、20～150、20～200、30～40、30～50、30～60、30～80、30～100、30～150、30～200、40～50、40～60、40～80、40～100、40～150、40～200、50～60、50～80、50～100、50～150、50～200、60～80、60～100、60～150、60～200、80～100、80～150、80～200、100～150、100～200、又は150～200 アミノ酸長を含むリンカーを介して融合される。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼ及びプログラマブル DNA 結合タンパク質は、4、16、32、又は104 アミノ酸長を含むリンカーを介して融合される。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼ及びプログラマブル DNA 結合タンパク質は、SGSETPGTSESATPES（配列番号736）、SGGS（配列番号737）、SGGS SGSETPGTSESATPES SGGS（配列番号738）、SGGS SGGS SGSETPGTSESATPES SGGS SGGS（配列番号739）、又はGGSG GSPGSPAGSPPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPES GPGSE PATSGGS GGGS（配列番号740）のアミノ酸配列を含むリンカーを介して融合される。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼ及びプログラマブル DNA 結合タンパク質は、XTEN リンカーとも呼ばれ得る、アミノ酸配列 SGSETPGTSESATPES（配列番号736）を含むリンカーを介して融合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、24 アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列 SGGS SGGS SGSETPGTSESATPES（配列番号741）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、40 アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列 SGGS SGGS SGSETPGTSESATPES SGGS SGGS SGSETPGTSESATPES SGGS SGGS SGSETPGTSESATPES SGGS SGGS（配列番号742）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、64 アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列 SGGS SGGS SGSETPGTSESATPES SGGS SGGS SGSETPGTSESATPES SGGS SGGS SGSETPGTSESATPES SGGS SGGS（配列番号743）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、92 アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列 PGSPAGSPPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSE PATS（配列番号744）を含む。

【0162】

【0206】いくつかの実施形態では、本明細書で提供される塩基エディター系は、塩基修復の阻害剤を含む融合タンパク質を含む塩基エディターを含む。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、シチジンデアミナーゼ及びプログラマブル DNA 結合ドメイン（例えば、Cas9 ドメイン）を含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、アデノシンデアミナーゼ及びプログラマブル DNA 結合ドメイン（例えば

10

20

30

40

50

、Cas9ドメイン)を含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、塩基エディター又は融合タンパク質は、塩基修復の阻害剤(IBR)を更に含む。いくつかの実施形態では、IBRは、イノシン塩基修復の阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、IBRは、イノシン塩基除去修復の阻害剤である。いくつかの実施形態では、イノシン塩基除去修復の阻害剤は、触媒不活性イノシン特異的ヌクレアーゼ(dISN)である。いくつかの実施形態では、dISNは、イノシンを除去する酵素が、DNAからイノシン残基を除去することを(例えば、立体障害によって)阻害し得る。例えば、触媒的に死んだイノシングリコシラーゼ(例えば、アルキルアデニングリコシラーゼ[AAG])は、イノシンに結合するが、脱塩基部位を作製したり、又はイノシンを除去したりすることなく、それによって、新たに形成されたイノシン部分を潜在的なDNA損傷/修復機構から立体的に遮断する。したがって、本開示は、プログラマブルDNA結合タンパク質と、dISNに更に融合されたアデノシンデアミナーゼとを含む融合タンパク質を企図する。本開示は、任意のCas9ドメイン、例えば、Cas9ニッカーゼ(ncas9)ドメイン、触媒不活性Cas9(dCas9)ドメイン、高忠実度Cas9ドメイン、又は減少したPAM排他性を有するCas9ドメインを含む融合タンパク質を企図する。dISNの使用は、AからIへの変更を触媒することができるアデノシンデアミナーゼの編集効率を増加させ得ることが理解されるべきである。例えば、dISNドメインを含む融合タンパク質は、A残基の脱アミノ化において、より効率的であり得る。

10

【0163】

[0207]いくつかの実施形態では、本明細書で提供される塩基エディターは、1つ以上の核標的化配列、例えば、核局在化配列(NLS)を更に含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、複数のNLSを含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、融合タンパク質のN末端及びC末端にNLSを含む。いくつかの実施形態では、NLSは、NLSを含むタンパク質の細胞核への輸送を容易にするアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、NLSは、融合タンパク質のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、NLSは、融合タンパク質のC末端に融合される。いくつかの実施形態では、NLSは、プログラマブルDNA結合タンパク質(例えば、Cas9)のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、NLSは、プログラマブルDNA結合タンパク質のC末端に融合される。いくつかの実施形態では、NLSは、アデノシンデアミナーゼのN末端に融合される。いくつかの実施形態では、NLSは、アデノシンデアミナーゼのC末端に融合される。いくつかの実施形態では、NLSは、1つ以上のリンカーを介して融合タンパク質に融合される。いくつかの実施形態では、NLSは、リンカーを用いずに融合タンパク質に融合される。いくつかの実施形態では、NLSは、本明細書で提供されるか、又は本明細書で参照されるNLS配列のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、NLSは、アミノ酸配列PKKKRKV(配列番号745)又はMDSL LMNRRKF L Y Q F K N V R W A K G R R E T Y L C(配列番号746)を含む。追加の核局在化配列は、当該技術分野で既知であり、当業者には明らかであろう。例えば、NLS配列は、Plank et al, PCT/EP2000/011690に記載されており、その内容は、例示的な核局在化配列の開示のために参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

40

【0164】

[0208]いくつかの実施形態では、本明細書で提供される融合タンパク質は、リンカーを含まない。いくつかの実施形態では、リンカーは、ドメイン又はタンパク質(例えば、アデノシンデアミナーゼ、napDNAbp、NLS、及び/又はIBR)のうちの1つ以上の間に存在する。いくつかの実施形態では、上の一般的なアーキテクチャで使用される「-」は、任意選択的なリンカーの存在を示す。

【0165】

[0209]本開示のいくつかの態様は、プログラマブルDNA結合タンパク質及び少なくとも2個のアデノシンデアミナーゼドメインを含む塩基エディター又は融合タンパク質を提供する。任意の特定の理論に拘束されることを望むものではないが、(例えば、シス又

50

はトランスでの) アデノシンデアミナーゼの二量体化は、融合タンパク質が核酸塩基を改変する能力(例えば、効率)、例えば、アデニンを脱アミノ化する能力(例えば、効率)を改善し得る。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のうちのいずれかが、2、3、4、又は5個のアデノシンデアミナーゼドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される融合タンパク質のうちのいずれかが、2個のアデノシンデアミナーゼを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される融合タンパク質のうちのいずれかが、2個のアデノシンデアミナーゼのみを含有する。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、同じである。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、異なっている。いくつかの実施形態では、第1のアデノシンデアミナーゼは、本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかであり、第2のアデノシンデアミナーゼは、本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかであるが、第1のアデノシンデアミナーゼと同一ではない。いくつかの実施形態では、第1のアデノシンデアミナーゼは、配列番号747において付番される場合、本明細書で提供される変異のうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、第2のアデノシンデアミナーゼは、配列番号747において付番される場合、本明細書で提供される変異のうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、第1のアデノシンデアミナーゼは、配列番号747において付番される場合、本明細書で提供される変異のうちのいずれか1つを含み、第2のアデノシンデアミナーゼは、野生型アデノシンデアミナーゼ配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のアデノシンデアミナーゼは、配列番号747において付番される場合、本明細書で提供される変異のうちのいずれか1つを含み、第1のアデノシンデアミナーゼは、野生型アデノシンデアミナーゼ配列を含む。一例として、融合タンパク質は、両方とも ecTadA (配列番号747) からの A106V、D108N、D147Y、及び E155V 変異を含む第1のアデノシンデアミナーゼ及び第2のアデノシンデアミナーゼを含み得る。別の例として、融合タンパク質は、ecTadA (配列番号747) からの A106V、D108N、D147Y、及び E155V 変異を含む第1のアデノシンデアミナーゼドメインと、ecTadA (配列番号747) からの L84F、A106V、D108N、H123Y、D147Y、E155V、及び I156F 変異を含む第2のアデノシンデアミナーゼを含み得る。

10

20

30

【0166】

[0210]いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、以下のアミノ酸配列を含む。

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRV
IGEGWNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATL
YVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTGAAGSLMDV
LHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRREQEIKAQK
KAQSSSTD (配列番号747)。

【0167】

[0211]いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、2個のアデノシンデアミナーゼ(例えば、第1のアデノシンデアミナーゼ及び第2のアデノシンデアミナーゼ)を含む。いくつかの実施形態では、第1のアデノシンデアミナーゼは、融合タンパク質内の第2のアデノシンデアミナーゼに対してN末端である。いくつかの実施形態では、第1のアデノシンデアミナーゼは、融合タンパク質内の第2のアデノシンデアミナーゼに対してC末端である。いくつかの実施形態では、第1のアデノシンデアミナーゼ及び第2のアデノシンデアミナーゼは、直接的に、又はリンカーを介して融合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、本明細書で提供されるリンカーのうちのいずれか、例えば、「リンカー」セクションに記載されるリンカーのうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、第1のアデノシンデアミナーゼは、第2のアデノシンデアミナーゼと同じである。いくつかの実施形態では、第1のアデノシンデアミナーゼ及び第2のアデノシンデアミナーゼは、本明細書に記載されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、

40

50

第1のアデノシンデアミナーゼ及び第2のアデノシンデアミナーゼは、異なっている。いくつかの実施形態では、第1のアデノシンデアミナーゼは、本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、第2のアデノシンデアミナーゼは、本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかであるが、第1のアデノシンデアミナーゼと同一ではない。いくつかの実施形態では、第1のアデノシンデアミナーゼは、e c T a d A アデノシンデアミナーゼである。いくつかの実施形態では、第1のアデノシンデアミナーゼは、配列番号747に示されるアミノ酸配列に対して、又は本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、又は少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のアデノシンデアミナーゼは、配列番号747に示されるアミノ酸配列に対して、又は本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、又は少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のアデノシンデアミナーゼは、配列番号747のアミノ酸配列を含む。

10

20

【0168】

[0212]いくつかの実施形態では、本明細書で提供される融合タンパク質は、リンカーを含まない。いくつかの実施形態では、リンカーは、ドメイン又はタンパク質（例えば、第1のアデノシンデアミナーゼ、第2のアデノシンデアミナーゼ、プログラマブルDNA結合タンパク質、及び／又はNLS）のうちの1つ以上の間に存在する。

【0169】

[0213]本開示の融合タンパク質は、1つ以上の追加の特徴を含み得ることが理解されるべきである。例えば、いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、細胞質局在化配列、核エクスポート配列などのエクスポート配列、又は他の局在化配列、並びに融合タンパク質の可溶化、精製、又は検出に有用な配列タグを含み得る。本明細書に提供される好適なタンパク質タグとしては、ビオチンカルボキシラーゼ担体タンパク質（BCCP）タグ、mycタグ、カルモジュリンタグ、FLAGタグ、ヘマグルチニン（HA）タグ、ヒスチジンタグ又はHisタグとも称されるポリヒスチジンタグ、マルトース結合タンパク質（MBP）タグ、nusタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）タグ、緑色蛍光タンパク質（GFP）タグ、チオレドキシントグ、Sタグ、Softag（例えば、Softag1、Softag3）、streptタグ、ビオチンリガーゼタグ、FLAsHタグ、V5タグ、及びSBPタグが挙げられるが、これらに限定されない。追加の好適な配列は、当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、1つ以上のHisタグを含む。

30

【0170】

[0214]いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、表4に列挙されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、少なくとも99.5%、少なくとも99.7%、又は少なくとも99.9%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、表4に列挙されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号688、691、695、702、705、及び707のアミノ酸配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なく

40

50

とも90%、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%、少なくとも99.5%、少なくとも99.7%、又は少なくとも99.9%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号688、691、695、702、705、及び707のアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質の配列は、配列番号688及び702のアミノ酸配列のうちのいずれか1つである。

【0171】

[0215]いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、表4に列挙されるポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、少なくとも99.5%、少なくとも99.7%、又は少なくとも99.9%同一であるポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、表23に列挙されるポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つによってコードされる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、表4に列挙されるポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、少なくとも99.5%、少なくとも99.7%、又は少なくとも99.9%同一であるポリヌクレオチド配列によって発現される。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、表4に列挙されるポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つによって発現される。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号687、690、694、701、704、及び706のポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、少なくとも99.5%、少なくとも99.7%、又は少なくとも99.9%同一のものを含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号687、690、694、701、704、及び706のポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つを含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号687、690、694、701、704、及び706のポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、少なくとも99.5%、少なくとも99.7%、又は少なくとも99.9%同一のものを含むポリヌクレオチド配列、又はそれらの組み合わせによって発現される。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号687、690、694、701、704、及び706のポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つを含むポリヌクレオチド配列、又はそれらの組み合わせによってコードされる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、配列番号687、690、694、701、704、及び706のポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つによって発現される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列質は、配列番号687及び701のポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、少なくとも99.5%、少なくとも99.7%、又は少なくとも99.9%同一のものを更に含む。

【0172】

[0216]いくつかの実施形態では、核酸塩基エディターABE8.8は、以下に提供さ

10

20

30

40

50

れる配列を含む融合タンパク質を含む。

M S E V E F S H E Y W M R H A L T L A K R A R D E R E V P V G A V L V L N N R V
I G E G W N R A I G L H D P T A H A E I M A L R Q G G L V M Q N Y R L I D A T L
Y V T F E P C V M C A G A M I H S R I G R V V F G V R N A K T G A A G S L M D V
L H H P G M N H R V E I T E G I L A D E C A A L L C R F F R M P R R V F N A Q K
K A Q S S T D S G G S S G G S S G S E T P G T S E S A T P E S S G G S S G G S D
K K Y S I G L A I G T N S V G W A V I T D E Y K V P S K K F K V L G N T D R H S
I K K N L I G A L L F D S G E T A E A T R L K R T A R R R Y T R R K N R I C Y L
Q E I F S N E M A K V D D S F F H R L E E S F L V E E D K K H E R H P I F G N I
V D E V A Y H E K Y P T I Y H L R K K L V D S T D K A D L R L I Y L A L A H M I
K F R G H F L I E G D L N P D N S D V D K L F I Q L V Q T Y N Q L F E E N P I N
A S G V D A K A I L S A R L S K S R R L E N L I A Q L P G E K K N G L F G N L I
A L S L G L T P N F K S N F D L A E D A K L Q L S K D T Y D D D L D N L L A Q I
G D Q Y A D L F L A A K N L S D A I L L S D I L R V N T E I T K A P L S A S M I
K R Y D E H H Q D L T L L K A L V R Q Q L P E K Y K E I F F D Q S K N G Y A G Y
I D G G A S Q E E F Y K F I K P I L E K M D G T E E L L V K L N R E D L L R K Q
R T F D N G S I P H Q I H L G E L H A I L R R Q E D F Y P F L K D N R E K I E K
I L T F R I P Y Y V G P L A R G N S R F A W M T R K S E E T I T P W N F E E V V
D K G A S A Q S F I E R M T N F D K N L P N E K V L P K H S L L Y E Y F T V Y N
E L T K V K Y V T E G M R K P A F L S G E Q K K A I V D L L F K T N R K V T V K
Q L K E D Y F K K I E C F D S V E I S G V E D R F N A S L G T Y H D L L K I I K
D K D F L D N E E N E D I L E D I V L T L T L F E D R E M I E E R L K T Y A H L
F D D K V M K Q L K R R R Y T G W G R L S R K L I N G I R D K Q S G K T I L D F
L K S D G F A N R N F M Q L I H D D S L T F K E D I Q K A Q V S G Q G D S L H E
H I A N L A G S P A I K K G I L Q T V K V V D E L V K V M G R H K P E N I V I E
M A R E N Q T T Q K G Q K N S R E R M K R I E E G I K E L G S Q I L K E H P V E
N T Q L Q N E K L Y L Y Y L Q N G R D M Y V D Q E L D I N R L S D Y D V D H I V
P Q S F L K D D S I D N K V L T R S D K N R G K S D N V P S E E V V K K M K N Y
W R Q L L N A K L I T Q R K F D N L T K A E R G G L S E L D K A G F I K R Q L V
E T R Q I T K H V A Q I L D S R M N T K Y D E N D K L I R E V K V I T L K S K L
V S D F R K D F Q F Y K V R E I N N Y H H A H D A Y L N A V V G T A L I K K Y P
K L E S E F V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S E Q E I G K A T A K Y F F Y S N I
M N F F K T E I T L A N G E I R K R P L I E T N G E T G E I V W D K G R D F A T
V R K V L S M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E S I L P K R N S D K L I A R
K K D W D P K K Y G G F D S P T V A Y S V L V V A K V E K G K S K K L K S V K E
L L G I T I M E R S S F E K N P I D F L E A K G Y K E V K K D L I I K L P K Y S
L F E L E N G R K R M L A S A G E L Q K G N E L A L P S K Y V N F L Y L A S H Y
E K L K G S P E D N E Q K Q L F V E Q H K H Y L D E I I E Q I S E F S K R V I L
A D A N L D K V L S A Y N K H R D K P I R E Q A E N I I H L F T L T N L G A P A
A F K Y F D T T I D R K R Y T S T K E V L D A T L I H Q S I T G L Y E T R I D L
S Q L G G D (配列番号734)。

10

20

30

40

【0173】

【0217】MA004と比較した、MA040、MA041、及びMA045のアミノ酸及びヌクレオチドの変更：MA004は、nCas9のアミノ酸位置691にコドンCGG、及びアミノ酸位置1135にコドンGACを有する。MA040は、D1135EのnCas9アミノ酸変異を有する。コドン1135は、GAGに変更される。MA041は、R691A及びD1135EのnCas9アミノ酸変異を有する。コドン691は、GCCに変更され、コドン1135は、GAGに変更される。MA045は、R691AのnCas9アミノ酸変異を有する。コドン691は、GCCに変更される。

【0174】

50

[0218]追加のアデノシンデアミナーゼ変異及びバリエーションは、特許出願第WO2018/119354に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

[0175]

[0219]本出願において有用な追加のアデノシンデアミナーゼは、当業者には明らかであり、かつ本開示の範囲内である。例えば、アデノシンデアミナーゼは、AD ATのホモログであり得る。例示的なAD ATホモログとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない。

[0176]

[0220] *Staphylococcus aureus* TadaA:

MGSHMTNDIYFMTLAIEEAKKAAQLGEVPIGAIIITKDDEV 10
IARAHNLRETLQQPTAH AEHIAIERAAKVLGSRLEGCT
LYVTLEPCVMCAGTIVMSRIPRVVYGADDPKGGCS GS L
MNLLQQS NFNHRAIVDKG VLKE AC S TLLTTFFKNL
RANKKS TN (配列番号748)

[0177]

[0221] *Bacillus subtilis* TadaA:

MTQDELYMKEAIKEAKKAEKGEVPIGAVLVINGEIIARA
HNLRETEQRSIAHAEML VIDE AC KALGT WRLEG AT
LY VTLEPCPMC AG A V VLS R VEK V VFG AFDPK
GGC S GTLMN LLQEERFNHQ AE V VS G VLEEEC G 20
GMLS AFFREL RKKKK A ARKNLS E (配列番号749)

[0178]

[0222] *Salmonella typhimurium* (S. typhimurium) TadaA:

MPPAFITGVTSLSDVELDHEYWMRHALTLAKRAWDEREVP
VGAVLVHNHRVIGEG WNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGGL
VLQNYRLLDTTLYVTLEPCVMCAGAMVHSRIG RVVFGAR
DAKTGAAGSLIDVLHHPGMNHRVEIIIEGVLRDECATLLSD
FFRMRRQEIK ALKKADRAEGAGPAV (配列番号750)

[0179]

[0223] *Shewanella putrefaciens* (S. putrefaciens) TadaA:

MDEYWMQVAMQMAEKAEAAAGEVPVGAVLVKDGQQIATGYN
LSISQHDPTAHAEILCLRSAGKKLENYRLLDATLYITLEP
CAMCAGAMVHSRIARVVYGARDEKKTGAAGTVVNLLQHPAF
NHQVEVTSGVLAEACSAQLSRFFKRRRDEKKALKLAQRAQ
QGIE (配列番号751)

[0180]

[0224] *Haemophilus influenzae* F3031 (H. influenzae) TadaA:

MDAAKVRSEFDEKMMRYALELADKAEALGEIPVGAVLVDD
ARNIIGEGWNLSIVQSDPTAHAEIIALRNGAKNIQNYRL
NSTLYVTLEPCTMCAGAILHSRIKRLVFGASDYKTGAIGS
RFHFFDDYKMNHTLEITSGVLAEECSQKLSTFFQKRREEK
KIEKALLKSLSDK (配列番号752)

[0181]

[0225] *Caulobacter crescentus* (C. crescentus) TadaA:

MRTDESEDQDHRMMRLALDAARAAAEAGETPVGAVILDPS
TGEVIATAGNGPIAAHDPTAHAEIAAMRAAAAKLGNYRLT 50

DLTLVVTLEPCAMCAGAI SHARIGRVVFGADDPKGGAVVH
GPKFFAQPTCHWRPEVTGGVLADESADLLRGFFRARRKAK
I (配列番号753)

【0182】

[0226] *Geobacter sulfurreducens* (*G. sulfurreducens*) Tada:

MSSLKKTPIRDDAYWMGKAIREAAKAAARDEVPIGAVIVR
DGAVIGRGHNLREGSNDPSAHAEMIAIRQAARRSANWRLT
GATLYVTLEPCLMCMGAIIILARLERVVFGCYDPKGGAGS
LYDLSADPRLNHQVRLSPGVCEECGTMLSDFFRDLRRRK
KAKATPALFIDERKVPPEP (配列番号754)

10

【0183】

[0227]他の態様では、本開示は、ポリヌクレオチドを編集するための塩基編集系及び方法を提供する。例えば、ANGPTL3をコードするポリヌクレオチド及びそのバリエーションを編集するためのゲノム／塩基編集系及び方法が本明細書で提供される。標的遺伝子を編集するために、標的遺伝子ポリヌクレオチドは、sgRNA及びアデノシン塩基エディタータンパク質を含む本明細書に開示される系に接触してもよく、sgRNAは、本明細書に開示されるスパーサー配列と、tracrRNA配列と、を含み、スパーサー配列は、ANGPTL3遺伝子中の標的ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズし、tracrRNA配列は、アデノシン塩基エディタータンパク質（例えば、アデノシン塩基エディターのCas9構成要素）に結合する。したがって、sgRNAは、塩基エディタータンパク質を標的ポリヌクレオチド配列に導き、標的遺伝子内でaからGへの改変をもたらし得る。標的遺伝子又は標的ポリヌクレオチドは、ANGPTL3をコードする遺伝子であってもよい。標的ポリヌクレオチド配列は、ANGPTL3遺伝子内であってもよい。改変は、細胞におけるANGPTL3遺伝子によってコードされる機能的ANGPTL3タンパク質の発現を減少又は無効化することができる。導入は、組成物を含む脂質ナノ粒子を介して行うことができる。

20

【0184】

[0228]例えば、sgRNA及びアデノシン塩基エディタータンパク質は、標的遺伝子編集が必要とされる細胞（例えば、肝臓細胞）において発現されてもよく、それによって、標的遺伝子を本明細書に開示される組成物（例えば、sgRNA及びアデノシン塩基エディタータンパク質）と接触させることが可能になる。いくつかの実施形態では、アデノシン塩基編集タンパク質の標的遺伝子におけるその標的ポリヌクレオチド配列への結合は、本明細書に開示される単一のガイドRNA、例えば、(i)本明細書に開示されるスパーサー配列及び(ii)tracrRNA配列を含む単一のガイドRNAによって指示され、スパーサー配列は、標的遺伝子における標的ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズする。したがって、ガイドRNA配列を設計することによって、アデノシン塩基エディタータンパク質は、標的遺伝子（例えば、ANGPTL3をコードする標的遺伝子）中の任意の標的ポリヌクレオチド配列を編集するように指示され得る。ガイドRNA配列は、編集が所望される細胞においてアデノシン塩基エディタータンパク質と共発現させることができる。ANGPTL3タンパク質をコードする遺伝子を編集するために、遺伝子を本明細書に記載の系と接触させる。標的遺伝子中の標的ポリヌクレオチド配列は、本明細書に開示される単一のガイドRNA、及びアデノシン塩基エディタータンパク質又はアデノシン塩基エディタータンパク質をコードする核酸配列と接触させることができ、ここで、単一のガイドRNAは、アデノシン塩基エディタータンパク質に、標的遺伝子（例えば、ANGPTL3をコードする標的遺伝子）における改変をもたらすように指示する。標的ポリヌクレオチド配列は、細胞のゲノムDNA中の遺伝子座であり得る。細胞は、培養された細胞であり得る。細胞は、インビボ、インビトロ、又はエクスピボであり得る。

30

40

【0185】

50

[0229]本明細書で提供される塩基エディター系は、プログラマブルDNA結合タンパク質と、デアミナーゼと、を含み得る。本明細書で使用される場合、デアミナーゼは、分子からのアミン基の除去、又は例えば加水分解による脱アミノ化を触媒する酵素を指し得る。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、シチジンデアミナーゼであり、それぞれ、シチジン(C)のウリジン(U)への脱アミノ化、デオキシシチジン(dC)のデオキシウリジン(dU)への脱アミノ化、又は5-メチルシチジンのチミジン(T、5-メチル-U)への脱アミノ化を触媒する。その後のDNA修復機構は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるKomor et al, Nature, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, 533, 420-424 (2016)に記載されるように、dUがTによって置き換えられることを確実にする。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であり、シトシンのウラシルへの変換(例えば、RNA中)又はチミンへの変換(例えば、DNA中)を触媒し、促進する。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、アデノシンデアミナーゼであり、アデニンのグアニンへの変換を触媒し、促進する。いくつかの実施形態では、デアミナーゼは、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、サル、ウシ、イヌ、ラット、又はマウスなどの生物由来の天然に存在する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、生物由来の天然に存在するデアミナーゼのバリエーションであり、バリエーションは、天然には存在しない。例えば、いくつかの実施形態では、デアミナーゼ又はデアミナーゼドメインは、生物由来の天然に存在するデアミナーゼに対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、又は少なくとも99.5%同一である。

10

20

30

40

50

[0186]

[0230]シチジンデアミナーゼ(又はシトシンデアミナーゼ)は、化学反応「シトシン+H₂O→ウラシル+NH₃」又は「5-メチル-シトシン+H₂O→チミン+NH₃」を触媒する酵素を含む。遺伝子の文脈では、そのようなヌクレオチドの変更、又は変異は、ひいてはタンパク質のアミノ酸の変更を引き起こす場合があり、これは、タンパク質の機能、例えば、機能の喪失又は機能の獲得に影響を及ぼし得る。その後のDNA修復機構は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるKomor et al. (Nature, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, 533, 420-424 (2016))に記載されるように、DNA中のウラシル塩基がTによって置き換えられることを確実にする。

[0187]

[0231]シトシンデアミナーゼの1つの例示的な好適なクラスは、制御された有益な方法で変異誘発を開始するのに役立つ11個のタンパク質を包含するシトシンデアミナーゼのアポリポタンパク質B mRNA編集複合体(APOBEC)ファミリーである。アポリポタンパク質B編集複合体3(APOBEC3)酵素は、逆転写ウイルスssDNA中のシトシンの脱アミノ化を介して、ある特定のHIV-1株に対するヒト細胞の保護を提供する。これらのシトシンデアミナーゼは全て、触媒活性のためにZn配位モチーフ(His-X-Glu-X₂-26-Pro-Cys-X₂-4-Cys(配列番号29))及び結合した水分子を必要とする。グルタミン酸残基は、脱アミノ化反応における求核性攻撃のために、水分子を水酸化亜鉛へと活性化するように作用する。各ファミリーメンバーは、それ自体の特定の「ホットスポット」、例えば、hAIDの場合はWRC(WはA又はTであり、RはA又はGである)、又はhAPOBEC3Fの場合はTTCで優先的に脱アミノ化する。APOBEC3Gの触媒ドメインの最近の結晶構造は、6個のα-ヘリックスに隣接する5本鎖のβ-シートコアを含む二次構造を明らかにしており、これはファミリー全体にわたって保存されていると考えられている。活性な中心ループは、s

sDNA結合及び「ホットスポット」アイデンティティの決定の両方に関与することが示されている。これらの酵素の過剰発現は、ゲノムの不安定性及びがんに関連しているため、配列特異的標的化の重要性を強調している。別の好適なシトシンデアミナーゼは、活性化誘導シチジンデアミナーゼ(AID)であり、これは、ssDNA中のシトシンを転写依存性の鎖バイアス様式でウラシルに変換することによって、抗体の成熟に関与する。

【0188】

[0232]アデノシンデアミナーゼ(又はアデニンデアミナーゼ)は、それぞれアデノシン又はデオキシアデノシンからのイノシン又はデオキシイノシンへの加水分解脱アミノ化を触媒する酵素を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、デオキシリボ核酸(DNA)におけるアデニン又はアデノシンの加水分解脱アミノ化を触媒する。本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼ(例えば、操作されたアデノシンデアミナーゼ、進化したアデノシンデアミナーゼ)は、細菌などの任意の生物由来であり得る。いくつかの実施形態では、デアミナーゼ又はデアミナーゼドメインは、生物からの天然に存在するデアミナーゼのバリエーションである。いくつかの実施形態では、デアミナーゼ又はデアミナーゼドメインは、天然に生じない。例えば、いくつかの実施形態では、デアミナーゼ又はデアミナーゼドメインは、天然に存在するデアミナーゼに対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、又は少なくとも99.5%同一である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、*E. coli*、*S. aureus*、*S. typhi*、*S. putrefaciens*、*H. influenzae*、又は*C. crescentus*などの細菌由来である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、TadAデアミナーゼである。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、*E. coli* TadAデアミナーゼである。いくつかの実施形態では、TadAデアミナーゼは、切断型*E. coli* TadAデアミナーゼである。例えば、切断型ecTadAは、全長ecTadAに対して、1つ以上のN末端アミノ酸を欠失し得る。いくつかの実施形態では、切断型ecTadAは、全長ecTadAに対して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、6、17、18、19、又は20個のN末端アミノ酸残基を欠失し得る。いくつかの実施形態では、切断型ecTadAは、全長ecTadAに対して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、6、17、18、19、又は20個のC末端アミノ酸残基を欠失し得る。いくつかの実施形態では、ecTadAデアミナーゼは、N末端メチオニンを含まない。

【0189】

[0233]いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、配列番号747に示されるアミノ酸配列に対して、又は本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかに対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、又は少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。本明細書に提供されるアデノシンデアミナーゼが、1つ以上の変異(例えば、本明細書に提供される変異のいずれか)を含み得ることを理解すべきである。本開示は、ある特定の同一性パーセント、加えて、本明細書に記載の変異のいずれか又はそれらの組み合わせを有する、任意のデアミナーゼドメインを提供する。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、配列番号747に示されるアミノ酸配列、又は本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかと比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、21、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50個、又はそれより多くの変異を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、配

列番号 747 に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つ、又は本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼのうちのいずれかと比較して、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 35、少なくとも 40、少なくとも 45、少なくとも 50、少なくとも 60、少なくとも 70、少なくとも 80、少なくとも 90、少なくとも 100、少なくとも 110、少なくとも 120、少なくとも 130、少なくとも 140、少なくとも 150、少なくとも 160、又は少なくとも 170 個の同一の連続アミノ酸残基を有するアミノ酸配列を含む。追加の例示的なアデノシンデアミナーゼは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる PCT 出願公開第 WO 2021 / 207712 号に見出すことができる。

【0190】

[0234] いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターは、表 2 又は表 4 に列挙されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、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%、少なくとも 99.5%、少なくとも 99.7%、又は少なくとも 99.9% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターは、表 2 又は表 4 に列挙されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターの配列は、表 2 又は表 4 に列挙されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つである。いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターは、配列番号 688、691、695、702、705、707、718、720、722、724、726、728 及び 730 のアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、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%、少なくとも 99.5%、少なくとも 99.7%、又は少なくとも 99.9% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターは、配列番号 688、691、695、702、705、707、718、720、722、724、726、728 及び 730 のアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターの配列は、配列番号 688、702、718、720、722、724、726、728 及び 730 のアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つである。

【0191】

[0235] いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターは、表 2 又は表 4 に列挙されるポリヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、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%、少なくとも 99.5%、少なくとも 99.7%、又は少なくとも 99.9% 同一であるポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターは、表 2 又は表 4 に列挙されるポリヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つによってコードされる。いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターは、表 2 又は表 4 に列挙されるポリヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、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%、少なくとも 99.5%、少なくとも 99.7%、又は少なくとも 99.9% 同一であるポリヌクレオチド配列によって発現される。いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターは、表 2 又は表 4 に列挙されるポリヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つによって発現される。いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターは、配列番号 687、690、694、701、704、706、717、719、721、723、725、727、及び 729 のポリヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少な

くとも90%、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%、少なくとも99.5%、少なくとも99.7%、又は少なくとも99.9%同一のものを含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターは、配列番号687、690、694、701、704、706、717、719、721、723、725、727、及び729のポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つを含むポリヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、アデニン塩基エディターは、配列番号687、701、717、719、721、723、725、727、及び729のポリヌクレオチド配列のうちのいずれか1つによってコードされる。

【0192】

プライム編集

[0236]開示される遺伝子編集系は、プライム編集CRISPR系又はその構成要素を包含し得る。プライム編集は、CRISPR系の変形であり、標的化ゲノム位置にCas9を導くこと、及びDNAゲノムに新しい配列をコピーするためのRNAテンプレートとして機能することの2つの目的を果たすように、ガイドRNAの責任を拡張したものである(Anzalone AV et al., Nature volume 576, pages 149–157 (2019))。CRISPRと同様に、プライム編集は、触媒改変Casエンドヌクレアーゼ及び単一のガイドRNAの存在を必要とする。Cas9エンドヌクレアーゼは、二本鎖切断を生成するのではなく、DNAをニッキングするCas9ニッカーゼであるように触媒改変される。Cas9ニッカーゼは、逆転写酵素に融合される。プライム編集ガイドRNA(pegRNA)は、標準的なsgRNAよりもかなり大きい。pegRNAは、プライマー結合配列(PBS)を有するsgRNAであり、3'末端に付加された所望のRNA配列を含有するテンプレートである。プライム編集に関する更なる情報は、その全体が本明細書に組み込まれる公開されたPCT出願第WO2020/191245A1号に見出すことができる。

【0193】

[0237]本明細書に開示されるハイブリッドガイド遺伝子編集系は、ポリメラーゼを含み得る。ポリメラーゼは、既存の核酸をテンプレートとして使用して、核酸鎖の重合を触媒するように機能する。有用なポリメラーゼの例としては、DNAポリメラーゼ及びRNAポリメラーゼが挙げられる。ポリメラーゼは、核酸プログラマブルヌクレオチド結合ドメイン又は核酸プログラマブルDNA結合タンパク質(例えば、融合タンパク質の形態であるか、又はハイブリッドガイド核酸配列とトランスで結合又は会合している)とともに機能し得る。ポリメラーゼは、RNA依存性DNAポリメラーゼ(例えば、逆転写酵素)又はDNA依存性DNAポリメラーゼ(例えば、Pol I、Pol II、若しくはPol IIIを含む原核生物ポリメラーゼ、又はPol a、Pol b、Pol g、Pol d、Pol e、若しくはPol zを含む真核生物ポリメラーゼ)であり得る。

【0194】

編集効率

[0238]本明細書に開示される遺伝子編集系は、低いオフターゲット編集効果で遺伝子編集において高い効率を達成することができる。例えば、本明細書に開示されるスペーサーにデオキシリボヌクレオチドを含有するモチーフ(複数可)を含むガイド核酸を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、全てのオフターゲット部位で10%未満の編集に影響を及ぼし得る。例えば、本明細書に開示されるスペーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、全てのオフターゲット部位で7%未満の編集に影響を及ぼし得る。本明細書に開示されるスペーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、全てのオフターゲット部位

10

20

30

40

50

で5%未満の編集に影響を及ぼし得る。本明細書に開示されるスパーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、全てのオフターゲット部位で2%未満の編集に影響を及ぼし得る。本明細書に開示されるスパーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、全てのオフターゲット部位で1%未満の編集に影響を及ぼし得る。本明細書に開示されるスパーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、全てのオフターゲット部位で10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、又は1%未満の編集に影響を及ぼし得る。

10

【0195】

[0239]本明細書に開示されるスパーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、標的遺伝子で少なくとも50%の編集に影響を及ぼし得る。本明細書に開示されるスパーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、標的遺伝子で少なくとも70%の編集に影響を及ぼし得る。本明細書に開示されるスパーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、標的遺伝子で50%を超える編集に影響を及ぼし得る。本明細書に開示されるスパーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、標的遺伝子で70%を超える編集に影響を及ぼし得る。本明細書に開示されるスパーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、標的遺伝子で90%を超える編集に影響を及ぼし得る。本明細書に開示されるスパーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、標的遺伝子で50%、60%、70%、80%、又は90%の編集に影響を及ぼし得る。本明細書に開示されるスパーサー配列にモチーフのうちのいずれかを含むガイド核酸配列を有する遺伝子編集系における遺伝子エディタータンパク質は、デオキシリボヌクレオチドを含まないガイド核酸配列を有する遺伝子編集系と比較して、標的遺伝子で50%、60%、70%、80%、又は90%を超える編集に影響を及ぼし得る。

20

30

40

【0196】

遺伝子エディタータンパク質

[0240]核酸結合ドメインを含む遺伝子エディタータンパク質が本明細書で提供される。核酸結合ドメインは、DNAに結合することができ得る。核酸結合ドメインは、RNAに結合することができ得る。核酸結合ドメインは、Cas9ドメインであり得る。「Cas9」という用語は、Cas9タンパク質、又はその断片（例えば、Cas9の活性、不活性、若しくは部分的に活性なDNA切断ドメイン、及び／又はCas9のgRNA結合ドメインを含むタンパク質）を含むRNAガイドヌクレアーゼを指す。Cas9ヌクレア

50

ーゼは、Casn1ヌクレアーゼ又はCRISPR（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）関連ヌクレアーゼとも称される。Cas9は、野生型の例示的なCas9ポリペプチド（例えば、S. pyogenes由来のCas9）に対して少なくとも又は少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性及び／又は配列類似性を有するポリペプチドを指し得る。Cas9は、野生型の例示的なCas9ポリペプチド（例えば、S. pyogenes由来）に対して最大で、又は最大で約50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性及び／又は配列類似性を有するポリペプチドを指し得る。Cas9は、欠失、挿入、置換、バリエーション、変異、融合、キメラ、又はそれらの任意の組み合わせなどのアミノ酸変更を含むことができる、Cas9タンパク質の野生型又は改変形態を指し得る。

10

【0197】

[0241]バリエーションCas9オルソログのCas9ヌクレアーゼ配列及び構造は、様々な種において説明されている。Cas9タンパク質又は他の構成要素の由来であり得る例示的な種としては、限定されないが、Streptococcus pyogenes、Streptococcus thermophilus、Streptococcus sp.、Staphylococcus aureus、Listeria innocua、Lactobacillus gasseri、Francisella novicida、Wolinella succinogenes、Sutterella wadsworthensis、Gamma proteobacterium、Neisseria meningitidis、Campylobacter jejuni、Pasteurella multocida、Fibrobacter succinogenes、Rhodospirillum rubrum、Nocardia opsis dassonvillei、Streptomyces pristinaespiralis、Streptomyces viridochromogenes、Streptomyces viridochromogenes、Streptosporangium roseum、Alicyclobacillus acidocaldarius、Bacillus pseudomycooides、Bacillus selenitireducens、Exiguobacterium sibiricum、Lactobacillus delbrueckii、Lactobacillus salivarius、Lactobacillus buchneri、Treponema denticola、Microscilla marina、Burkholderiales bacterium、Polaromonas naphthalenivorans、Polaromonas sp.、Crocosphaera watsonii、Cyanothecaceae sp.、Microcystis aeruginosa、Synechococcus sp.、Acetohalobium arabaticum、Ammonifex degensii、Caldicellulosiruptor beccarii、Candidatus Desulforudis、Clostridium botulinum、Clostridium difficile、Finegoldia magna、Natranaerobius thermophilus、Pelotomaculum thermopropionium、Acidithiobacillus caldus、Acidithiobacillus ferrooxidans、Allochromatium vinosum、Marinobacter sp.、Nitrosococcus halophilus、Nitrosococcus watsoni、Pseudoalteromonas haloplanktis、Ktedonobacter racemifer、Methanohalobium evestigatum、Anabaena variabilis、Nodularia spumigena、Nostoc sp.、Arthrospira maxima、Arthrospira platensis、Arthrospira sp.、Lyngbya sp.、Microcoleus chthonoplastes、Oscillatoria sp.、Petroglo-

20

30

40

50

a mobilis, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, 又は *Acarychloris marina* が挙げられる。いくつかの実施形態では、Cas9 タンパク質は、*Streptococcus pyogenes* 由来である。いくつかの実施形態では、Cas9 タンパク質は、*Streptococcus thermophilus* 由来であり得る。いくつかの実施形態では、Cas9 タンパク質は、*Staphylococcus aureus* 由来である。

【0198】

【0242】本開示に基づいて、追加の好適な Cas9 ヌクレアーゼ及び配列は、当業者には明らかであり、そのような Cas9 ヌクレアーゼ及び配列は、参照により本明細書に組み込まれる Chylinski et al., (2013) RNA Biology 10:5, 726-737 に開示されている生物及び遺伝子座からの Cas9 配列を含む。

【0199】

【0243】本明細書で提供される遺伝子編集系は、ヌクレアーゼ活性が減少又は無効化された遺伝子エディタータンパク質、例えば、Cas ヌクレアーゼを含み得る。例えば、Cas9 タンパク質は、ヌクレアーゼ不活性であり得るか、又は Cas9 ニッカーゼであり得る。不活性 DNA 切断ドメインを有する Cas9 タンパク質（又はその断片）を生成するための方法が既知である（例えば、Jinek et al., Science. 337:816-821 (2012); Qi et al., Cell. 28;152(5):1173-83 (2013) を参照されたい）。例えば、Cas9 の DNA 切断ドメインは、HNH ヌクレアーゼサブドメイン及び RuvC1 サブドメインの2つのサブドメインを含むことが既知である。HNH サブドメインは、gRNA に相補的な鎖を切断し、RuvC1 サブドメインは、非相補鎖を切断する。これらのサブドメイン内の変異は、Cas9 のヌクレアーゼ活性をサイレンシングすることができる。例えば、変異 D10A 及び H840A は、*S. pyogenes* Cas9 のヌクレアーゼ活性を完全に不活性化する（Jinek et al., Science. 337:816-821 (2012); Qi et al., Cell. 28;152(5):1173-83 (2013)）。本開示による使用に好適な Cas9 ニッカーゼは、活性 HNH ドメイン及び不活性 RuvC ドメインを有し、sgRNA によって結合される標的 DNA の鎖（これは、シチジン脱アミノ化を介して編集されている鎖の反対鎖である）のみを切断することができる。本開示の Cas9 ニッカーゼは、RuvC ドメインを不活性化する変異、例えば、D10A 変異を含み得る。RuvC ドメインを不活性化する任意の変異は、Cas9 ニッカーゼ、例えば、RuvC ドメインにおける挿入、欠失、又は単一若しくは複数のアミノ酸置換に含まれ得ることを理解されたい。本明細書に記載の Cas9 ニッカーゼでは、RuvC ドメインが不活性化されているが、HNH ドメインは活性化されたままである。したがって、Cas9 ニッカーゼは、RuvC ドメインを不活性化する変異（例えば、D10A）以外の変異を含み得るが、それらの変異は、HNH ドメインの活性には影響を及ぼさない。非限定的な Cas9 ニッカーゼの例では、位置 840 のヒスチジンは変化しないままである。

【0200】

【0244】Cas9 を不活性化する追加の好適な変異は、本開示及び当該分野の知識に基づいて当業者には明白であり、本開示の範囲内である。そのような追加の例示的な好適なヌクレアーゼ不活性 Cas9 ドメインとしては、限定されないが、D839A 及び／若しくは N863A（例えば、参照により本明細書に組み込まれる Prashant et al., Nature Biotechnology. 2013;31(9):833-838 を参照されたい）、又は K603R（例えば、参照により本明細書に組み込まれる Chavez et al., Nature Methods 12, 326-328, 2015 を参照されたい）が挙げられる。Cas9、dCas9、又は Cas9 バリエーション

はまた、任意の生物由来の Cas 9、dCas 9、又は Cas 9 バリエーションを包含する。また、任意の生物由来の dCas 9、Cas 9 ニッカーゼ、又は他の適切な Cas 9 バリエーションを、本開示に従って使用してもよいことも理解される。

【0201】

[0245] Cas 9 は、単細胞原核微生物のドメイン及び王国を構成する古細菌（例えば、ナノ古細菌）由来の Cas 9 であり得る。

【0202】

[0246] 遺伝子エディタータンパク質は、Cas X 若しくは Cas Y、又はそれらのバリエーションを含んでもよく、これらは、例えば、Burststein et al., Cell Res. 2017 Feb 21. doi: 10.1038/cr.2017.21 に記載されている。

【0203】

[0247] 遺伝子エディタータンパク質は、高忠実度 Cas 9 ドメインを含み得る。高忠実度 Cas 9 ドメインは、対応する野生型 Cas 9 ドメインと比較して、DNA の Cas 9 ドメインと糖リン酸骨格との間の静電相互作用を低下させる 1 つ以上の変異を含む操作された Cas 9 ドメインである。任意の特定の理論に拘束されることを望むものではないが、DNA の糖リン酸骨格との静電相互作用が減少した高忠実度 Cas 9 ドメインは、より少ないオフターゲット効果を有し得る。Cas 9 ドメインは、Cas 9 ドメインと DNA の糖リン酸骨格との間の会合を低下させる 1 つ以上の変異を含み得る。Cas 9 ドメインは、DNA の Cas 9 ドメインと糖リン酸骨格との間の会合を少なくとも 1 %、少なくとも 2 %、少なくとも 3 %、少なくとも 4 %、少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、又はそれより大きく低下させる 1 つ以上の変異を含み得る。本明細書に提供される Cas 9 のうちのいずれかは、野生型 Cas 9 アミノ酸配列又は別の Cas 9 内のアミノ酸において付番される場合の N497X、R661X、Q695X、及び／又は Q926X 変異のうちの 1 つ以上を含んでもよく、X は、任意のアミノ酸である。Cas 9 は、野生型 Cas 9 配列において提供されるアミノ酸配列の N497A、R661A、Q695A、及び／若しくは Q926A 変異、又は野生型 Cas 9 アミノ酸配列又は別の Cas 9 内の対応するアミノ酸において付番される場合の対応する変異のうちの 1 つ以上を含み得る。高忠実度を有する Cas 9 ドメインは、Kleinstiver, B. P., et al., Nature 529, 490-495 (2016)、及び Slaymaker, I. M., et al., Science 351, 84-88 (2015) に記載されており、各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0204】

[0248] 本明細書で提供される遺伝子編集系のうちのいずれかは、本明細書に記載の Cas 9 ドメインを改変して、高忠実度 Cas 9 ドメインを含む高忠実度遺伝子エディタータンパク質を生成することによって、高忠実度遺伝子編集系に変換され得ることを理解すべきである。高忠実度 Cas 9 ドメインは、ヌクレアーゼ不活性 Cas 9 ドメイン又は Cas 9 ニッカーゼドメインであり得る。

【0205】

[0249] 遺伝子エディタータンパク質は、1 つ以上のヌクレアーゼドメインを含み得る。本開示の遺伝子エディタータンパク質は、HNH 若しくは HNH 様ヌクレアーゼドメイン、RuvC 若しくは RuvC 様ヌクレアーゼドメイン、及び／又は HEPN スーパーファミリー様ヌクレアーゼを含み得る。HNH 又は HNH 様ドメインは、Mcra 様折り畳みを含み得る。HNH 又は HNH 様ドメインは、2 つの逆平行 β ストランド及び α -ヘリックスを含み得る。HNH 又は HNH 様ドメインは、金属結合部位（例えば、二価カチオン結合部位）を含み得る。HNH 又は HNH 様ドメインは、標的核酸の 1 つの鎖（例えば、crRNA 標的化鎖の相補鎖）を切断することができる。HNH 又は HNH 様ドメイン

を含むタンパク質は、エンドヌクレアーゼ、コリシン、制限エンドヌクレアーゼ、トランスポザーゼ、及びDNAパッケージング因子を含み得る。

【0206】

[0250] 遺伝子エディタータンパク質は、使用される特定のCRISPR系に応じて、Cas9タンパク質、Cpf1タンパク質、C2c1タンパク質、C2c2タンパク質、C2c3タンパク質、Cas3、Cas5、Cas7、Cas8、Cas10、又はそれらの複合体であり得る。遺伝子エディタータンパク質は、Cas9タンパク質又はCpf1タンパク質であり得る。遺伝子エディタータンパク質は、減少したヌクレアーゼ活性を有し得る。いくつかの事例では、遺伝子エディタータンパク質は、ニッカーゼであり、すなわち、標的核酸二本鎖の1つの鎖を切断するように改変され得る。遺伝子エディタータンパク質は、ヌクレアーゼ活性を有しないように、すなわち、標的核酸二本鎖の任意の鎖、又は標的核酸の任意の一本鎖を切断しないように改変され得る。減少したヌクレアーゼ活性を有するか、又はヌクレアーゼ活性を有しない遺伝子エディタータンパク質の例としては、限定されないが、HNHヌクレアーゼドメイン及び／又はRuvCヌクレアーゼドメインへの改変を有するCas9、並びにRuvCヌクレアーゼドメインへの改変を有するCpf1が挙げられる。そのような改変の非限定的な例としては、F. novicida Cpf1のRuvCヌクレアーゼドメインに対するD917A、E1006A及びD1225A、及びS. pyogenes Cas9の残基D10、G12、G17、E762、H840、N854、N863、H982、H983、A984、D986、及び／又はA987の変化、並びに他のCpf1及びCas9タンパク質におけるそれらの対応するアミノ酸残基を挙げることができる。

10

20

【0207】

[0251] 当該技術分野で既知のCas9の任意のバリエーションはまた、遺伝子エディタータンパク質であってもよい。いくつかの事例では、Cas9のバリエーションは、触媒不活性Cas9 (dCas9) である。dCas9は、2つのヌクレアーゼドメインに変異を有し得るため、ヌクレアーゼ活性を欠く場合がある。dCas9は、プログラブル配列特異的DNA結合タンパク質として機能し得る。dCas9を使用して、転写のプロセスを物理的に遮断し、特定の遺伝子をオフにするか、又はゲノム内の特定の部位に他のタンパク質をシャトルし得る。本明細書で使用される場合、「dCas」及び「dCasタンパク質」は互換的に使用され、触媒不活性CRISPR関連タンパク質を指す。いくつかの事例では、dCasタンパク質は、DNA切断ドメイン内に1つ以上の変異を含む。dCasタンパク質は、RuvCドメイン又はHN'Hドメイン内に1つ以上の変異を含み得る。dCasタンパク質は、RuvCドメイン及びHN'Hドメインの両方内に1つ以上の変異を含み得る。dCasは、野生型Cas分子の断片であり得る。dCasは、野生型Cas分子由来の機能ドメインを含んでいてもよく、機能ドメインは、Reelドメイン、ブリッジヘリックスドメイン、又はPAM相互作用ドメインから選択される。dCas分子のヌクレアーゼ活性は、対応する野生型Casのヌクレアーゼ活性と比較して、少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%減少させることができる。

30

【0208】

[0252] 好適なdCasは、野生型Casに由来し得る。Casは、I型、II型、又はIII型のCRISPR-Cas系に由来し得る。いくつかの事例では、好適なdCasタンパク質は、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、又はCas10分子に由来する。dCasは、Cas9分子に由来し得る。dCas9分子は、例えば、Cas9分子においてDNA切断ドメイン、例えば、ヌクレアーゼドメイン、例えば、RuvCドメイン及び／又はHNHドメインに点変異（例えば、置換、欠失、又は付加）を導入することによって得ることができる。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるJinek et al., Science (2012) 337: 816-21を参照されたい。例えば、RuvCドメイン及びHNHドメインに2つの点突然変異を導入することで、Cas9 sgRNA及びD

40

50

NA結合活性を保持しつつ、Cas9ヌクレアーゼ活性を減少させる。いくつかの事例では、RuvC及びHNH活性部位内の2つの点変異は、*S. pyogenes* Cas9分子のD10A及びH840A変異である。あるいは、*S. pyogenes* Cas9分子のD10及びH840を欠失させ、そのsgRNA及びDNA結合活性を維持しつつ、Cas9ヌクレアーゼ活性を無効化することができる。いくつかの事例では、RuvC及びHNH活性部位内の2つの点変異は、*S. aureus* Cas9分子のD10A及びN580A変異である。dCas9は、D10及び／又はN580での変異を含む*S. aureus* dCas9分子であり得る。dCas9は、D10A変異及び／又はN580A変異を含む*S. aureus* dCas9分子であり得る。dCas9は、*S. aureus* dCas9分子、任意のバリエーション若しくは変異体、又はそれらの任意の断片であり得る。

10

【0209】

【0253】同様の変異は、任意の他の天然に存在するCas9（例えば、他の種由来のCas9）又は操作されたCas9分子にも適用することができる。dCas9は、*Streptococcus pyogenes* dCas9分子、*Staphylococcus aureus* dCas9分子、*Campylobacter jejuni* dCas9分子、*Corynebacterium diphtheria* dCas9分子、*Eubacterium ventriosum* dCas9分子、*Streptococcus pasteurianus* dCas9分子、*Lactobacillus farciminius* dCas9分子、*Sphaerochaeta globus* dCas9分子、*Azospirillum* (株B510) dCas9分子、*Glucanacetobacter diazotrophicus* dCas9分子、*Neisseria cinerea* dCas9分子、*Roseburia intestinalis* dCas9分子、*Parvibaculum lavamentivorans* dCas9分子、*Nitratifractor salmuginis* (株DSM 16511) dCas9分子、*Campylobacter lari* (株CF89-12) dCas9分子、*Streptococcus thermophilus* (株LMD-9) dCas9分子、又はそれらの断片を含み得る。

20

【0210】

【0254】本明細書に開示される遺伝子エディタータンパク質は、改変され得る。そのような改変は、遺伝子エディタータンパク質への別のポリペプチドからのドメインの組み込み又は融合、又は遺伝子エディタータンパク質のドメインの別のポリペプチドのドメインとの置き換えを含み得る。例えば、改変遺伝子エディタータンパク質は、Cas9又はCpf1タンパク質由来の第1のドメインと、Cas9又はCpf1以外のタンパク質由来の第2のドメインと、を含有し得る。改変遺伝子エディタータンパク質にそのようなドメインを含めるための改変は、改変遺伝子エディタータンパク質に更なる活性を付与し得る。そのような活性としては、標的核酸（例えば、ヒストン）と会合するポリペプチドを改変する、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、DNA修復活性、DNA損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン化活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性、グリコシラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリスチル化活性、又は脱ミリスチル化活性）を含むことができる。

30

40

【0211】

【0255】遺伝子エディタータンパク質は、核酸配列（例えば、ゲノムDNA）に二本鎖切断又は一本鎖切断を導入することができる。核酸配列は、標的核酸であってもよい。遺伝子エディタータンパク質は、平滑末端切断部位を導入するか、又は粘着性末端、すなわ

50

ち、5'又は3'オーバーハングを有する切断部位を生成することができる。例えば、CpfIは、約4又は5ヌクレオチド（nt）5'オーバーハングを有する、ずれたDNA二本鎖切断を導入し得る。二本鎖切断は、細胞の内因性DNA修復経路（例えば、NHEJ又は代替非相同末端結合（A-NHEJ））を刺激し得る。NHEJは、相同テンプレートを必要とせずに、切断された標的核酸を修復することができる。これにより、標的核酸の欠失をもたらす得る。相同組換え（HR）は、相同テンプレートを用いて行うことができる。相同テンプレートは、標的核酸切断部位に隣接する配列と相同である配列を含み得る。標的核酸が遺伝子エディタータンパク質によって切断された後、切断部位を破壊することができる（例えば、その部位は、核酸標的化ポリヌクレオチド及び部位指向性ポリペプチドによる別のラウンドの切断にアクセス可能ではない場合がある）。

10

【0212】

【0256】遺伝子エディタータンパク質は、核酸結合ドメインを含むことができ、したがって、核酸に結合することができる。核酸は、DNA配列であり得る。DNA配列は、標的DNA配列であり得る。核酸結合ドメインは、DNA結合ドメインであり得る。

【0213】

【0257】任意のDNA結合ドメインを本明細書に開示される系でを使用することができる。DNA結合ドメインは、ジンクフィンガータンパク質を含み得る。ジンクフィンガータンパク質は、選択される標的部位に結合するように操作されるという点で、天然に存在しないものであり得る。Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416。操作されたジンクフィンガー結合ドメインは、天然に存在するジンクフィンガータンパク質と比較して、新規の結合特異性を有することができる。操作方法としては、限定されないが、合理的な設計及び様々な種類の選択が挙げられる。合理的な設計は、例えば、三重鎖（又は四重鎖）ヌクレオチド配列及び個々のジンクフィンガーアミノ酸配列を含むデータベースを使用することを含み、各三重鎖又は四重鎖ヌクレオチド配列は、特定の三重鎖又は四重鎖配列に結合するジンクフィンガーの1つ以上のアミノ酸配列と会合する。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、共同所有の米国特許第6,453,242号及び同第6,534,261号を参照されたい。

20

30

【0214】

【0258】ファージディスプレイ及び2つのハイブリッド系を含む例示的な選択方法は、米国特許第5,789,538号、同第5,925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号、同第6,410,248号、同第6,140,466号、同第6,200,759号、及び同第6,242,568号、並びにWO98/37186、WO98/53057、WO00/27878、WO01/88197、及びGB2,338,237に開示されている。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば、共同所有するWO02/077227に記載されている。

40

【0215】

【0259】本明細書に記載の系は、標的核酸への結合のためにメガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼ）DNA結合ドメインを使用することができる。天然に存在するメガヌクレアーゼは、15〜40個の塩基対切断部位を認識し、一般的に、LAGLIDADGファミリー、GIY-YIGファミリー、His-Cysトボックスファミリー、及びHNHファミリーといった4つのファミリーにグループ分けされる。例示的なホーミングエンドヌクレアーゼとしては、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII及びI-TevIIIが挙げられる。それらの認識配列は既知である。また、米国特許第5,420,03

50

2号、米国特許第6,833,252号、Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388、Dujon et al. (1989) Gene 82:115-118、Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127、Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228、Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180、Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353及びNew England Biolabsカタログを参照されたい。加えて、ホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼのDNA結合特異性は、非天然標的部位に結合するように操作することができる。例えば、Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905、Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962、Ashworth et al. (2006) Nature 441:656-659、Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66、米国特許公開第2007/0117128号を参照されたい。ホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、ヌクレアーゼ全体との関連で変化してもよく（すなわち、ヌクレアーゼが同族切断ドメインを含むように）、又は異種切断ドメインに融合されてもよい。

10

【0216】

【0260】本明細書に記載される方法及び組成物に使用されるヌクレアーゼのうちの1つ以上のDNA結合ドメインは、天然に存在するか又は操作された（天然に存在しない）TALエフェクターDNA結合ドメインを含む。例えば、参照によりその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,586,526号を参照されたい。

20

【0217】

デアミナーゼドメイン

【0261】本明細書に開示される遺伝子編集系は、デアミナーゼを含み得る。本明細書で使用される場合、「デアミナーゼ」は、分子からのアミン基の除去、又は例えば加水分解による脱アミノ化を触媒する酵素を指し得る。デアミナーゼは、シチジンデアミナーゼであってもよく、それぞれ、シチジン（C）のウリジン（U）への脱アミノ化、デオキシシチジン（dC）のデオキシウリジン（dU）への脱アミノ化、又は5-メチルシチジンのチミジン（T、5-メチル-U）への脱アミノ化を触媒する。その後のDNA修復機構は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるKomor et al, Nature, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, 533, 420-424 (2016)に記載されるように、dUがTによって置き換えられることを確実にする。デアミナーゼは、シトシンデアミナーゼであってもよく、シトシンのウラシルへの変換（例えば、RNA中）又はチミンへの変換（例えば、DNA中）を触媒し、促進する。デアミナーゼは、アデノシンデアミナーゼであってもよく、アデニンのグアニンへの変換を触媒し、促進する。デアミナーゼは、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、サル、ウシ、イヌ、ラット、又はマウスなどの生物由来の天然に存在するデアミナーゼであってもよい。デアミナーゼは、生物由来の天然に存在するデアミナーゼのバリエーションであってもよく、バリエーションは、天然には存在しない。例えば、デアミナーゼ又はデアミナーゼドメインは、生物由来の天然に存在するデアミナーゼに対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、又は少なくとも99.5%同一であり得る。

30

40

【0218】

【0262】シチジンデアミナーゼ（又はシトシンデアミナーゼ）は、化学反応「シトシン + H₂O → ウラシル + NH₃」又は「5-メチル-シトシン + H₂O → チミン + NH₃」

50

を触媒する酵素を含む。遺伝子の文脈では、そのようなヌクレオチドの変更、又は変異は、ひいてはタンパク質のアミノ酸の変更を引き起こす場合があり、これは、タンパク質の機能、例えば、機能の喪失又は機能の獲得に影響を及ぼし得る。その後のDNA修復機構は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるKomor et al. (Nature, 533, 420-424 (2016))に記載されるように、DNA中のウラシル塩基がTによって置き換えられることを確実にする。

【0219】

【0263】シトシンデアミナーゼの1つの例示的な好適なクラスは、制御された有益な方法で変異誘発を開始するのに役立つ11個のタンパク質を包含するシトシンデアミナーゼのアポリタンパク質B mRNA編集複合体(APOBEC)ファミリーである。アポリタンパク質B編集複合体3(APOBEC3)酵素は、逆転写ウイルスssDNA中のシトシンの脱アミノ化を介して、ある特定のHIV-1株に対するヒト細胞の保護を提供する。これらのシトシンデアミナーゼは全て、触媒活性のためにZn配位モチーフ(His-X-Glu-X₂₃₋₂₆-Pro-Cys-X₂₋₄-Cys)及び結合した水分子を必要とする。グルタミン酸残基は、脱アミノ化反応における求核性攻撃のために、水分子を水酸化亜鉛へと活性化するように作用する。各ファミリーメンバーは、それ自体の特定の「ホットスポット」、例えば、hAIDの場合はWRC(WはA又はTであり、RはA又はGである)、又はhAPOBEC3Fの場合はTTCで優先的に脱アミン化する。APOBEC3Gの触媒ドメインの最近の結晶構造は、6個のα-ヘリックスに隣接する5本鎖のβ-シートコアを含む二次構造を明らかにしており、これはファミリー全体にわたって保存されていると考えられている。活性な中心ループは、ssDNA結合及び「ホットスポット」アイデンティティの決定の両方に関与することが示されている。これらの酵素の過剰発現は、ゲノムの不安定性及びがんに関連しているため、配列特異的標的化の重要性を強調している。別の好適なシトシンデアミナーゼは、活性化誘導シチジンデアミナーゼ(AID)であり、これは、ssDNA中のシトシンを転写依存性の鎖バイアス様式でウラシルに変換することによって、抗体の成熟に関与する。

【0220】

【0264】アデノシンデアミナーゼ(又はアデニンデアミナーゼ)は、それぞれアデノシン又はデオキシアデノシンからのイノシン又はデオキシイノシンへの加水分解脱アミノ化を触媒する酵素を含む。アデノシンデアミナーゼは、デオキシリボ核酸(DNA)におけるアデニン又はアデノシンの加水分解脱アミノ化を触媒し得る。本明細書で提供されるアデノシンデアミナーゼ(例えば、操作されたアデノシンデアミナーゼ、進化したアデノシンデアミナーゼ)は、細菌などの任意の生物由来であり得る。デアミナーゼ又はデアミナーゼドメインは、生物からの天然に存在するデアミナーゼのバリエーションであり得る。デアミナーゼ又はデアミナーゼドメインは、天然に生じなくてもよい。例えば、デアミナーゼ又はデアミナーゼドメインは、天然に存在するデアミナーゼに対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、又は少なくとも99.5%同一であり得る。アデノシンデアミナーゼは、E. coli、S. aureus、S. typhi、S. putrefaciens、H. influenzae、又はC. crescentusなどの細菌由来であり得る。アデノシンデアミナーゼは、TadAデアミナーゼであってもよい。TadAデアミナーゼは、E. coli TadAデアミナーゼであってもよい。TadAデアミナーゼは、切断型E. coli TadAデアミナーゼであってもよい。例えば、切断型ecTadAは、全長ecTadAに対して、1つ以上のN末端アミノ酸を欠失し得る。切断型ecTadAは、全長ecTadAに対して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、6、17、18、19、又は20個のN末端アミノ酸残基を欠失し得る。切断型ecTadAは、全長ecTadAに対して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、6、17、18、19、又は20個のC末端アミノ

10

20

30

40

50

酸残基を欠失し得る。e c T a d Aデアミナーゼは、N末端メチオニンを含まなくてもよい。

【0221】

【0265】本明細書に提供されるアデノシンデアミナーゼが、1つ以上の変異を含み得ることを理解すべきである。例示的なアデノシンデアミナーゼ変異及びバリエーションは、特許出願第WO2018/119354に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本出願において有用な追加のアデノシンデアミナーゼは、当業者には明らかであり、かつ本開示の範囲内である。

【0222】

ガイド核酸

【0266】ガイドヌクレオチド配列は、単一のヌクレオチド分子として存在してもよく、(1) 標的核酸と相同性を共有し、ガイドヌクレオチド配列遺伝子エディタータンパク質の標的化遺伝子配列への結合を指示するドメイン、及び(2) ガイドヌクレオチド配列遺伝子エディタータンパク質に結合するドメインといった2つのドメインを含む。ドメイン(1)は、スパーサー配列を含み得る。ドメイン(2)は、tracrRNA配列又は改変tracrRNAなどの等価物と称され得る。ドメイン(2)は、ステムループ構造を含み得る。例えば、ドメイン(2)は、参照により本明細書に組み込まれるJinek et al., Science 337:816-821 (2012)において提供されるtracrRNAに対して同一又は相同であり得る。gRNAの他の例(例えば、ドメイン(2)を含むものは、米国特許出願公開第US2016/0208288号及び米国特許出願公開第US2016/0200779号において見出すことができ、これらの各々は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0223】

【0267】(例えば、ゲノムを改変するために)部位特異的切断のために、Cas9などのガイドヌクレオチド配列遺伝子エディタータンパク質を使用する方法は、当該技術分野で既知である(例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれるCong, L. et al., Science 339, 819-823 (2013); Mali, P. et al., Science 339, 823-826 (2013); Hwang, W. Y. et al., Nature biotechnology 31, 227-229 (2013); Jinek, M. et al., eLife 2, e00471 (2013); Dicarlo, J. E. et al., Nucleic acids research (2013); Jiang, W. et al., Nature biotechnology 31, 233-239 (2013)を参照されたい)。

【0224】

【0268】本明細書に開示される遺伝子編集系のガイド核酸は、DNA-RNAキメラガイド(すなわち、chRNA)を含み得る。chRNAは、単一のガイドRNAであってもよい。本明細書で使用される場合、「RNA」という用語は、リボヌクレオチド(RNA)とデオキシヌクレオチド(DNA)との混合物を含む核酸を指す。すなわち、RNAは、少なくとも1つのリボヌクレオチド及び少なくとも1つのデオキシヌクレオチドを含む。

【0225】

【0269】本明細書で使用される場合、「sgchRNA」、「sgRNA」、「単一のガイドchRNA」、及び「単一のガイドRNA」という用語は、互換的に使用され、スパーサー配列を含むポリヌクレオチドを指し、スパーサー配列は、標的核酸内の配列に相補的なDNA及びRNAヌクレオチドの混合物を含む。スパーサー配列は、少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチド及び少なくとも1つのリボヌクレオチドを含む。スパーサー配列のリボヌクレオチドのリボースは、改変され得る。例えば、リボースは、メチル基に共有結合した2'-ヒドロキシル基(2'-O-メチル)を含み得る。

【0226】

【0270】本明細書で使用される場合、「sgRNA」、「sgRNA」、「単一のガイ

ドRNA」、及び「単一のガイドRNA」という用語は、互換的に使用され、スパーサー配列を含むポリヌクレオチドを指し、スパーサー配列は、標的核酸内の配列に相補的なRNAのみを含む。スパーサー配列は、リボヌクレオチドのみを含む。スパーサー配列のリボヌクレオチドのリボースは、改変され得る。例えば、リボースは、メチル基に共有結合した2'ヒドロキシル基(2'-O-メチル)を含み得る。

【0227】

【0271】本明細書に開示されるガイド核酸は、例えば、デオキシリボヌクレオチド-デオキシリボヌクレオチド-リボヌクレオチド-デオキシリボヌクレオチド-デオキシリボヌクレオチド(dN-dN-N-dN-dN)モチーフを含み得る。本明細書に開示されるガイド核酸は、別の例では、デオキシリボヌクレオチド-デオキシリボヌクレオチド-リボヌクレオチド-デオキシリボヌクレオチド-デオキシリボヌクレオチド-デオキシリボヌクレオチド(dN-dN-N-dN-dN-dN)モチーフを含み得る。ガイド核酸は、スパーサー配列を含む。スパーサー配列は、少なくとも1個のデオキシリボヌクレオチドを含む。スパーサー配列は、1~10個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、1~9個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、1~8個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、1~7個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、1~6個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、1~5個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、1~4個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、1~3個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、1個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、2個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、3個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、4個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、5個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、6個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、7個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、8個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、9個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、10個のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。

【0228】

【0272】リボヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドに置き換えることができる位置は、スパーサー配列の5'末端から、位置3、位置4、位置5、位置6、位置7、位置8、位置9、位置10、位置11、位置12、位置13、位置14、位置15、位置16、位置17、位置18、位置19、又は位置20を含み得る。いくつかの事例では、デオキシリボヌクレオチドは、スパーサー配列の5'末端から位置3、4、6、7及び／又は8に位置する。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置3、4、6、及び7にデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置3及び4にデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置6及び7にデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置3、4、6、7及び8にデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置4、5、6、7、9、10、13、及び14にデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置3、4、5、6及び7にデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置3、4、6、及び7にデオキシリボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置3、4、6、7、8及び9にデオキシリボヌクレオチドを含み得る。

【0229】

【0273】本明細書に開示されるスパーサー配列は、少なくとも1つの改変リボヌクレオチドを含み得る。例えば、リボヌクレオチドは、2'ヒドロキシル基がメチル基に共有結合するように(すなわち、2'-O-メチル)改変され得る。スパーサー配列は、1~3個の改変リボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、1~2個の改変リボヌクレオ

チドを含み得る。スパーサー配列は、1個の改変リボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、2個の改変リボヌクレオチドを含み得る。スパーサー配列は、3個の改変リボヌクレオチドを含み得る。いくつかの事例では、スパーサー配列は、改変リボヌクレオチドを有していない。スパーサー配列は、非改変リボヌクレオチドのみを有し得る。スパーサー配列は、非改変リボヌクレオチド及び2'-デオキシリボヌクレオチドのみを有し得る。改変リボヌクレオチドは、スパーサー配列の5'末端に位置し得る。改変リボヌクレオチドは、スパーサー配列の5'末端から位置1、2、及び3に位置し得る。改変リボヌクレオチドは、スパーサー配列の5'末端から位置1、3、及び4に位置し得る。改変リボヌクレオチドは、スパーサー配列の5'末端から位置1及び2に位置し得る。改変リボヌクレオチドは、スパーサー配列の5'末端から位置1及び3に位置し得る。改変リボヌクレオチドは、スパーサー配列の5'末端から位置2及び3に位置し得る。改変リボヌクレオチドは、スパーサー配列の5'末端から位置3及び4に位置し得る。改変リボヌクレオチドは、スパーサー配列の5'末端から位置1に位置し得る。

10

【0230】

[0274]いくつかの事例では、スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置1、2、及び3に位置する3個の改変リボヌクレオチドを有する。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置1、3、及び4に位置する3個の改変リボヌクレオチドを有し得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置1及び2に位置する2個の改変リボヌクレオチドを有し得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置1及び3に位置する2個の改変リボヌクレオチドを有し得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置2及び3に位置する2個の改変リボヌクレオチドを有し得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置3及び4に位置する2個の改変リボヌクレオチドを有し得る。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置1に位置する1個の改変リボヌクレオチドを有し得る。

20

【0231】

[0275]いくつかの事例では、スパーサー配列は、5個のデオキシリボヌクレオチドと、2個の2'-OMeリボヌクレオチドと、を含む。スパーサー配列は、スパーサー配列の5'末端から位置3、4、5、6、及び7に位置する5個のデオキシリボヌクレオチドと、スパーサー配列の5'末端から位置1及び2に位置する2個の2'-OMeリボヌクレオチドと、を含み得る。スパーサーは、スパーサー配列の5'末端から位置4、5、6、7、9、10、13、及び14に位置する8個のデオキシリボヌクレオチドと、スパーサー配列の5'末端から位置1、2、及び3に位置する3個の2'-OMeリボヌクレオチドと、を含み得る。スパーサーは、スパーサー配列の5'末端から位置3、4、6、及び7に位置する4個のデオキシリボヌクレオチドと、スパーサー配列の5'末端から位置1及び2に位置する2個の2'-OMeリボヌクレオチドと、を含み得る。スパーサーは、スパーサー配列の5'末端から位置3、4、6、7、及び8に位置する5個のデオキシリボヌクレオチドと、スパーサー配列の5'末端から位置1及び2に位置する2個の2'-OMeリボヌクレオチドと、を含み得る。

30

【0232】

[0276]スパーサー配列は、ホスホロチオエート骨格改変(PS)を更に含み得る。スパーサー配列は、少なくとも1個のホスホロチオエート骨格改変を含み得る。スパーサー配列は、少なくとも2個のホスホロチオエート骨格改変を含み得る。スパーサー配列は、少なくとも3個のホスホロチオエート骨格改変を含み得る。スパーサー配列は、2個又は3個のホスホロチオエート骨格改変を含み得る。スパーサーの5'末端のヌクレオチド残基は、ホスホロチオエート骨格改変を含み得る。ホスホロチオエート骨格改変は、スパーサー配列の5'末端から位置1と位置2との間にあり得る。ホスホロチオエート骨格改変は、スパーサー配列の5'末端から位置2と位置3との間にあり得る。ホスホロチオエート骨格改変は、スパーサー配列の5'末端から位置3と位置4との間にあり得る。スパーサー配列は、3個のホスホロチオエート骨格改変を含んでいてもよく、ホスホロチオエート骨格改変は、スパーサー配列の5'末端から位置1と位置2との間、位置2と位置3と

40

50

の間、及び位置 3 と位置 4 との間に位置する。スペーサー配列は、2 個のホスホロチオエート骨格改変を含んでいてもよく、ホスホロチオエート骨格改変は、スペーサー配列の 5' 末端から位置 1 と位置 2 との間及び位置 2 と位置 3 との間に位置する。

【0233】

[0277] スペーサー配列は、(2'-OMe)PS(2'-OMe)PS(DNA)PS(DNA)(RNA)(DNA)(DNA)(DNA)モチーフを含み得る。スペーサー配列は、(2'-OMe)PS(2'-OMe)PS(DNA)PS(DNA)(RNA)(DNA)(DNA)モチーフを含み得る。スペーサー配列は、(2'-OMe)PS(2'-OMe)PS(DNA)PS(DNA)(DNA)(DNA)(DNA)モチーフを含み得る。スペーサー配列は、(2'-OMe)PS(2'-OMe)PS(DNA)PS(DNA)(RNA)(DNA)(DNA)(DNA)(DNA)モチーフを含み得る。本明細書で使用される場合、「2'-OMe」は、RNA のリボースの 2' ヒドロキシル基がメチル基に共有結合している改変 RNA を指し、「RNA」は、非改変 RNA を指し、「DNA」は、非改変 DNA を指す。

【0234】

[0278] スペーサー配列は、配列番号 30 若しくは 31 を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。スペーサー配列は、配列番号 30 若しくは 31 の少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。スペーサー配列は、配列番号 28 若しくは 29 を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。スペーサー配列は、配列番号 28 若しくは 29 の少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。スペーサー配列は、配列番号 11 若しくは 12 を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。スペーサー配列は、配列番号 11 若しくは 12 の少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。スペーサー配列は、配列番号 26 若しくは 27 を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。スペーサー配列は、配列番号 26 若しくは 27 の少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。スペーサー配列は、配列番号 41 を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。スペーサー配列は、配列番号 41 の少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。

【0235】

[0279] 本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸は、配列番号 110、111、112、又は 113 を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸は、配列番号 110、111、112、又は 113 の少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸は、配列番号 106、107、108、又は 109 を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸は、配列番号 106、107、108、又は 109 の少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含んでいてもよく、又はそれらからなっているいてもよい。本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸

は、配列番号 79、80、81、又は 82 を含んでいてもよく、又はそれらからなっているてもよい。本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸は、配列番号 79、80、81、又は 82 の少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含んでいてもよく、又はそれらからなっているてもよい。本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸は、配列番号 102、103、104、又は 105 を含んでいてもよく、又はそれらからなっているてもよい。本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸は、配列番号 102、103、104、又は 105 の少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含んでいてもよく、又はそれらからなっているてもよい。本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸は、配列番号 79、80、又は 82 を含んでいてもよく、又はそれらからなっているてもよい。本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸は、配列番号 79、80、又は 82 の少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含んでいてもよく、又はそれらからなっているてもよい。本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸は、配列番号 132 を含んでいてもよく、又はそれらからなっているてもよい。本明細書に開示されるスペーサー配列を含むガイド核酸は、配列番号 132 の少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 100% の配列同一性又は配列類似性を有する配列を含んでいてもよく、又はそれらからなっているてもよい。

10

20

【0236】

【0280】本明細書に開示されるガイド核酸は、5' 末端にスペーサー配列、かつ 3' 末端に *tracrRNA* を含む単一のガイド核酸であり得る。*tracrRNA* は、改変され得る。例えば、*tracrRNA* のリボヌクレオチドのいくつかは、1 個以上の 2'-OMe 改変を有し得る。*tracr* 核酸（例えば、*tracrRNA*）は、約 50 ヌクレオチド〜約 150 ヌクレオチドの長さを有し得る。

【0237】

【0281】*tracrRNA* 配列は、1 個より多い二本鎖領域（例えば、ヘアピン、ハイブリダイゼーションされた領域）を含み得る。*tracrRNA* 配列は、2 個の二本鎖領域を含み得る。*tracrRNA* は、二次構造を含み得る。*tracrRNA* は、1 個より多い二次構造を含有し得る。*tracrRNA* 配列は、第 1 の二次構造及び第 2 の二次構造を含んでいてもよく、第 1 の二次構造は、第 2 の二次構造よりも多くのヌクレオチドを含む。*tracrRNA* は、第 1 の二次構造、第 2 の二次構造、及び第 3 の二次構造を含んでいてもよく、上述の第 1 の二次構造は、上述の第 2 の二次構造よりも少ないヌクレオチドを含み、上述の第 2 の二次構造は、上述の第 3 の二次構造よりも多いヌクレオチドを含む。二次構造の数及び対応するヌクレオチド長は、特に限定されない。

30

【0238】

【0282】天然に存在する V 型の CRISPR 系は、II 型の CRISPR 系とは異なり、*crRNA* の成熟及び標的核酸の切断のために *tracrRNA* を必要としない。*tracrRNA* は、改変されてもよい（例えば、2-OMe 改変）。*tracrRNA* は、GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCGUAGUCGUAUACAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUsususu の配列であり得る。*tracrRNA* は、gUUUUAGagcuaGaaauagcaAGUUAaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcusususu の配列であり得る。

40

【0239】

【0283】標的核酸は、DNA、RNA、又はそれらの組み合わせを含んでもよく、二本鎖核酸又は一本鎖核酸であり得る。スペーサー配列は、使用される特定の遺伝子エディタータンパク質に応じて、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の 5' 又は 3' に位置す

50

る標的核酸にハイブリダイズすることができる。PAMは、使用される遺伝子エディタータンパク質に応じて変化し得る。例えば、*S. pyogenes*由来のCas9を使用する場合、PAMは、配列5' - NRR - 3'を含む標的核酸内の配列であってもよく、Rは、A又はGのいずれかであってもよく、Nは、任意のヌクレオチドであり、Nは、標的化領域配列によって標的化される標的核酸配列のすぐ3'である。遺伝子エディタータンパク質は、非改変遺伝子エディタータンパク質について、PAMがPAMと比較して異なっているように改変され得る。例えば、*S. pyogenes*由来のCas9を使用する場合、Cas9は、PAMがもはや配列5' - NRR - 3'を含まず、代わりに配列5' - NNR - 3'を含むように改変されてもよく、Rは、A又はGのいずれかであってもよく、Nは、任意のヌクレオチドであり、Nは、スペーサー配列によって標的化される標的核酸配列のすぐ3'である。他の遺伝子エディタータンパク質は、他のPAMを認識してもよく、当業者は、任意の特定の遺伝子エディタータンパク質についてPAMを決定することができる。例えば、*Francisella novicida*由来のCpf1は、5' - TTN - 3' PAMを有すると特定された(Zetsche et al. (Cell; 163(3): 759-71(2015))) が、このことは、インビボでの標的核酸の部位特異的切断を裏付けることができなかった。5' - TTTN - 3' PAMを利用する、*Acidaminococcus* sp. BV3L6由来のCpf1などの*Francisella novicida*と他のCpf1タンパク質との間のガイド配列の類似性を考慮すると、*Francisella novicida* Cpf1タンパク質が、Zetsche et al.によって誤って特定された切断5' - TTN - 3' PAMに近接する標的核酸上の部位よりも大きな特異性及び活性で5' - TTTN - 3' PAMに近接する標的核酸上の部位を認識し、切断する可能性がより高い。本出願に記載のポリヌクレオチド及びCRISPR系を、5' - TTTN - 3' PAMに近接する標的核酸上の部位に指向するCpf1タンパク質(例えば、*Francisella novicida*由来)とともに使用し得る。

【0240】

【0284】標的核酸配列は、20個のヌクレオチドであってもよい。標的核酸は、20個未満のヌクレオチドであってもよい。標的核酸は、少なくとも5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30個、又はそれより多くのヌクレオチドを含み得る。標的ヌクレオチドは、約5〜30の範囲、及びその範囲のヌクレオチドを含み得る。特定のPAMの選択は、所与の事例で使用される特定の遺伝子エディタータンパク質に基づいて、当業者の知識の範囲内である。

【0241】

【0285】同じ鎖上にDNA及びRNAを含む本開示のスペーサー配列は、化学合成されてもよい。ポリヌクレオチドの化学合成は、当業者によってよく理解される。本開示のポリヌクレオチドの化学合成は、溶液中又は固体支持体上で行うことができる。固相合成は、早期評価のためのガイドRNAを作製する好ましい方法である。

【0242】

【0286】DNAを含有するガイド核酸は、DNAなどの標的化標的核酸の特異性の増加という利点を提供し得る。任意の特定の理論に拘束されないが、本明細書で考察されるような特定の領域内のDNAを含むスペーサー配列は、スペーサー内の局所的な構造攪乱によるオフターゲット結合を減少させ、オフターゲット部位結合を少なくするという利点を提示する。

【0243】

【0287】本開示のスペーサー配列はまた、例えば、ポリヌクレオチドの安定性を増加させる改変を含み得る。そのような改変は、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネート、例えば、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホラミデート及びアミノアルキルホスホラミデートを含むホスホラミデート、ホスホロジアミデ

ート、チオノホスホラミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、及び通常の 3' - 5' 結合を有するボラノホスフェート、2 - 5' 結合類似体、並びに 1 つ以上のヌクレオチド間結合が 3' - 3'、5' - 5'、又は 2' - 2' 結合である逆転した極性を有するものを含み得る。反転した極性を有する好適な核酸標的化ポリヌクレオチドは、最も 3' 末端のヌクレオチド間結合に単一の 3' - 3' 結合を含み得る（すなわち、核酸塩基が欠損しているか、又はその代わりにヒドロキシル基を有する単一の反転したヌクレオチド残基）。様々な塩（例えば、塩化カリウム又は塩化ナトリウム）、混合塩、及び遊離酸形態も含まれ得る。

【0244】

[0288] スペーサー配列のデオキシヌクレオチド又はヌクレオチド上のデオキシリボース又はリボース（すなわち、糖部分）は、改変され得る。改変糖部分の例としては、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル、2' - O - アミノエチル、2' - フルオロ、N 3' → P 5' ホスホラミデート、2' ジメチルアミノオキシエトキシ、2' 2' ジメチルアミノエトキシエトキシ、2' - グアニジニウム、2' - O - グアニジニウムエチル、カルバメート改変糖、及び二環式改変糖が挙げられるが、これらに限定されない。2' - O - メチル又は 2' - O - メトキシエチル改変は、オリゴヌクレオチド中の A 型又は RNA 様コンフォメーションを促進し、RNA への結合親和性を増加させ、ヌクレアーゼ耐性を増強した。改変糖部分はまた、余分な架橋結合（例えば、ロックド核酸中のリボースの 2' - O 及び 4' - C 原子を接続するメチレン架橋）又はモルホリン環などの糖類似体（例えば、ホスホロジアミデートモルホリンのような）を有するものを含み得る。そのような類似体及び／又は改変残基の例としては、ジアミノプリン、5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - （カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ - D - ガラクトシルケオシン、イノシン、N 6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N 6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、ベータ - D - マンノシルケオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸（v）、ワイプトキソシン、シュードウラシル、ケオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - （3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル）ウラシル、（acp3）w、2, 6 - ジアミノプリン、メチルホスホネート、キラル - メチルホスホネート、2' - O - メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸（PNA）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0245】

[0289] 本開示のスペーサー配列はまた、他の核酸、又は核酸類似体を含み得る。核酸類似体の一例は、ペプチド核酸（PNA）である。

【0246】

リンカー

[0290] 本明細書で提供される遺伝子編集系は、遺伝子編集系の 1 つ以上の構成要素を接続するリンカーを含み得る。リンカーを使用して、本明細書に記載のタンパク質又はタンパク質ドメインのうちのいずれかを連結し得る。リンカーは、共有結合と同じくらい単純であってもよい、又は長さが多くの原子の高分子リンカーであってもよい。リンカーは、ポリペプチドであってもよく、又はアミノ酸に基づくものであってもよい。リンカーは、ペプチド様ではなくてもよい。リンカーは、炭素結合、ジスルフィド結合、炭素 - ヘテロ原子結合などであり得る。リンカーは、アミド結合の炭素 - 窒素結合であり得る。リンカーは、環式又は非環式、置換又は非置換、分岐状又は非分岐の脂肪族又は複素脂肪族

リンカーであり得る。リンカーは、ポリマー（例えば、ポリエチレン、ポリエチレングリコール、ポリアミド、ポリエステルなど）であり得る。リンカーは、アミノアルカン酸のモノマー、ダイマー、又はポリマーを含み得る。リンカーは、アミノアルカン酸（例えば、グリシン、エタン酸、アラニン、ベーターアラニン、3-アミノプロパン酸、4-アミノブタン酸、5-ペンタン酸など）を含み得る。リンカーは、アミノヘキサン酸（A h x）のモノマー、ダイマー、又はポリマーを含み得る。リンカーは、炭素環式部分（例えば、シクロペンタン、シクロヘキサン）に基づき得る。リンカーは、ポリエチレングリコール部分（P E G）を含み得る。リンカーは、アミノ酸を含み得る。リンカーは、ペプチドを含み得る。リンカーは、アリアル又はヘテロアリアル部分を含み得る。リンカーは、フェニル環に基づき得る。リンカーは、ペプチドからリンカーへの求核剤（例えば、チオール、アミノ）の接続を容易にするための官能化部分を含み得る。任意の求電子剤をリンカーの一部として使用してもよい。例示的な求電子剤としては、限定されないが、活性化エステル、活性化アミド、ハロゲン化アルキル、ハロゲン化アリアル、ハロゲン化アシル、及びイソチオシアネートが挙げられる。

10

【0247】

【0291】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）であり得る。リンカーは、結合（例えば、共有結合）、有機分子、基、ポリマー、又は化学部分であり得る。リンカーは、5～100アミノ酸長、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、30～35、35～40、40～45、45～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～110、110～120、120～130、130～140、140～150、又は150～200アミノ酸長であり得る。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。リンカーは、X T E N リンカーとも称されるアミノ酸配列 S G S E T P G T S E S A T P E S を含み得る。リンカーは、アミノ酸配列 S G G S を含み得る。リンカーは、(S G G S) n、(G G G S) n、(G G G G S) n、(G) n、(E A A A K) n、(G G S) n、S G S E T P G T S E S A T P E S、又は(X P) nモチーフ、又はこれらのいずれかの組み合わせを含んでいてもよく、nは、独立して、1～30の整数であり、Xは、任意のアミノ酸である。いくつかの事例では、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15である。リンカーは、S G S E T P G T S E S A T P E S、S G G S S G S E T P G T S E S A T P E S S G G S を含み得る。リンカーは、S G G S S G G S S G S E T P G T S E S A T P E S S G G S S G G S を含み得る。リンカーは、G G S G G S P G S P A G S P T S T E E G T S E S A T P E S G P G T S T E P S E G S A P G S P A G S P T S T E E G T S T E P S E G S A P G T S T E P S E G S A P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S G G S G G S を含み得る。リンカーは、24アミノ酸長であってもよい。リンカーは、アミノ酸配列 S G G S S G G S S G S E T P G T S E S A T P E S を含み得る。リンカーは、40アミノ酸長であってもよい。リンカーは、アミノ酸配列 S G G S S G G S S G S E T P G T S E S A T P E S S G G S S G G S S G G S S G G S S G G S を含み得る。リンカーは、64アミノ酸長であってもよい。リンカーは、アミノ酸配列 S G G S S G G S S G S E T P G T S E S A T P E S S G G S S G G S S G G S S G G S S G G S S G S E T P G T S E S A T P E S S G G S S G G S S G G S S G G S S G G S S G G S S G G S S G S E T P G T S E S A T P E S S G P G T S T E P S E G S A P G S P A G S P T S T E E G T S T E P S E G S A P G T S T E P S E G S A P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S を含み得る。本明細書に提供されるリンカーのうちのいずれかを使用して、第1のアデノシンデアミナーゼ及び第2のアデノシンデアミナーゼ、デアミナーゼ（例えば、第1又は第2のアデノシンデアミナーゼ）及び遺伝子エディタータンパク質、遺伝子エディタータンパク質及びN L S、又はデアミナーゼ（例えば、第1又は第2のアデノシンデアミナーゼ）及びN L Sを連結し得ることを理解すべきである。

20

30

40

【0248】

50

【0292】特定の用途のためのデアミナーゼ活性のための最適な長さを達成するために、デアミナーゼ（例えば、操作された e c T a d A）と遺伝子エディタータンパク質（例えば、C a s 9 ドメイン）との間、及び／又は第 1 のアデノシンデアミナーゼと第 2 のアデノシンデアミナーゼとの間の（G G G G S）_n、（G G G G S）_n、及び（G）_nの形態の非常に柔軟なリンカーから、（E A A A K）_n、（S G G S）_n、及び（X P）_nの形態のより剛性のリンカーまでの範囲の）様々なリンカーの長さ及び柔軟性を使用することができる。いくつかの事例では、_nは、3～30の任意の整数である。いくつかの事例では、_nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15である。リンカーは、（G G S）_nモチーフを含んでもよく、_nは、1、3、又は7である。

10

【0249】

【0293】追加のリンカーは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる P C T 出願公開第 W O 2 0 2 1 / 2 0 7 7 1 2 号に見出すことができる。

【0250】

A N G P T L 3 遺 伝 子

【0294】本明細書に開示される系及び方法を使用した改変のための標的遺伝子は、A N G P T L 3 をコードする遺伝子であってもよい。A N G P T L 3 は、限定されないが、動脈硬化、アテローム性動脈硬化、心血管疾患、冠状動脈性心疾患、糖尿病（D i a b e t e s）、糖尿病（D i a b e t e s M e l l i t u s）、非インスリン依存性糖尿病、脂肪肝、高インスリン血症、高脂血症、高トリグリセリド血症、低ベータリポタンパク血症、炎症、インスリン抵抗性、代謝性疾患、肥満、口の悪性新生物、脂質代謝障害、唇及び口腔のがん腫、脂質異常症、メタボリックシンドローム X、低いトリグリセリド血症、オピッツ三角頭蓋症候群、虚血性卒中、高トリグリセリド血症の結果、家族性低ベータリポタンパク血症 2、家族性低ベータリポタンパク血症、及び虚血性脳血管事故などの疾患及び障害に関連付けられている。本明細書に記載の方法のいずれかを使用して A N G P T L 3 遺伝子を編集することを使用して、本明細書に記載の疾患及び障害の症状を治療、予防及び／又は緩和し得る。

20

【0251】

【0295】A N G P T L 3 遺伝子は、ヒトにおける高密度リポタンパク質（H D L）レベルの決定因子であるアンジオポエチン様 3 タンパク質をコードする。これは、血漿トリグリセリド及び H D L コレステロールと正の相関がある。A N G P T L 3 の活性は、主に肝臓において発現される。A N G P T L 3 は、脂質異常症と関連する。脂質異常症は、動脈の詰まり（アテローム性動脈硬化症）の発症に寄与する血液中の脂質レベルの上昇を特徴とする遺伝性疾患である。これらの脂質には、血漿コレステロール、トリグリセリド、又は高密度リポタンパク質が含まれる。脂質異常症は、心臓発作、卒中、又は他の循環器系の懸念のリスクを高める。現在の管理には、運動や食事の改変などのライフスタイルの変更、及びスタチンなどの脂質低下薬の使用が含まれる。非スタチン脂質低下薬物としては、胆汁酸捕捉剤、コレステロール吸収阻害剤、ホモ接合性家族性高コレステロール血症の薬物、フィブラート、ニコチン酸、オメガ-3 脂肪酸、及び／又は併用製品が挙げられる。治療選択肢は、通常、特定の脂質異常に依存するが、異なる脂質異常は、多くの場合、共存する。食事の変更を実施することが困難であり、脂質低下療法が効果的であることが証明されていないため、小児の治療は、より困難である。

30

40

【0252】

【0296】A N G P T L 3 はまた、低ベータリポタンパク血症を引き起こすことが既知である。低ベータリポタンパク血症は、世界中で 1000 名に 1 名から 3000 名に 1 名までに影響を及ぼす遺伝性疾患（常染色体劣性）である。低ベータリポタンパク質血症の一般的な症状としては、脂肪を吸収し、輸送する能力を損ない、網膜変性、神経障害、凝固障害、又は肝脂肪症と呼ばれる肝臓内の脂肪の異常な蓄積につながる可能性のある、5 パーセント未満の L D L コレステロール又はアポリポタンパク質 B の血漿レベルが含まれる。重篤な罹患した患者では、脂肪肝は、慢性肝疾患（肝硬変）へと進行する可能性が

50

ある。低ベータリポタンパク質血症の現在の治療としては、脂肪吸収を改良するために、長鎖脂肪酸を1日当たり15グラムに厳しく制限することが含まれる。低ベータリポタンパク質血症を有する乳児では、中鎖トリグリセリドを短時間補給することが有効であり得るが、肝毒性を回避するために量を綿密に監視しなければならない。低ベータリポタンパク質血症を治療するための別の選択肢は、神経学的合併症を予防するために高用量のビタミンEを投与することである。あるいは、プロトロンビン時間の上昇がビタミンKの枯渇を示唆する場合、ビタミンA（10,000～25,000IU/日）の補給が有効な場合がある。

【0253】

[0297] 本明細書に記載される系及び方法の標的組織は、肝臓組織であり得る。標的遺伝子は、ANGPTL3であってもよく、ANGPTL3は、アンジオポエチン5、ANGPT5、ANG-5、アンジオポエチン様タンパク質3、アンジオポエチン-5、FHL2、及びANL3とも称され得る。ANGPTL3は、lp31.3の細胞遺伝学的位置を有し、ゲノム座標は、位置62,597,487～62,606,159にある順方向ストランド上の染色体1上にある。

【0254】

[0298] 本明細書に記載の方法及び系を使用して、ANGPTL3遺伝子において作製され得る機能喪失変異も提供され、これには、早期終止コドン、不安定化変異、スプライシングの変化などが含まれるが、これらに限定されない。

【0255】

[0299] 本開示の遺伝子編集系は、細胞におけるANGPTL3遺伝子によってコードされる機能的ANGPTL3タンパク質の発現を減少させ得る。この改変は、コードされる機能的ANGPTL3タンパク質の発現を、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.9%、又は100%減少させ得る。この改変は、細胞におけるANGPTL3遺伝子によってコードされる機能的ANGPTL3タンパク質の発現を、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1000倍、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍、少なくとも4000倍、少なくとも5000倍、少なくとも6000倍、少なくとも7000倍、少なくとも8000倍、少なくとも9000倍、又は少なくとも10000倍減少させ得る。改変は、細胞におけるANGPTL3遺伝子によってコードされる機能的ANGPTL3タンパク質の発現を無効化することができる。

【0256】

[0300] 本明細書に開示される塩基編集系によって引き起こされるスプライス部位破壊は、ANGPTL3遺伝子によってコードされるメッセンジャーRNA（mRNA）中のイントロン配列の包含をもたらし得る。スプライス部位の破壊により、タンパク質活性を破壊する早期終止コドン又はアミノ酸の挿入／欠失をもたらすナンセンス、フレームシフト、又はフレーム内インデル変異を生成することができる。スプライス部位の破壊は、エキソン配列の除外をもたらすことができる。スプライス部位の破壊は、ANGPTL3転写産物におけるナンセンス、フレームシフト、又はフレーム内インデル変異をもたらすエキソン配列の除外をもたらすことができる。カノニカルスプライスドナーは、センス鎖上のDNA配列GTを含むが、一方で、カノニカルスプライスアクセプターは、DNA配列

A Gを含む。配列の変化は、正常なスプライシングを破壊する。スプライスドナーは、アンチセンス鎖の第2の位置における相補的塩基のアデニン塩基編集によって破壊することができ（G TからG C）、スプライスアクセプターは、センス鎖の第1の位置におけるアデニン塩基編集によって破壊することができる（A GからG G）。

【0257】

【0301】本明細書で提供される遺伝子編集系は、ANGPTL3遺伝子と接触したときに、ANGPTL3遺伝子のA・TからG・Cへの変化に影響を及ぼし得る。A・TからG・Cへの変化は、ANGPTL3遺伝子のスプライスドナー部位にあり得る。A・TからG・Cへの変化は、ANTPTL3遺伝子のスプライスアクセプター部位にあり得る。A・TからG・Cへの変化は、ANGPTL3遺伝子によってコードされる異常なANGPTL3転写産物をもたらし得る。A・TからG・Cへの変化は、ANGPTL3遺伝子によってコードされる非機能的ANGPTL3ポリペプチドをもたらし得る。A・TからG・Cへの変化は、ANGPTL3遺伝子のイントロン6のスプライスドナー部位の5'末端にあり得る。

10

【0258】

【0302】ヒトANGPTL3のヌクレオチド配列は、例えば、NG__028169.1に提供され、その全体が本明細書に組み込まれる。ヒトANGPTL3のタンパク質配列は、例えば、AAD34156.1に提供され、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0259】

【0303】マウス、ラット、及びサルANGPTL3核酸配列が寄託されており、例えば、それぞれEnsemblアクセッション番号ENSMUSG000000028553、ENSRNOG000000008638、及びENSMFAG000000007083を参照されたい（これらの配列の各々は、その全体が本明細書に組み込まれる）。

20

【0260】

【0304】ANGPTL3及びヒト起源のファミリーの他のメンバー及びいくつかの動物のポリペプチド及びコード核酸配列は、例えば、NCBIウェブサイト又はENSEMBLウェブサイトから公的に入手可能である。例としては、以下の配列が挙げられるが、これらに限定されず、これらの配列の各々は、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0261】

【0305】NG__028169.1ヒトアンジオポエチン様3（ANGPTL3）、染色体1上のRefSeqGene

30

AATGACAAACTGA AAAAATCTATTGTTTGTTATATATATA
ACAAAGAATTAGTATCCACAATATGTAAATAATTCCCTAAA
ATTAGTCAGAAAGAGACAAACTTAAAAAGAGGGGTAACAAG
GAGGGGAGCAAAATTATGTACATAACCAGATGATTTCGCAAA
GACGGCAACAGAGATGGCCAGCAAAACAAACTAGATATAT
ACTTGTCCTATTAGATTTATCAACATTTTTTTGCTTTTTTCA
TTAAAAAGCATTTGTAAAAAGGATATAGGAAAAAGAGGGAAC
TTCATATACTCCTGGCAGGGATGTAAATTGGGTACAACCCCT
TTGAAGGACAAATCTGACAAAAGCAATCGTAAGTTACAAAGT
CAACATCTATGAATGTATATGA AAAATAATTTATATACATAC
ATCACCCACCATAAAAAGCATTTTCTATACATACTGTTTATA
ATTAGAAAAATTGGAAACAAATGATTAAAAAGGGGGCTGATT
AAATTTAAGGTTTCATCTATATAACAGGATTATGCAGCTATT
AAAAAGGACGTGGTAACCTCTATAGACATTCATAGGAAAAAT
AAATTTTAAAAATACTAAGATCCTGAATGATATATATATCA
TGAGCTATTATACATAACAAGATCCCACCTTGTTGTTATAAA
AAATTTATGTTTAGTCAATTCAAAGGGTCTGGTATGATAGAC
CCAAAAATGTTAATAGAGTCGAGATTTTTTTATTTTTTTATAGG
TTTTTTGA AATAACCTGAATTTTTCACAATAAGTACTTTGCAC

40

50

ATTAAAAATCTTAGCTGGGCGATGGTGGCTCACGCTTGTAAT
TCCCAGCACTCTGGGAGGCCAAGGTAGGCAGATCACCTGA
GGTCAGGAGTTTCGAGACCAGTCTGGCCAACATGGTGAAAC
CCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCCAGGCTTGGT
TGGGGGGTGCCCTGTAAATTCCAGATACTCGGGAAGCTGAGAC
AGGAGAATCGCTTGAAACCCAGGAGGGGGGAAGTTGCAGTGA
GCTGAGATCACGACGCTGCACCTCCAGCCTGGGGCAACAAG
AGCAAAAACCTCCGTCTCAAAAAATAAATAAAGAAAAAATCTT
TACATGTCCAAAGATACGGGCTGTTCAACTAAAAAATATAT
ATGTATAAAAACTTAACATGTTAATAGTGAACACACAAAAAC
AGTAAGATAGATAAAAATTATTCCTTCAAAGCTCACTTAAC
CTCTGGATCTACACTGTCCAAAAAGACGGGTCTAATGAGAC
AATTGAGCACTTGATAGGTGAGTGGTTCTAACTGAGATAT
GTTCTCAGTATAAAAAACATACAATAGGATCTTCCCTATACAA
CATTAATTAAAAAACAACCTATTGTAGTTAAAAAAGGAAAA
AATTAGAGATACTATGTAAAAAAGAGCCAAAAATACCTTGT
ATTTTATTTGAAAGACATATCTCCATAAGATTACACAACC
TCGTGTAGGATAAAGGACTTTGCTTTGCTTGGGAATTTAAA
CAATTTAGGCTCTTAAATGTCCTAAAAATTCTCTGTAGCTA
AGAAATTTTTTATATTGGTTTCCTAGGAACCTAGGAATCCTTA
AATTAGGCCCTACATTTGCTTACAAGTTTATTTTCCCTTGG
CATAAAAATTTTTTTAGTTTTTACATTA CTGGTTATATTTGA
TCAGGGTTCTATTTAAATAGGCACAAAGTTCAAGCAAGAT
CAGATTCTGCTTTTAGCAGTGTGTACTCAGACAGGAAGTA
TTAAAAGGCAGGCAGAAAAATCCTTTATAAAAATTACTACTT
TCAATGCATTTTCCCACGTTGAAATGCTTCTGCAGTTTAT
AATTAGGCAAATTACTTTAATTATAATCAATAATGCTGTT
CAAATTACTATAAGAATTATACAGATATTTATACCAAGAG
ACAATATACTAGAAACCAAGACTACGTGACCATTA CCTCT
ACTCTGTCAGTGTATTTTGTGAGAAATTGCACAAATTTTG
CAAAAAGTGTTAGTATCCTACTACAGTAGGATATAATATA
GAAGGAATAAATTTCATAAAGCCTGTCTTTGGTACTAGTG
CTCAGTTACTTTCATTAACTAAAAAAGGGGCTACTCTTCA
AATTCCTTCTCTAAAAAGAAATGTACTATATCAAAAAGGGG
GTAAACACTACTACGTATACATTCCTGCACCTTAGAAATCCC
TATATGTTGATTTTATCATTCCTTATTCAATAAATATTG
TTTCTACAATGTGTAAGGCATTACTGTACTAAAGCATTAT
AAGGAATATAAGTTAAAAACACATACAAATCTTGCCAAATC
AACAGCTTATAGTGTAAATAGGGGAGAGAAAGCTGGCCCATC
TATATTCTCCCTCAACTAGCAAGTGGATGAAATATCAGGG
TCAATAGTTATAAGCCACA AAAAGCTGACAGCTTAATTAA
AGAAGTTTTTGAAATATGTATTTTCATGACCAATAATTACA
CTGTAACTTTTTCTATTTTAAAGAAGGAGAAAAATTTGAATTT
CTTCTCTAGCTCAACATACACTTCTATAATTCCATTACAT
GAACCAGAGTAAAGGGTAAGATGGAAATGAAGAAATATTTT
CTTACCCTTTTTGTGGTTCTATATTGGACACTTAAAAATCA
TACACAACCTAATCAAAAAGATGTAAATTCCTTTAAAAAGGTA
CGAGACCAAAATTCAGAAAAATCTAGACTATAACAAAAATTT
CTCAATTTACATTATCTTAATATGCAATTAATTTTCCACCA
GTAAAAATACTATAGTATGGGTACAAATGCATTGATTAGTT

10

20

30

40

50

CTAATTACAAAAATGGCTAATATATAATACTGTGTAGTGT
TTATGATACATCAGATAATGTTCTAAGTGCTCTGAAAAATA
TAAACTTTTAAATCTTTTATACGACCCTATAAAATAGGTGT
TATTCTCACTGGAGAGATGAGAAAAACAGGGGGTTTCAGAGAT
GTGAAGTAATTTTGACCAAAGGTCACAAAGCTGAAGAATAT
GAAATCCGGGATTCTGATTTCAGGCAGTCTTATTCCAGAAT
CATGCTCTTAACCACTATGGAATACTGCCCTCTACTGTAAC
TATTATACCCAAAAACCCTTAATCCTAAGTCATCAAAAGGA
AGAGCCTCTATTTTACACAATGAAGAGGGCATTTCTAAGAA
TAGAAATTTAGGGACGAGCACAGTGGCTTACTCCTTTAAT
ATCAGCACTTTGAGAGGGCTGATATGGGAGGGTTCACTTGAA
GTCAGGAGTTCAAGGTCAGCTTGGGCAACATAGTGAAACA
CAGTCTCTACAAAATATTTAAAAAATTAGCTGGGTGTGGTG
GCATGCATCTATAGTCTCAGCTACTTTGGGAGACAGAGGGA
GGAGGGCTTGCTCGAGCCCAGGAGTTCTGTGGCTATAGTGAG
CTATGATCATGCCACTGCACCTCCAGCCTGGACAACAGAGC
AAGACCCTGTCTCTAAAAAAGAAAAAGAAATTTGGAAATGG
TTTATTTTGTATTACAATTTATAATTTACACTGAAATTT
ATTATGATAAAAACCTTTTCCCTGTGTTA AAAAGCTATTAA
TTTATGAAAAAATTTCTTTTAGGTAAGGTTGATTATATATA
CCCACACACATACACAGGTTAAAAAGTTAGTTTTCATGTGAC
ATAATAAAGTAGCATTTTGTAGCACTACCTGTTTGGCCAGCA
CTGTTCTAAGTGCTCTACATGTATTATTGTTAAATTTATCA
TAACACTATGAATTTATGTACTATAATTTACCCAGCTTTTAC
AGATGAGGAGACTAATCCATGGGGAGGTTAAGTAAGCTTGT
CCAAGGCCAGACAGCTAGAGCCGGCTTTTGGACCCACACC
ACAGTCTGACTCCAGCACCCATATTCTTTAACAATTTTCA
ATATTAAATATGTCAAGATTAAAGCAGTTTTTAAAGGATGCTA
TTTTCTCACAAATTTCTTTAATATGAACACTCAATAAGAA
AATCACTAATATAAGCATTTTAGTATTTTTTTAAACACTAAG
TTGGAAGCATAGTGGAACATTTATTTTTGTAGAAATATTATT
AATTGGCTGGGGCTCACGCTTGTAATCGGGCTGGGGCTCATGC
CTGTAAATTTTGGGAGGGCCAAGGTAAAAAGAAATTGCTTGAG
CCCAGTATTTCCAGACCAGCATGGGGCAATACATTTAAGACA
TCATCTTTAAAAAATAATGTTATTAAATCTCCTCTTTTGT
TTAAATGTATATTATCAAAATTTGTTACTAAGCTAACAAC
TTCAGAAAAAATTTATGATGGGCAAGCTGCTTGTTGACATTG
AAGGTATTTAAGATTCAATTTCTAGTTTGGTCTTAGATGAC
CACATATCCATTGTTCTCTTCAACGAGCACATGGTTAAAGAG
CCTAGAACACAGAGACACAGAACACAGTGGAGAAAAAGGGA
GTGAATGTCTTTAATGACACTTACTATATATGGGATTTT
GTGACAATATACAAGGATGGTTAAGACATATAAGGTGATG
CAAAAAAACATATTAAACAATTTATAGTGACAAAAAATGAGG
AGCATATAATTTATACATTTGATTTTATACAGAGTACCAGAGG
AACACAGCATTTGAGAGCGGTAAACACCACCTGAGGGAGTG
AGAAAGGCTTTCAGAGAGAAAGTGTTTGTGGAAATGGATCA
CTGTTTCCAAAAAGAACTAAAGTACAGTTTGGAGAAATGCAT
ACTTAATTTCAATTACTTTTTTTCCCTCAACTTTAATAATA
ATTTACCCAAACAAAAAAGTTTATTTTGTACTTGTAATCT
CTTAAATCATAAAAAAGTAAAAATTAGCTTTTAAAAACAG

10

20

30

40

50

G T A G T C A C C A T A G C A T T G A A T G T G T A G T T T A T A A T A C A G C
A A A G T T A A A T A C A A T T T C A A A T T A C C T A T T A A G T T A G T T G
C T C A T T T T C T T T G A T T T C A T T T A G C A T T G A T C T A A C T C A A T
G T G G A A G A A G G T T A C A T T C G T G C A A G T T A A C A C G G C T T A A
T G A T T A A C T A T G T T C A C C T A C C A A C C T T A C C T T T T C T G G G
C A A A T A T T G G T A T A T A T A G A G T T A A G A A G T C T A G G T C T G C
T T C C A G A A G A A A A C A G T T C C A C G T T G C T T G A A A T T G A A A A
T C A A G A T A A A A A T G T T C A C A A T T A A G C T C C T T C T T T T T A T
T G T T C C T C T A G T T A T T T C C T C C A G A A T T G A T C A A G A C A A T
T C A T C A T T T G A T T C T C T A T C T C C A G A G C C A A A A T C A A G A T 10
T T G C T A T G T T A G A C G A T G T A A A A A T T T T A G C C A A T G G C C T
C C T T C A G T T G G G A C A T G G T C T T A A A G A C T T T G T C C A T A A G
A C G A A G G G C C A A A T T A A T G A C A T A T T T C A A A A A C T C A A C A
T A T T T G A T C A G T C T T T T T A T G A T C T A T C G C T G C A A A C C A G
T G A A A T C A A A G A A G A A G A A A A G G A A C T G A G A A G A A C T A C A
T A T A A A C T A C A A G T C A A A A A T G A A G A G G T A A A G A A T A T G T
C A C T T G A A C T C A A C T C A A A A C T T G A A A G C C T C C T A G A A G A
A A A A A T T C T A C T T C A A C A A A A A G T G A A A T A T T T A G A A G A G
C A A C T A A C T A A C T T A A T T C A A A A T C A A C C T G A A A C T C C A G 20
A A C A C C C A G A A G T A A C T T C A C T T A A A G T A A G T A G A A A A T A
A A G A G G G T T C A T G T T T A T G T T T T C A A T G T G G A T C T T T T A A
A A A A A A T A T T T C T A A G G C A T G C C A T T T G A A A T A C T T T G T T
G C A T T G T T G A A A T A C T T T T T T T T C C A A G A A A A A T A A T C T C
C A G A A A A T A A A A T T T C C T A T T A T A A T T T C A A G T T A G T T T T
T T G T T T C C C T A A T G T T A T A T A T G A A A A C A C T G A A A A T T T G
C A T T T T A T A T G A A A A T T A C A A A T C G G T T A A A T T A T A C A A T
C T A G A A C A C T A T G T C A T T A C A C T A T T G T A A A T T A C T G A A G
G T A A G T A A A A A G T T A A A A A A A A T T T A A A A C T A T T C T C C A G
T G T T T A A A A C A G A T T A A A T A A T A C A G T A A A T G G A A A A G A T 30
T T A T T C A T A T G A A A A T A T G C T G G G C T T T T T C T T T T A A T T G
A A G T T C A G A A A A T C A A A T T T T A G A G A T A G T A C A A T T T A A A
T A A A A T G T T A A G G A C A A A A A T A T G T G C T A T T T G A A A G A A G
C A T A C A A G G G G A A G G A A T T G C C A A T A T T C A T T T T T C A A A T
C C A T T A T T A G T T T A A A A A T T T A G A T T A T G A T A G T G T T A C A
G G A A A T T A A T A G A A A A G A A A G A G G A A A G C A A C T T A T A A C C
A A C C T A C T C T C T A T A T C C A G A C T T T T G T A G A A A A A C A A G A
T A A T A G C A T C A A A G A C C T T C T C C A G A C C G T G G A A G A C C A A
T A T A A A C A A T T A A A C C A A C A G C A T A G T C A A A T A A A A G A A A
T A G A A A A T C A G G T A A G T C A G T A T T T T A A T G G T A T G T C C C A
T C T T T C A C A C A G G T C T G T A A A A A C A C T G A A T C C T A A A A T T 40
A T T T A C A A G C T T T A A C T G G A T C A T G A G T A A A A T T A T C A C A
T C A G C A T A A C T G T T A A A A T T G C A G G C T C T G A A G C T A A T A A
A C T A C C T G C A T T T A A A C C A T G G C T C T A A A A C T T T G T G T G A
C C T T G A A T A A A T T A C T T C A C C C C T T T A T C T C T C A G T T T C C
T C A C A T A T A C T A C A A A G A T A A T A A C A G A A C T T A T A G G A T T
A T T G T A A G A A A A A A A A T T A A T T C A T A G C A G C C A A T G T C A T
C T T A C T A A A A T T C A A A T T A G A T C A T G T T T C T C T T T G C T C A
A A A C C A C A C A A T A G C T T T C C A T T T C A C T C A T A T T G G C T C T
T T A G A C C A A G A T T A C C C A A C C C T T C G T C A T C T C A C T G A C T
T C A C C T C C T C T A C T C T A G T T A T T C T G A C C G C T T T A C C A G T 50

ATTCAAACACATCAAACATACTGCCACCTCAAAGCCTTTG
CCCTTGTTGTTTTCCTCTAACTGGGAACGCTCTTCTGCCCTG
GTATCTACGTGGCCCACTCTCTGATTTCCCTTAGGGTCTGT
TATCAAACAAAAAATTCCCAATGAAGACTTACAAGGTCAC
TTAACCACAAAAATCACAAACCGCCTGGTCCCATCCCTGAAAA
CTTCTACTTTCCTTAGCTACTTTTCTCCTGCACACTCACCT
TTATTTAAACATAAACATAAATTTTATGTTATTTATCTCTTCT
ATTCTCTGCACATAAAATGTAAGCTCTGTGAATACAGGGGATT
TTTTCCATTATCTTCAATATTTTCCATTATTTGTATATACT
CCAGAATATAGAATACTGTATGGCACACAGTAGGGCATTTTC
TGTTGAATTAAATAAATGTAATGTCATATTCACACAGAAGC
GTGTGCTATGATTATTATTACTTGGATTACTAGAAATAGT
GTGCCTCATAAATTAAAGGTCAACATTTCAACAATGTAATTA
ATCTACAATGTAAACATCTGGTGAAGTGACAGAGGGGAAGC
ACTTGTTTTAGAAAAAAGCTATGTCAGAAATCCATGTATTCT
AATATGCAGTACAATAGTTTAAAAAATATTAATAATACTCT
CAAACAGCTATTCAAGAGGATTCAAAAAACATAATATAAA
CTCAGAGAAACTGGTAAACAAAAATCATTTTCAAGAGATAT
AAAAACAATATTATTACCAATTTCCACTAAACAACATAA
TGTTAGTAGTGCTGCTAAAAGGTTTTTTTATCAACTACTTT
TGGTTTTCCATACTTTTCCTTCTTATGATGTTATTATTCTAA
ATTCTTTTTCAATTATATCTTTTTACTATGATTAAATGAACC
TGCTCCCCAAAGCAAAATGTTACTATAGTAATATACATTG
TGCTCTAAAAAATAAAAAATGTGTGAAGAAACCAAAACAATGA
ATTTCTGAGTTGGAAGAGAGAGTTAGATCATTTAACTTTCT
CATATTTAAATTAAAAAACAACAACTCTAAAAAATTTAAGT
AACTTTAAGATCACATAGTTACTTTAGTAGAAAAAGAGTAAT
ACCCAGCAAGCAAACTTTACAATAGATCCTTTTTAAATAAG
GTCCTAGGAAATATCATTTCATGCCAGCATCAAAAAAACTAA
CACTAATAATGCAAGATATTATATATTCTGCTTTTCTTTAC
TGTCAAATGAGAAAAAATCATTTCAATAAATTGCAAAACCC
AACACACTTTAAATAAAAAATAAAAATGTTACTGCTAAACTAA
CGATAAACTACTGAATATATAGAAAGTAAGCAAAACAACCT
TGCCAACCTGCCAACATCTACAGATATGTTTTACAGGTCAA
AAATTATCAAATTATCAAGAAAGCCTGGTTCAAATTTATGT
ATTATGTCTTTATCACAGGTCTGAAGATCAGTAAGACCTTA
AAACTGAAAAATTATTAACTTTAAAAATCTGAACAGAAATATC
AAATATATTTTATTTCATATAAATAAAGAATACATTACAA
TATTCTAAGCAAAGCAGTCTCTACTTTTGGCCCTTGCTCTG
TTTTCCGACCAATGTCTGCTTTTTTTTGCCTTGCTTTATTTT
TTTATCTTATTAAATAAATGTCCCTGATTAAATATTTTGTAG
AACAGGTAATCTGTACAATCTGAATAACACTGTTTATCTA
AATATCAAACACCGTTATAACATTTATGAACCTGAAAGACAA
ACTGTACTTCTGACATCCTTACTCAGATTTCCCTTAATTG
TATATTCAGTATCATTTTAAAAAACAGATTTATATTCTTT
TATCAGCTCAGAAAGGACTAGTATTCAAGAACCCACAGAAA
TTTCTCTATCTTCCAAGCCAAGAGCACCAAGAACTACTCC
CTTTCTTCAAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAAACATGAT
GGTAAGACACTTTGGTGGGTTTTCCTTCTTGAAGCTATTAT
TATCAAATTCCCTATTCTTAGGACTTGTTCTAGACTAAAA

10

20

30

40

50

G A T A G T T A A G A G A T A T C C A T C A A A T A C A A T G T A T C A A C C T
A A A C T G G A T G C T G G G G T T C T T T T A C A C C C T A T A A A A G A C
A T A C C T A A G A C A A T C A G A G A A A T A C A A A T A T G G A C T T G A T
T A T T A G A T A A T A T A G A A G G T T T A T T A A T T T T C T T A G A T G T
G A T C A T G G T A T T G C A G T T T T A A A G G A G A A C A A T C T C C T G T
T T A A G A G A T A C A T G C T G A A A T A T T T A C G G A G T T A A A G G T C
A C T G G A C T C C A G A C T G G T G A T A G A A C A A G A C T C T G T C T C T
A A A A A A T A A T T A A T T T T T T A A A A G A A A A T A G T T T G G T A A G
A T G A T T C T T A C A T T C T T A A A T A A C A C G C C A T C T A A G A A A A
A T G C T T T T A A C A T A A A C A T T A C T G A A A A A A T G C T A C A T T T G
C C A C A A C T T C A T A A A A T G T C A A G T G A A A T C T C A A G C T C C A
A A G A T A T T A T T C C T A T T A C T A A A T C T G A T G T A A T A A C A T T
T T A T T G A T T C T A G G C A T T C C T G C T G A A T G T A C C A C C A T T T
A T A A C A G A G G T G A A C A T A C A A G T G G C A T G T A T G C C A T C A G
A C C C A G C A A C T C T C A A G T T T T T C A T G T C T A C T G T G A T G T T
A T A T C A G G T A A A A C C T G T C T A A G G A G A A T A G A C A G T A G T T
A G T T C A A C T T A C T C A T T A C G T A T T A G G A A G A T T A A C C T G G
T T A T C A T T G T T T T A T A C A T A T A T A T A T G A A A T A T A T A T G A
G T A T T C G T A T A A A T A T A A T A C T T T T A C C T T G T T T A T G T A T
T T A C T C A A T A T T C T C C T T T T C C T C T A A A A T A A T C T G A A G T
G A C T A T T A T C A A T A A G T T T A C T A T G C C A A A A T T C A T T A A T
T G C C T T T C A C T T A A C T T T T G G G A C C A T A A T A A A T A A T A A A
A T G T A T T G C C A T A A C A T T A A T A A A C T A C C T T A C A A A A C C A
C C A A T T A A A A T C A A A C A A A C A A A A A A G T G T T A T T T A C A T C
T G T C A A C A T A A A T C T A C T A A A A A T A C A T G A T T T C A T T C A T
T A T A T T C A G G T A G T C C A T G G A C A T T A A T T C A A C A T C G A A T
A G A T G G A T C A C A A A A C T T C A A T G A A A C G T G G G A G A A C T A C
A A A T A T G G T T T T G G G A G G C T T G A T G G T A A G G G G A C T A C A T
T C A A T C A T T C A T T C A C T T G C T A A T C T A C A A A T A T T T A C T G
A G A A C C T C T T A T G G A C C A G G T A T T A G G A A A A G T A G T A A C G
A A C G A G A A G C A G T C T C A G C C T T C A T A T A A T T T A T T A T C A A
A C A A T T A C A C A T T T G T T A G T A A A T T A C A C T T A T T A C A A C T
G T T A T T A T T T G A A T T A T A T T T A T C A C A A T T A C A T G T C T G T
T C T T A A A T A T A C T T A T C A C A A T T T A A T T C C A C G G C T T A C A
A T G A T C A T A A C T A T A A T T A T T A A A G A C A A T T T T G A T T A A A
T G T T A T G T C A T A A G T A G T A A C T G T T A C A A A T A A G C T G T G A
A A A G A A C C A C T C C T A G C A T T A G T C A C T C T A T T C T C T C A T T
A A C G T T T T A C A T A T C A A T T A A T T G G A A G T T A A A A G G A C C A
G G A A A C T C A G A C A T A C A G T A T A C A T T T T A A A A T T T C A A T T
A T T T A A A T A T A A T A T A T A G A A T G T A T G G C T T A T A A T G A A T
T A G T T A A C T C A A T G C A A A T T A T T C T A T T T T G A T T A C A A A T
A G T A A A A T A A G C A A G A T A A A A T A A C A G A T G T T T A A A A T C C
A A A A A G C A C A T A C A A A A A T C C A T G A A T G A T G T C T A A G T A C
T C A C T T A T A A A G T A G A A G A C A T T C A T T A T T A T A T C A A A T T
T T T A A A T G C T C A G T A C T A T T T G A C C A T T T A A A A A T T T T G T
A T T C A A A C T A C C A G T G A A A G C C C T A C C T A G A A G G T A T A C T
C A G T G A T A A G T T T T G T A G C T C C A A A T C T T C T A A T A G T G A G
T G T A A C C C C A A A A T A A A A G G C T G A C A G G T A A G T C G A G A A T
A C T C A C T T A A T T C T G G T A A G A A A G C A A C C C A T T T T G T A C T T
G T A T T T A C C A G C A A T C C T T A A A A T G A A G C T T C C T A C T A A C

10

20

30

40

50

TCAATAGCAATAAGACAATAGTGAATGTTTAAATGAAAACA
GTATTTTATAAATACTTTAATAAAAAAGGATTGTGATGAAG
AACAAATCTATTTTATATTTGTTATTTGTTTTTAATTCCAAT
AAAAATAATTTTAAATAATTACAGAAAAAAGTTATTAAAGAA
CCATGCTTTTAAATTTAAATAATGATTTTTTTAAATTTATTCC
TGTCTTTTTTCTACAAAGAAAGCATACATTAAAGCAAATACC
AAAGGCCAGGTTTACATTTGAAGAAAGTGACATTATTATT
ACTCAAGTCTCTAGGAATACTTAACACATCTCTTGACTGT
ATATGGATGTTAATAAATAAGCTGACAGTAAGGTTTATCCA
TATAAAGACTTGCAAATATTCTCTACCAATGACGAGACT
TTAAAATATCTATAATAATGTAAACACATTTCACTGGTGAA
ACATGTCTTGTCATATGCATTTATAGAAAGGATAATCAGAC
TTTCAGTTATATTAAATATTTTTTAACATTTTTTGTCACATA
GCTATCTTCAATAAAAAATTGTTTTAAAGGTAATTATTTTAA
GATACACTAAAAATGATCAAGGGGATTCAAGACTAAACAACCT
CAATTAGTTGCAACCAATAAAAAAACACTTAAAAAAACTGTC
AGTGTCACAACCTGTACTTAATAACTCACAGATTTTTTAAAA
CTTTTCTTTTTCAGGAGAAATTTTGGTTGGGGCCTAGAGAAAG
TATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAAT
TGAGTTTGGAAAGACTGGAAAGACAACAACATTTATATTGAA
TATTCTTTTTACTTTGGGAATCACGAAACCAACTATACGC
TACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCCAATGCAAT
CCCGGAAAAACAAGATTTTGGTGTTTCTACTTTGGGGATCAC
AAAGCAAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTTCAG
GTATCTTTTTTCTGTATACCAATACTTTATTTTTCATATCTTC
AAAGTATCTTCCCACATTTATTAGCTATTATCTGCAATGAC
AACTTTTTAAAAATCCGAATCCCAATAAGCGTTTTCTCTC
TAGACGAAAAACCTCTTAACTATAATGAAAGTGTTTCATTCT
AGTTCAATCAGGTATTTTTACCTCTAATCTTCTCAGATTT
TCTATTTTTTTGGTAGTGATAGATTATTTATACAGATTAT
TTAAAATTGGGACTTATACAGATTATTTTAAAACTGGGGATA
CATGCATCTAAAACACTGTAATATTTATAAGAAAGGAAGA
TAAACTTACGGGGAAATACAGTAACAGTAACCTACATACGA
GTCTGTACCCATTAAATTTGCATATCTATCTCCTTTAGGAG
GCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTTGGAGAAAAACAACCTAAA
TGGTAATAATAACAACAACCAAGAGCAAAATCTAAGCCAGAG
AGGAGAAAGAGGATTATCTTTGGAAGTCTCAAAATGGAAGGT
TATACTCTATAAAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAAC
AGATTTCAGAAAGCTTTGAATGAACCTGAGGCAAAATTTAAAA
GGCAATAATTTAAACATTAACCTCATTTCCAAGTTAATGTG
GTCTAATAATCTGGTATTAAATCCTTAAGAGAAAGCTTGA
GAAATAGATTTTTTTTATCTTAAAGTCACTGTCTATTTAA
GATTAAACATACAATCACATAACCTTAAAGAAATACCGTTTT
ACATTTCTCAATCAAAATTTCTTATAATACTATTTGTTTTA
AATTTTGTGATGTGGGAATCAATTTTAGATGGTCAACAATC
TAGATTATAATCAATAGGTGAACCTTATTAAATAAATTTTC
TAAATAAAAAAATTTAGAGACTTTTATTTTAAAAAGGCATCA
TATGAGCTAATATCACAACTTTCCCAGTTTAAAAAACTAG
TACTCTTGTTAAAACTCTAAACTTTGACTAAATACAGAGGA
CTGGTAATTGTACAGTTCTTAAATGTTGTAGTATTAAATTT

10

20

30

40

50

C A A A A C T A A A A A T C G T C A G C A C A G A G T A T G T G T A A A A A T C
T G T A A T A C A A A T T T T T A A A C T G A T G C T T C A T T T T G C T A C A
A A A T A A T T T T G G A G T A A A T G T T T G A T A T G A T T T A T T T A T G A
A A C C T A A T G A A G C A G A A T T A A A T A C T G T A T T A A A A T A A G T
T C G C T G T C T T T A A A C A A A T G G A G A T G A C T A C T A A G T C A C A
T T G A C T T T T A A C A T G A G G T A T C A C T A T A C C T T A T T T G T T A A
A A T A T A T A C T G T A T A C A T T T T T A T A T A T T T T A A C A C T T A A T
A C T A T G A A A A C A A A T A A T T G T A A A G G A A T C T T G T C A G A T T
A C A G T A A G A A T G A A C A T A T T T G T G G C A T C G A G T T A A A G T T
T A T A T T T C C C C T A A A T A T G C T G T G A T T C T A A T A C A T T C G T 10
G T A G G T T T T C A A G T A G A A A T A A A C C T C G T A A C A A G T T A C T
G A A C G T T T T A A A C A G C C T G A C A A G C A T G T A T A T A T G T T T A A
A A T T C A A T A A A C A A A G A C C C A G T C C C T A A A T T A T A G A A A T
T T A A A T T A T T C T T G C A T G T T T A T C G A C A T C A C A A C A G A T C
C C T A A A T C C C T A A A T C C C T A A A G A T T A G A T A C A A A T T T T T
T A C C A C A G T A T C A C T T G T C A G A A T T T A T T T T T A A A T A T G A
T T T T T T A A A A C T G C C A G T A A G A A A T T T T A A A T T A A A C C C A
T T T G T T A A A G G A T A T A G T G C C C A A G T T A T A T G G T G A C C T A
C C T T T G T C A A T A C T T A G C A T T A T G T A T T T C A A A T T A T C C A
A T A T A C A T G T C A T A T A T A T T T T T A T A T G T C A C A T A T A T A A 20
A A G A T A T G T A T G A T C T A T G T G A A T C C T A A G T A A A T A T T T T
G T T C C A G A A A A G T A C A A A A T A A T A A A G G T A A A A A T A A T C T
A T A A T T T T C A G G A C C A C A G A C T A A G C T G T C G A A A T T A A C G
C T G A T T T T T T T A G G G C C A G A A T A C C A A A A T G G C T C C T C T C
T T C C C C C A A A A T T G G A C A A T T T C A A A T G C A A A A T A A T T C A
T T A T T T A A T A T A T G A G T T G C T T C C T C T A T T T G G T T T C C T T
A A A A A A A A A A A A A A A C T C T C A T A G G A C A T G T T T C A T T T T G T
T C C T T T C A G G A G T A G T A A A T T A G A C G T T T T C C C C A T A T A A
A G C T T T T T T C T A C C A G A A A G A T A C T T C T G G T A G A A G A A G A
G A A A G G A G C T C T T T A T G G T T C A C A C G A C T G T C T C C T G T C C 30
T A A C T A C T T T G C T T A A A G T G C T C A A A T T C C A T C A C T A C T C
A C A G T T G T C T A A T C T A A G T C T A A T C C C C T T T G A T C T C T C A
G A C T A C C T T C C C T T T T A T C T C T C T A C T A C T T A A T A A T A A G
A A T A T C T T T T T T T T C A A A C T T G A C C T T C A T T T T G C T T T C A C
A A T A C T A T A C T C T C C A T G G A T T A T C C C T T A T C T G A A T C C A
T C T T T A T A A C C C T A T T C C T T T C T C A T A T T T A G T A C T G T G G
G C C A A T G G A C A A C C T T C A A T C A T C T T T T C T A C A C T G A C C C
T C A G A C A T T C T A T C T G C T C T C A C G G A C T C C T T T A T T T A C C
A T G A A T A A A G T T C C A A A A T C T A C A T A T T C A T C C C A A G T C T
C T T T C C A G T T C C C C T T C T T A C A T T G C C T A T T T G C C A T T T C 40
T C C C T T C A A T A C C C T A T A C T T C A C T C A A A T T C A A C A T A C C
A A A A A T A A A A G G C C A G G C A C G G T G G C T C A C A C C T G T A A T C
C C A G G A C T T T T G G G A G G C T G A G G C A G G T G G A T C A C C T G A G G
T C A G G A G T C T G A C C A G C C T G A C C A A T A T G G T G A A A C C C C G
T C T C T A C C T A A A A T A C A A A A A T T A G C C A G G C G T G G T G G C A
T G T G C C T A C A G T C C C A G C T A C T C A A G A G G C T G A G A C A G G A
G A A T C G C T T G A A C C C A G G A G G C G G A G G T T G C A G T G A G C T G
A G A T C A C A C C A A T G C A C T G G G T G A C A G A A C A A G A C T G A C T
C A A A A A A A A A T A A A T A A C A A A T T C C C C A G C C C C T T A C T G C
T A C T G C T A T C C C T T T C T A C C C A C C T T T C C C T C C T T T A T A C 50

TCTTTTCACACCATCTTCCTCACTTCTTTTATATCCATTAAAT
ATGACCAGCATGTTCCCAGTCACAGAAGCCTGGAACCCGG
AAGACATCTCTGGCTTTTCACTCAACTTTGTAAACTACCT
CTTTTGTATCATAAAGCCACCAAGTTCAATACAATCTTCTC
TTGAAACGTCTCTTAATCTTATAAGCTTTCTTCCCAAAAG
ACTGTCTTTAACTTTCAGTGCTAGATTATATAAGT (配列番号 1)

【0262】

[0306]AAD34156. 1ヒトアンジオポエチン関連タンパク質3

MFTIKLLLFIVPLVSISSRIDQDNSSFDSLSPPEPKSRFAML
DDVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQ
SFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLEL
NSKLESLLEEKILLQQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPE
VTSCLKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSHSQIKEIE
NQLRRTTSIQEPTESISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHD
GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS
PWTLIQHRIIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKI
YSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYYIEYSFYLGNHETNYTL
HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYS
GWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSNQGR
LYSIKSTKMLIHPTDSESEFE (配列番号 2)

【0263】

プロタンパク質コンベルターゼサブチリシン-ケキシン9型 (PCSK9)

[0307]本明細書に開示される系及び方法を使用した改変のための標的遺伝子は、PCSK9をコードする遺伝子であってもよい。神経アポトーシス調節コンベルターゼ1 (NARC-1)としても知られるプロタンパク質コンベルターゼサブチリシン-ケキシン9型 (PCSK9)は、分泌型サブチラーゼファミリーの9番目のメンバーとして特定されるプロテイナーゼK様サブチラーゼである。「プロタンパク質変換酵素サブチリシン/ケキシン9型 (PCSK9)」は、PCSK9遺伝子によってコードされる酵素を指す。PCSK9は、低密度リポタンパク質 (LDL) 粒子の受容体に結合する。肝臓では、LDL受容体は、エンドサイトーシス経路を介して血液からLDL粒子を除去する。PCSK9がLDL受容体に結合すると、受容体は、リソソーム経路に向かってチャネリングされ、タンパク質分解酵素によって分解され、所与のLDL受容体が血液からLDL粒子を取り込むことができる回数が制限される。したがって、PCSK9活性を遮断すると、より多くのLDL受容体がリサイクルされ、肝細胞の表面に存在し、血液からより多くのLDLコレステロールが除去される可能性がある。

【0264】

[0308]したがって、PCSK9を遮断することで、血液コレステロールレベルを下げる事ができる。PCSK9オルソログは、多くの種にわたって見出される。ペプチド鎖のあるセクションがその活性をブロックするため、PCSK9は、最初に合成されたときに不活性であり、プレプロ酵素である。プロタンパク質コンベルターゼは、そのセクションを除去して酵素を活性化する。プロPCSK9は、その触媒部位を遮断するPCSK9の強力な内因性阻害剤へのN末端プロドメインのタンパク質分解自動処理が可能な分泌型球状セリンプロテアーゼである。コレステロールホメオスタシスにおけるPCSK9の役割は、医学的に活用されてきた。PCSK9を遮断する薬物は、低密度リポタンパク質コレステロール (LDL-C) の血液レベルを低下させる可能性がある。最初の2つのPCSK9阻害剤であるアリロクマブ及びエボロクマブは、スタチン及び他の薬物が不十分であったコレステロール低下のために2015年にU. S. Food and Drug Administrationによって承認された。

【0265】

[0309] PCSK9 のヒト遺伝子は、ヒト染色体 I p 3 3 - p 3 4 . 3 に局在化する。PCSK9 は、例えば、肝細胞、腎間葉系細胞、腸回腸、及び結腸上皮並びに胚性脳終脳ニューロンを含む、増殖及び分化が可能な細胞において発現される。例えば、参照により本明細書に組み込まれる Seidah et al., 2003 PNAS 100: 928-933 を参照されたい。

[0266]

[0310] PCSK9 の元々の合成は、72 kDa の不活性酵素前駆体、すなわち酵素原の形態であり、その機能を活性化するために小胞体 (ER) で自己触媒的な分子内処理を受ける。この内部処理事象は、SSVFAQ j SI Pモチーフで発生することが報告されており、ERからの終了の要件として報告されている。「j」は、切断部位を示す。Benjannet et al., 2004 J. Biol. Chem. 279: 48865-48875、及び Seidah et al., 2003 PNAS 100: 928-933 を参照されたい (その各々は参照により本明細書に組み込まれる)。次いで、切断されたタンパク質が分泌される。切断されたペプチドは、活性化され分泌された酵素と会合したままである。

[0267]

[0311] ヒト PCSK9 の遺伝子配列は、約 22 kb 長であり、692 個のアミノ酸タンパク質をコードする 12 個のエキソンを有する。ヒト PCSK9 のタンパク質配列は、例えば、寄託番号 NP_777596.2 に見出すことができ、この配列は、その全体が本明細書に組み込まれる。ヒト、マウス、及びラットの PCSK9 核酸配列が寄託されている。例えば、それぞれ、GenBank アクセッション番号 AX127530 (AX207686 も)、AX207688、及び AX207690 を参照されたい (これらの配列の各々が、その全体が本明細書に組み込まれる)。Macaca fascicularis の遺伝子配列は、公的に見出すことができ (例えば、NCBI Gene ID: 102142788)、その配列は、その全体が本明細書に組み込まれる。Macaca fascicularis プロタンパク質コンベルターゼサブチリシン/ケキシン 9 型アイソフォーム X2 配列は、公的に見出すことができ (例えば、NCBI Reference Sequence: XP_005543317.1)、その配列は、その全体が本明細書に組み込まれる。

[0268]

[0312] 翻訳されたタンパク質は、NH2 末端にシグナルペプチドを含有し、細胞及び組織では、全長タンパク質の約 74 kDa の酵素原 (前駆体) 形態が、小胞体において見出される。細胞内での初期の処理中に、約 14 kDa のプロドメインペプチドが自己触媒的に切断され、触媒ドメイン及びしばしばシステイン-ヒスチジンリッチドメイン (CHRD) と称される C 末端ドメインを含有する成熟した約 60 kDa のタンパク質が得られる。この約 60 kDa の形態の PCSK9 は、肝臓細胞から分泌される。PCSK9 の分泌形態は、生理学的に活性な種であるように見えるが、約 60 kDa の形態の細胞内の機能的役割は除外されていない。

[0269]

[0313] 多数の PCSK9 バリエーションが、以下を含むがこれらに限定されない、いくつかの特許公開で開示及び/又は特許請求されている。PCT 公開第 WO2001/031007 号、第 WO2001/057081 号、第 WO2002/014358 号、第 WO2001/098468 号、第 WO2002/102993 号、第 WO2002/102994 号、第 WO2002/046383 号、第 WO2002/090526 号、第 WO2001/077137 号、及び第 WO2001/034768 号、米国公開第 US2004/0009553 号及び US2003/0119038 号、並びに欧州公開第 EP1440981 号、第 EP1067182 号、及び第 EP1471152 号 (これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる)。

[0270]

[0314] S127R、N157K、F216L、R218S、及び D374Y を含む P

10

20

30

40

50

CSK9のいくつかの変異体形態は、十分に特性決定されており、S127R、F216L、及びD374Yは、常染色体優性高コレステロール血症（ADH）に関連付けられている。Benjannet et al. (J. Biol. Chem., 279 (47) : 48865-48875 (2004)) は、S127R及びD374Y変異が、ER中で処理されて活性な分泌酵素源を形成するプロPCSK9のレベルを有意に低下させることを示した。その結果、野生型PCSK9は、LDLクリアランスの阻害を引き起こすLDL受容体のターンオーバー率を増加させると考えられ (Maxwell et al., PNAS, 102 (6) : 2069-2074 (2005)、Benjannet et al., and Lallanne et al.)、一方で、PCSK9常染色体優性変異は、LDLRのレベルの増加、循環LDLのクリアランスの増加、及び血漿コレステロールレベルの対応する低下をもたらす。Rashid et al., PNAS, 102 (15) : 5374-5379 (2005)、Abifadel et al., 2003 Nature Genetics 34:154-156、Timms et al., 2004 Hum. Genet. 114:349-353、及びLeren, 2004 Clin. Genet. 65:419-422 (その各々は参照により本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

10

【0271】

[0315] Abifadel et al.らのS127R変異に関する後に公開された研究では、そのような変異を保有する患者は、(1) 低密度リポタンパク質 (LDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL) 及び中間密度リポタンパク質 (IDL) などのapoB 100含有リポタンパク質の過剰産生、並びに(2) 上述のリポタンパク質のクリアランス又は変換の関連する減少に起因する血漿中のより高い総コレステロール及びapoB 100を示すことが報告された。あわせて、上に参照した研究は、PCSK9がLDL産生の調節において役割を果たすという事実を示している。PCSK9の発現又は上方調節は、LDLコレステロールの血漿レベルの増加と関連し、PCSK9の阻害又は発現の欠如は、低LDLコレステロール血漿レベルと関連する。重要なことに、PCSK9の配列変異に関連する、より低レベルのLDLコレステロールは、冠動脈性心疾患に対する保護を与えている。Cohen et al., 2006 N. Engl. J. Med. 354:1264-1272。

20

【0272】

[0316] Lallanne et al. は、PCSK9においてS127R変異を保有する2名の患者において、LDL異化作用が損なわれ、アポリポタンパク質B含有リポタンパク質合成が増強されたことを示した (J. Lipid Research, 46:1312-1319 (2005))。Sun et al. はまた、PCSK9の変異体形態が、そのアポリポタンパク質B分泌を増加させる効果の結果として、異常に重度の優性高コレステロール血症の原因でもあるという証拠も提供した (Sun et al., Hum. Mol. Genet., 14 (9) : 1161-1169 (2005))。これらの結果は、PCSK9の変異体形態が、LDL受容体のレベルも減少させることを示す結果 (Park et al., J. Biol. Chem., 279:50630-50638 (2004)) に加えて、アデノウイルス媒介性のマウスにおけるPCSK9の過剰発現が、LDL受容体の量の劇的な低下に起因する重度の高コレステロール血症を引き起こすことを示す以前の結果と一致していた。Dubuc et al., Thromb. Vasc. Biol., 24:1454-1459 (2004)。肝臓由来細胞を含む細胞株、及びインビボでのマウスの肝臓におけるPCSK9の過剰発現は、LDLR mRNAレベルを変化させることなく、LDLRタンパク質レベル及びLDLR機能活性の顕著な減少を引き起こす (Maxwell et al., Proc. Nat. Amer. Set, 101:7100-7105 (2004)、Benjannet S. et al., J. Bio. Chem. 279:48865-48875 (2004))。

30

40

【0273】

[0317] 遺伝子サイレンシング剤、例えば、RNAiによるPCSK9合成の阻害、モ

50

ノクローナル抗体、小ペプチド又はアドネクチンによるPCSK9のLDLRへの結合の阻害、及び小分子阻害剤によるPCSK9自己触媒処理の阻害を含む、PCSK9の阻害に対する様々な治療アプローチが提案されてきた。これらの戦略は、Hedrick et al., Curr Opin Investig Drugs 2009; 10: 938-46、Hooper et al., Expert Opin Biol Ther, 2013; 13: 429-35、Rhainds et al., Clin Lipid, 2012; 7: 621-40、Seidah et al., Expert Opin Ther Targets 2009; 13: 19-28、及びSeidah et al., Nat Rev Drug Discov 2012; 11: 367-83に記載されており、その各々は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0274】

【0318】いくつかの実施形態では、PCSK9において誘導された機能喪失変異、例えば、G106R、L253F、A443T、R93Cなど。いくつかの実施形態では、機能喪失変異が操作される（すなわち、天然に存在しない）、例えば、G24D、S47F、R46H、S153N、H193Yなど。

【0275】

【0319】本開示で有用であり得るPCSK9バリエーションは、LDL受容体が媒介するLDLコレステロールのクリアランスを、単独で、又はその経路に関与する他の遺伝子、例えば、APOC3、LDL-R、又はIdolと組み合わせることで促進し得る機能喪失バリエーションである。いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して産生されるPCSK9機能喪失バリエーションは、細胞において効率的に発現する。いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して産生されるPCSK9機能喪失バリエーションは、活性化され、輸送されて、パラクリン機構において非改変細胞からのクラスリンコーティングされたピットを係合させ、したがって野生型PCSK9タンパク質と競合する。いくつかの実施形態では、PCSK9機能喪失バリエーションは、LDL-Rタンパク質と直接接触するLDL-R結合領域内の残基における変異を含む。いくつかの実施形態では、LDL-Rタンパク質と直接接触させるLDL-R結合領域内の残基は、R194、R237、F379、S372、D374、D375、D378、R46、R237、及びA443からなる群から選択される。

20

【0276】

【0320】本明細書に記載される場合、機能喪失PCSK9バリエーションは、野生型PCSK9タンパク質と比較して、減少した活性を有し得る。PCSK9活性は、当該技術分野におけるPCSK9タンパク質の任意の既知の生物学的活性を指す。例えば、いくつかの実施形態では、PCSK9活性は、そのプロテアーゼ活性を指す。いくつかの実施形態では、PCSK9活性は、細胞分泌経路を介して分泌されるその能力を指す。いくつかの実施形態では、PCSK9活性は、クラスリンコーティングされた小胞においてタンパク質結合アダプターとして作用するその能力を指す。いくつかの実施形態では、PCSK9活性は、LDL受容体と相互作用するその能力を指す。いくつかの実施形態では、PCSK9活性は、LDL受容体のリサイクルを防止するその能力を指す。これらの例は、限定することを意味するものではない。

30

【0277】

【0321】いくつかの実施形態では、機能喪失PCSK9バリエーションの活性は、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも99%、又はそれより大きく減少し得る。いくつかの実施形態では、機能喪失PCSK9バリエーションは、野生型PCSK9タンパク質と比較して、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、1%以下、又はそれ未満の活性を有する。PCSK9活性を決定するための非限定的な例示的なアッセイは、当該技術分野、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第US2012/0082680号に記載されている。

40

50

【0278】

【0322】いくつかの実施形態では、細胞PCSK9活性は、適切に折り畳まれた活性PCSK9タンパク質のレベルを減少させることによって減少させてもよい。不安定化変異を野生型PCSK9タンパク質に導入すると、タンパク質の誤った折り畳み又は不活性化を引き起こす可能性がある。本明細書に記載の1つ以上の不安定化変異を含むPCSK9バリエーションは、野生型PCSK9タンパク質と比較して、減少した活性を有する場合がある。例えば、本明細書に記載の1つ以上の不安定化変異を含むPCSK9バリエーションの活性は、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、又はそれより多く減少し得る。

10

【0279】

【0323】いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物は、標的遺伝子及び／又はその機能によってコードされるタンパク質の発現を減少又は無効化する。例えば、本明細書に開示される方法及び組成物は、対照と比較して、PCSK9遺伝子によってコードされるPCSK9タンパク質の発現及び／又は機能を、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、又は少なくとも10倍減少させる。例えば、本明細書に開示される方法及び組成物は、対照と比較して、APOC3遺伝子によってコードされるAPOC3タンパク質の発現及び／又は機能を、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、又は少なくとも10倍減少させる。例えば、本明細書に開示される方法及び組成物は、対照と比較して、ANGPTL3遺伝子によってコードされるANGPTL3タンパク質の発現及び／又は機能を、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、又は少なくとも10倍減少させる。

20

【0280】

【0324】いくつかの実施形態では、本明細書に開示される遺伝子改変方法及び組成物は、細胞におけるPCSK9遺伝子によってコードされる機能的PCSK9タンパク質の発現を、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.9%、又は100%減少させる。いくつかの実施形態では、この改変は、細胞におけるPCSK9遺伝子によってコードされる機能的PCSK9タンパク質の発現を、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1000倍、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍、少なくとも4000倍、少なくとも5000倍、少なくとも6000倍、少なくとも7000倍、少なくとも8000倍、少なくとも9000倍、又は少なくとも10000倍減少させる。いくつかの実施形態では、この改変は、細胞におけるPCSK9遺伝子によってコードされる機能的PCSK9タンパク質の発現を無効化する。

30

40

【0281】

【0325】本開示のいくつかの態様は、PCSK9 mRNAの成熟及び産生を防止することによって、細胞PCSK9活性を減少させる戦略を提供する。いくつかの実施形態では、そのような戦略は、PCSK9遺伝子内のスプライシング部位の変化を伴う。スプライシング部位の変化は、PCSK9 mRNAのスプライシング及び成熟の変化をもたら

50

し得る。例えば、いくつかの実施形態では、変化したスプライシング部位は、エキソンのスキッピングをもたらしてもよく、次いで、切断されたタンパク質産物又は変化したリーディングフレームをもたらす。いくつかの実施形態では、変化したスプライシング部位は、フレーム内終止コドンがイントロン内の翻訳リボソームと遭遇するとき、イントロン配列の翻訳及び早期翻訳終止をもたらし得る。いくつかの実施形態では、開始コドンが編集され、タンパク質翻訳が次のA T Gコドンで開始され、これは、正しいコードフレーム内にはない場合がある。

【0282】

【0326】スプライシング部位は、典型的には、イントロンドナー部位、ラリアット分岐点、及びイントロンアクセプター部位を含む。スプライシングの機構は、当業者にはよく知られている。非限定的な例として、イントロンドナー部位は、G G G T R A G Tのコンセンサス配列を有し、イントロンドナー部位コンセンサス配列内のG塩基と対合したC塩基は、本明細書に記載の方法及び組成物によって標的化されてもよく、それによって、イントロンドナー部位を変化させる。ラリアット分岐点はまた、コンセンサス配列、例えば、Y T R A Cを有し、式中、Yは、ピリミジンであり、Rは、プリンである。ラリアット分岐点コンセンサス配列中のC塩基は、本明細書に記載の核酸塩基エディターによって標的化されてもよく、以下のエキソンのスキップにつながる。イントロンアクセプター部位は、Y N C A G Gのコンセンサス配列を有し、Yは、ピリミジンであり、Nは、任意のヌクレオチドである。イントロンアクセプター部位のコンセンサス配列のC塩基、及びイントロンアクセプター部位のコンセンサス配列中のG塩基と対合したC塩基は、本明細書に記載の核酸塩基エディターによって標的化されてもよく、それによってイントロンアクセプター部位を変化させ、次いでエキソンのスキッピングを導く。本明細書に記載される場合、ヒトP C S K 9の遺伝子配列は、-22-kb長であり、12個のエキソン及び11個のイントロンを含有する。エキソン-イントロン接合部の各々は、P C S K 9 m R N Aの処理及び成熟を破壊するように変化し得る。

【0283】

【0327】いくつかの実施形態では、本明細書に開示される塩基編集系によって引き起こされるスプライス部位破壊は、P C S K 9遺伝子によってコードされるメッセンジャーR N A (m R N A)中のイントロン配列の包含をもたらし得る。いくつかの実施形態では、スプライス部位の破壊により、タンパク質活性を破壊する早期終止コドン又はアミノ酸の挿入／欠失をもたらすナンセンス、フレームシフト、又はフレーム内インデル変異を生成する。いくつかの実施形態では、スプライス部位の破壊は、エキソン配列の除外をもたらす。いくつかの実施形態では、スプライス部位の破壊は、P C S K 9転写産物におけるナンセンス、フレームシフト、又はフレーム内インデル変異をもたらすエキソン配列の除外をもたらす。カノニカルスプライスドナーは、センス鎖上のDNA配列G Tを含むが、一方で、カノニカルスプライスアクセプターは、DNA配列A Gを含む。配列の変化は、正常なスプライシングを破壊する。スプライスドナーは、アンチセンス鎖の第2の位置における相補的塩基のアデニン塩基編集によって破壊することができ(G TからG C)、スプライスアクセプターは、センス鎖の第1の位置におけるアデニン塩基編集によって破壊することができる(A GからG G)。

【0284】

【0328】更に、本開示は、機能獲得P C S K 9バリエーションの効果を相殺するための不安定化変異の使用も企図する。機能獲得P C S K 9バリエーション(例えば、機能獲得バリエーションは、当該技術分野で記載されており、高コレステロール血症に関連することが見出されている(例えば、Peterson et al., J Lipid Res. 2008 Jun; 49 (6): 1152-1156、Benjannet et al., J Biol Chem. 2012 Sep 28; 287 (40): 33745-55、Abifadel et al., Atherosclerosis. 2012 Aug; 223 (2): 394-400、及びCameron et al., Hum. Mol. Genet. (1 May 2006) 15 (9): 1551-1558(その各々が参照によ

り本明細書に組み込まれる))。これらの機能獲得 P C S K 9 バリエーションに不安定化変異を導入することで、これらの機能獲得バリエーションの誤った折り畳み及び不活性化を引き起こす場合があり、それによって、機能獲得変異によって引き起こされる過剰な活性を相殺する。更に、L D L - R 媒介性コレステロールクリアランス経路におけるいくつかの他の重要な因子、例えば、L D L - R、A P O B、又は A P O C における機能獲得変異も、当該技術分野で説明されている。したがって、本明細書に記載の組成物及び方法を使用して、これらの因子における不安定化変異を作製して、機能獲得変異の有害な効果を相殺することも、本開示の範囲内である。したがって、本開示は、P C S K 9 タンパク質の誤った折り畳み又は P C S K 9 タンパク質の構造的不安定化を引き起こす変異を更に提供する。

【0285】

[0329] P C S K 9 及びヒト起源のファミリーの他のメンバー及びいくつかの動物のポリペプチド及びコード核酸配列は、例えば、N C B I ウェブサイト又は E N S E M B L ウェブサイトから公的に入手可能である。例としては、以下の配列が挙げられるが、これらに限定されず、これらの配列の各々は、その全体が本明細書に組み込まれる。

野生型 P C S K 9 遺伝子 (N G _ 0 0 9 0 6 1 . 1)、ホモサピエンスプロタンパク質コンベルターゼサブチリシン-ケキシン9型 (P C S K 9)、染色体1上の R e f S e q G e n e (L R G _ 2 7 5)

G T C C G A T G G G G C T C T G G T G G C G T G A T C T G C G C G C C C C A G G
C G T C A A G C A C C C A C A C C C T A G A A G G T T T C C G C A G C G A C G T
C G A G G C G C T C A T G G T T G C A G G C G G G C G C C G C C G T T C A G T T
C A G G G T C T G A G C C T G G A G G A G T G A G C C A G G C A G T G A G A C T
G G C T C G G G C G G G C C G G G A C G C G T C G T T G C A G C A G C G G C T C
C C A G C T C C C A G C C A G G A T T C C G C G C G C C C C T T C A C G C G C C
C T G C T C C T G A A C T T C A G C T C C T G C A C A G T C C T C C C C A C C G
C A A G G C T C A A G G C G C C G C C G G C G T G G A C C G C G C A C G G C C T
C T A G G T C T C C T C G C C A G G A C A G C A A C C T C T C C C C T G G C C C
T C A T G G G C A C C G T C A G C T C C A G G C G G T C C T G G T G G C C G C T
G C C A C T G C T G C T G C T G C T G C T G C T C C T G G G T C C C G C G
G G C G C C C G T G C G C A G G A G G A C G A G G A C G G C G A C T A C G A G G
A G C T G G T G C T A G C C T T G C G T T C C G A G G A G G A C G G C C T G G C
C G A A G C A C C C G A G C A C G G A A C C A C A G C C A C C T T C C A C C G C
T G C G C C A A G G T G C G G G T G T A G G G A T G G G A G G C C G G G G C G A
A C C C G C A G C C G G G A C G G T G C G G T G C T G T T T C C T C T C G G G C
C T C A G T T T C C C C C C A T G T A A G A G A G G A A G T G G A G T G C A G G
T C G C C G A G G G C T C T T C G C T T G G C A C G A T C T T G G G G A C T G C
A G G C A A G G C G G C G G G G G A G G A C G G G T A G T G G G G A G C A C G G
T G G A G A G C G G G G A C G G C C G G C T C T T T G G G G A C T T G C T G G G
G C G T G C G G C T G C G C T A T T C A G T G G G A A G G T T C G C G G G G T T
G G G A G A C C C G G A G G C C G A G G A A G G G C G A G C A G A G C A C T G C
C A G G A T A T C C T G C C C A G A T T T C C C A G T T T C T G C C T C G C C G
C G G C A C A G G T G G G T G A A G G A G T G A A T G C C T G G A A C G T A C T
G G G A A C T G C A C C A G G C A C A G A G A A A G C G G G C T T G C C A T T A
T A G T G G G T T C C G A T T T G G T T T G G A A A A C A T G G G C A G C G G A
G G G T G G A G G G C C T G G A G A G A A G G C C C T A C C C G A G A C A G G G
G C G G G G T G G G A A G G A C G G C A G A T G C T G G G A G C A C G A G G C A
A T T T C T T T A T G A C A C A G A A C T C A T G C T C T A G T A T T C C A T C
T G T T T C A G C C G A A G A A A A G A A C C A G C T G A A G G G G C A G G G G
A G A A G G G G C G G A G G T A T T C T C G A G G C C C A T T G G C G T C C T T
T A G G A C T C A G G C A G G G A A G G G C C C T T G G T G C T C T G G A G C C
G G A G G T G G T G C G C C T G G T A C T G G G A C C C C G G A G C T G A G C C

10

20

30

40

50

C G G C G C C T C A G C C C A C C T G G C T G T C T G C C G A C C G T G T G C G
G G G C G A G T T T G C T C A A C A A C T C T G C C A G C T T C T G G C C C T C
A G G C T G T G G G A A G C T T C T T C C C G G G G C G A G A C C A C T A G C T
T T T T C T A A G T A T T A C C A G C C C A G G A C T T G G C T G A G G T T C T
G T G T C C C C C A G C T T G G A G T C A G A T G T G G G G T T G A A T C T T G
G C T T C C T C T C A C T A G C T G T G G T G C T T G A C A A G T C A C T T A T
C C T T G A G C C T C C A T T G C C T A A T C T T T A A A A G G G A G G T G A C
A A T C G T C C C T A C G G C T C A G T G G C A G C A G A T G G G G A G A T G A
A G G G A A A G T T C T G T T G A C C A T G A G T G A A C T T A C A A T G C A A
G C C C C G G G G G G A T C A C T T G C A G T T T T G T C C C T G T C T G C A G
T G T G A C C T G T T G G T G A C A T T G T C T T T G C T C C A A A C C A C A G
C T C C T G G G G C A G A G G G G A A A A T T C T G C C A C T C A C A G C T G C
C T G C C C A C G C T T C T G T C T G A G T G T G C T G G G T G G C A G G A T G
G C A A G T C C T T A C T C A G C T C A G T A T A G C C C T C T T C C T T G T T
C C C T G A G C C T T T G A C T T T C T C G A G G G A T G T T G T G G G G T T G
T G G C C A G G A T A A G A A A G G G C A T T T C A A G T T A C C A C T G C T C
C A A A A C A A C T G T T C T G G A A A T A G T G A G T A C C C C A T C C T G A
G A G G T G A G T A A G C A G A G G C T G T A T G A C C A C C T G A A C C A A G
C C C T T G A G G A T G T T T C T T C T C T G G T G G A A G T T T G G A A C A G
G A G C C T C C T C A A G T T C A T T T A T T C A T T C A T T C A A T G G T T A
T T T T G T G G G A A T C G A A T T T A G A A T G A A A A T A T T T T T T G G C
A A G C A G A A A A T A A T T T T T A G A C C A A T C C T T T T C T T T T A G T
C A T G A G A A A C T G A G G C C C A G A G A G A G G A G G T C A C C C C A G G
T G C A T T A G A A C T G G G T T T C C A G A A C T G A C A C T C C A C T G C A
C A G A G T A C T C T C C C A A T T C A T T C A A T T T T T A T T T A G C G G A
A G G C A T T T T C A G A T G G G T C T T T G A A G C A T T A G T A G G A G T T
C A G C G A T G A T G G T G T C A T G A G A A T T T T A T T C T A G G A T T A G
G A G G T A C C A T G A A C A A A G A T A C A G A G C T G G G A A A A C C A G A
G G T G G A A G A T A A G G A G C A C A T G T C C A C A G T T C T T T T T C T T
T T T T T T T T G A G A T G G A G T T T C G C T C T T G T T G C C C A G G C T G
G A G T G C A A T G G T G C A G T C T C A G C T C A C T G C A A C A T C T G T C
T C C C G G G T T C A A G T G G T T C T C C T G C C T C A G C C T C C C A A G A
A G C T G G G A T T A C A G G T A C C T G C C A C C A C G C C C G G C T A A T T
T T T G T A T T T T T A G T A G A G A A G G G G T T T C A C C A C G T T G G C C
A G G C T A G T C G C A A A C T C C T G A C C T C C T C A G T G G A T C C G A G
G A G G T G A T C C T C C C G C C T C A G C C T C C C A A A G T G C T C G A A T
T A C A G G T G T G A G C C A C C A C G C C T G G C C T C C A C A G T T C T T T
A T C C A C C G T C T G A A A T G T A A A A T G T T A C G A A A A C C A A A A G
T T T T T T T T G T G A T T T A T T T G A T G G T A G C A C C T G A C G T G A A
C T G A C A T G A G A T T A T T T T T A A T T T A G T T G T G T G A A T A T G C
A T A T T C A T A T A T T T T G C T G C A T A G A T T A C A G T A T G C A G C T
C C A G A T T C T T C C A A G C A G A C T C T G A T T G C C C A T T A C T G C C
T T T C T A A A A T C C A A A C A A G T T C T G A G G T T C A A A A C C G T T T
T G G C C C T A A G G C T T T G G G T A A A G G G G G T G G A C T C T G T T C T
A C T C T G A C T G G A G T C C A A G A T G C A T A T A T A C A G A G A T A T G
G G T G A T G G G G C T G C A A G G T A G G T T G A G G T A G G G G C C A A G G
A G G A G C A T G G A G T T T G G A C T T G A T T C A T G A G G C T G T G G G G
A G C C A G T G A A G G T T C T T A A G C A G G T A T G T C T G C C T G A G A G
C A G T T G G A G C A G A C A A G A G C T A A A A A C C A A A C A A A T C A C C
A T A G A T A G T G G C T G C T A T A A T T T G T T T G T C C C C T C C A A A T

10

20

30

40

50

50

TCTGGACCTGGGTCTCCTAGCTGCACCTGCACCTGCTGCCCC
ATGGGTTAATCAGCTCAGCATACCGTGGCTGAACAGCTAC
CTCATACCAAGGCCCTGTGGCGCCATGACAGGGATTGACAG
GGTCCCTGCCCTTGGAAACCCGCTAGTCTAAGTAGAGGGAGAC
TGACAAGTCAATGCCCTTCCATCAGTCTGCTCAACACACGCT
TTACCAAGTGCCTACTGTGTGCTGCAGAGGCGAAGATGAC
ACAGCTCAGGCCCTTTCCCTTGAGCTTACAGTTTCAGGAGGA
GAGACTGACCAGTGACTGCCAGTACAGTTGACTATGGGAC
AATGTGCTCAGCCCTTGGGGAGAGACGAAGAAGGTACCCGT
ATAGCACCCAGATGACAGGCCACGAGGCCCCACAGGCCAGGGC
AGCTGCTCAGAGGAGAGTAGGGCCAAGCAGAAAGGCCAAACAG
AAGGCTGCAGGCCATTTGCCATCGAGAGGCTGGACTTCAAAC
TGGGCATCATACCAGCCCTGGGTTCGAGTCCCTGCCCAGCCC
CTTATTGGCTGTCTAACCCCTGAGCAAATCCCTTTCACCTCT
CTGAGCCTCATTTCTCTATCTGTAAACCAGTTATAATAAT
TGGAAACATTCATTTAAGGACTAAATGAGGTCTGTGAAGCAT
TCAGCAGATGCTAGGTACGGAAACTCGCTGAAGTGGGGGC
AGGTTAAGAAGCCCTCTGGGGGATACGAAGGCCATCCAGGGAC
TAGTTGTGGCAGGAGGGCTGTTACCACTTAGGTCTGAAGGG
TAAGGAGAGGGGAATAGCTTTCCCTCTGCCCAGTTTGGAGCC
GGTGGCATGGAGGAGAGGGCTGCCCTGTGGGGGAATCACCCGA
GGGTTCACCGCTGCCATGCGCAGGGAGTCAAGGAGGTAGGG
AGGGAGTGGGGCAGATGCACACCATTTTTTTTTTTTTGG
AGACTCTGTTGCCCCAGACTGGAGTGCAGTGGTGGCCATATC
TGCACCTCTGCCCTCCCGGGTTCAAGCTCACTGCAACCTCT
GCCCTCCCGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCCTCAGCCCTCCCG
AGTAGCTGGGACTACAGGTGTGTGCCACCATGCCCTGGCTA
ATTTTTGTATTTTTTAATAGAGATGGGGTTTTCACCATGTTG
GCCAGGCTGGTCTCGAACTCTCGACCTCAGGTGATCCCCC
ACCTCGGCCCTCCCAAAGTGCTGGGGATTACAGGCGTGAGTC
ACCGCTCCCAAGCTGCTGATGCACCTCTTGTCCTTCTAACTC
CTGCTAGTGCCTCCCATTTGGCTGAGCCCAACTGGAAAGCTT
TGCAAGGGAGCTGGTGCTGCAGTTTGCACCTGAGCAGGCTG
GAGAAAGGCTGGAGAAATAGACTAGGGGACAAACCAGAAATTGC
CAGTGCTGTTATGTTCATGATTTAGGCATGGAGTCCAGGGC
CTGAGCTTCACTCCATGTCCATCCTGCCCCAGAGCCCTTGGC
ACAGCCTGGCTCCCAAGACAAGATGTCAAGTTTCAGAAATCCT
TCCTAAAAGGAATCCTCTATGCCAGACCCTGTTTGCAGGGA
TATGGGAGTGCTGGGGCTCCCAAGCCCTGATCAAGGAGCGAGA
AAACTCAGGCTCCTAGTCTGTCTCCGGGGGCACTAGCAGG
GACAAGGTGGGAGGGCTGCTGGGGCTGGGGATGTGGGGACAGG
TTTGATCAGGTAAGGCCAGGCTGTGGCTGTGTTTGTCTGCT
GTCCAAATGGCTTAAGCAGAGTCCCCCGGCCCTCTCTGGCT
TCTGCAGGCCCTTGAAGTTTGCCCCATGTCTGACTACATCGAG
GAGGACTCCTCTGTCTTTGCCCAAGAGCATCCCGTGGAAACC
TGGAGCGGATTACCCCTCCACGGTACC GGCGGGATGAATA
CCAGCCCCCGGTAAGACCCCCCATCTGTGCCCTGCCCCAC
CCCATCTGAGCTGAATCCATTTGCTCTGCCCTGGCCCTGGC
CTCCCTGCTGGTGGTTTCCACTTCTCGGGGGGGCTTTGGGA
CTCAGCACCTCCACTGACCCCTTTTCTGTCTCCCATCCC

10

20

30

40

50

CATCCCCTGCAGCCCCCACTGCCTGCTTCTCTGTTTGCCCC
ACAAATGC AAAAGTCTTGCCCTTAAATGATCCTCTTTTCTCT
TCTTTTCTCTTGT TTTCTCTTTTCTCACCATTTTGG AATGGC
CCAGCAGGCTGCACCTTACCTTGGGAAGGAGGGGTTCACTCTGA
TGGTGACTCTACCTAGGGGCCCCCAAGGCCTCTATAACTCCC
AGTGCCCTGCAGACTGGACCAGATCCTTTAATGGGGATAGA
CACAAACCCTGTCTGGGATGCCTCTGCTTACCTTCTCTGTTT
TGCTGCTCCACCTGCCTCCAGCTCCGTTTTGGCTTCTCTGGG
GCTCCCTGCTGCTGGGGCCACTTTGTGTCTTCCCTCTAGGGCT
TTCTTTTCCACTGTTCCTCTCTGCTGGTGTTGGCCTGGCTAT
GGAAGGGAGGGAGGGAGGGAGGC GGCCATGGAAAACGGTCTGC
ATTCTAGCAGGGACTTTGCAGGTGGCAATTTCAGTCGGGGGA
GACTCTAGATGCACCTGGCCTGAGGAGAGAATGAAGGGTT
CTAGTTGGACTGTGTTAAGTTTGAAGGTGCCCATGGTGTTGA
GGTCTGGAGCTCAGCGCAGAGATGATGCAATGTGGTGGGT
CCATGCAACATGGTGCCAGGACGCGAGAGCTTGGGGGTGAAC
TCAGCTTTTCACCCCCTTACC GGTTCTCGTGGGATCTTGGA
AGCCACTTTCTTCTATGAGCTTTGTCTCTTGTCTGTAA
AATGGGCAACATAACCCTGTCCCTGTCTCTCACAGGTTG
CTGTGAGACTCCAATGAGTTGAAGGATGTG CAGATGCTTT
TGGAAGTGAAAAGTTGGGGGGGCTACTGTGTGACTTTGCAT
ACACCCCAAACCTGTGTGACCTTGCATATGTCTGAGTTGCTG
CCATTGCAACAGATCAGAGCTGGTGGGGCTGGGGTGTTGGAGA
AAGGGTTTGTGTGGGGGGACATCCTCTGGGCAAGGGGTGGCAG
CAGCAGAAAGTGAGGGGGCCTGGTCTGGTCAATGTGTGCTGACC
CGGCCTGGGCAAGCCTGTGGCCAGGGAGAGGACAGCTCCTC
TGTAGGAAGAGCCTGTTCCTTTCCAACCAGGTGAGACCTC
TTCAGTGGAGCCCTGGAGCCCCCTGTACTCCACATCAGTG
CCTCAGGGACCTCCCCGGAGCAGGCTAATATCAGAGACCAA
GAGGGACACTGGGCAGAGGATCACAGAGACCC CAGTCCAGG
CAGGGACTGAGAAAGATCTTGGCCCCCTAAGTTAGTTTCTTA
GCACTGCTGTGACAAAATTACCACCCCCCTCGGTTGGAAACA
GTTGATTCTCTG CAGTCCTGGAGGGCCAGAAAGCCTGAATCA
GTGTCTGGCAGGACCACTTTCTCCCGGGGGGCTCCAGGGAG
AAGCTTCTCTTGCCTCTTCCGTTGTCCCAACAGCGGCAGCA
CACCAATCCCAGCCTCTGTCTTCAACACAGCCTTCTCTGTG
TCTCTCTCCTCTTTCATTGTCTCATAAAGGACACTTGTCTATT
GGATTTAGGGGCCCACTGGATCCTCCAGGATGATCTCATGT
GGGGAAACCTTAACCACATCTGCAAGGACCCCTTTTCTCAA
TAAGGTCAACAGCCACAGGTGTGGGGGGTTAGGATGTGAGT
GTATCTCTTTGGCAGCCACTGTTCCTCTCTCCCTTGGG
CCAGAAGCAGACGTGGGGGCCCTTTCTTCCCCATAGGATGC
CCATGGATTGCCCCCCCTTCCCGCTTCCCCCGAGTGCTGT
GGGAGGTGGCAGGAATGGCAGGCAGGGGTGTGGAAACCCCT
TCTGGAGTCAATACAAGGGCTTGGCTGGAGGAAGTCTCTC
TGGAGCTGTGTGGGCTGGCATGGGGCAGGCTGGCTGGGGCC
AGCAGCAGCTTCTTTCATTTCATGGGGGAGGCCACAAGCATGG
GCCCTAGAGCTGGCTGCCCGCCCTCAAACCCAGACCCCTGCA
CTCTTAACCTGTGTGACCTTGCATACGTCACTCACCCCTCTC
TGATCTTCAAGGTTCCTCTGCAAAAAGGGAGGTAATGATAAC

10

20

30

40

50

CCTCACTCTGGGGGGCTGTTTGGAGGGTTAAATCAGTTAT
TGCTGTAGCATGCATTTCTCTGTCAGGTATTGAGTGAGGT
GCTGTGATTTTAGCCCTGCATTTTCTTTTCTTACCATTTC
AATAATAACGTTTTTGAGCACCCACTGTGCGCCAGGGCACC
TATTAGGTGCTGGGGGATACAAATGTGAATGAAATGAATGT
GGTCTCTTCCCCCAACAGTGATCCAGAAAGATTAAATCCAT
TCCTTAACAATAATGCTACTTTGACACAGATTAGTTCTGGAT
AGGCTGAGAGCTCTGAAGGAGTGCAGGCAGCTGCGAGCCT
GTGTATCCAGCAGAAAGGATCAGGAAGGATTCTCTGGAGGA
AGCGCTGTTCTAGCCAAGACCTACGGGGGGCATTTATTAACC
AGGCAAAGGGGGACGGTGTCACAAGCAGTGGAATGAACGTGG
ATTGAAGCTGTGAGGCGAGGAGGGAGTGTGGCCTGTGCAGA
AGGGACCGAGGCTGGTGAGACCAGGAGGGCCTGGGGTGGCC
TCCAGGTCAGATGTGAAAGGAAGAACTTTGGCCACAGTCTG
AGCTTCTCAGGCGTATGGCAGGGCTGCTCTGGTGAGAGGGA
ATGAGCTCCCTGCTCTGGAGGTATGCAAGCAGGACTGGGGC
TCTCACCTGCCAGAGGCCACAGAGCTTTCCAGAGGCTGGA
AGAGGCCACTCCAAGGCCCTCTTTGCCCCCTGAGAGTGGTGG
CTCTTCTTGAGGGCCACCTTTGCCACGCTGTACAGGGGAAC
AGCAGCCCCCTGCTCTACCCCGGGGGTTTGGAAAGATAGAGGG
AGGCCTAGGAAGGGGCCCTGTGTCTCATCCGAGCTGGGGCCC
CTTTCCAGCCTCTCACTGGAAGGAAGCCCCAAGGATGTTCC
TGTGGGGGGCTTTTACCAGGCCCCACCTGCCCTCTGCTGGCC
ATGCTTGCAGCCTCCTGACCCCTGTCCCAGCAGGACAGTGG
GCTGGTGAGAGCGGGCAGGAACCGCCTGCACCTTAGAAAGGT
GTGGGGCTGCTCTCCCCGAGCTTCCATCTGCCCGCTGGGGGCC
ACACCCCAAGGCCCAAGGGATGGGACCCCAACAGTGGTCA
CATCTTGCAGCAGAAACCCAGGTACAGCTCCTGGAGCAGAT
GGTGGTCCCAAGCAGCGGGTGGGACCAAGAAAGGACTCTCAC
CTGGGGCTAACTCAGCTGCAGCCTCAGTTTCCCTCCTCACAC
ACGACGAGGAACATGGACTGGAAAGCCTGCCCAAGCAGGCC
TCTGCTCGATGTGCGTTGTGTGGCTTACGTCCAGGGAGGG
AAGCAGCCTCTGTGCTGTCTTCTAGATAAGCCTGTATTCC
CCGGGGCTGTCTGCCAATGTATCCAGTTGTCCCGTCAAGCCT
GGAAGCTCTGAGGGGAAACCTTTGGGGCTGCTTCTCTGAGCAC
CTGTATCCCCCTGCAGCCAGCCCCGGGGCCTCTGCTAGGAGC
AGACTGAGCATGGCTTATGGGGCCTGGCACCATCTGGCCTC
TGCCCAACCTTGCTGGCCCTTGCTCTTGTTGTCTGCCCCCTTCGA
CATTCATAGCCCCAGCTCAATATCTAGTTGGTTCTCTTAGG
GTGGCGAGCACTGTTTGGTCTCCAGATGTCTTCAAGGTCTGG
AGCTCACAGCGCTCTCAGCCACCCCCCTTCCCAAGTGTAGCAC
CGGGCACATGGTAGATGCCCTATTGATGAGTGAAAGCTCCT
AACACAACCTCAGAGAGGCAAGGACTCCGCGCTCATCCCAAGC
CTGGGGAGGAGAGGCGAGACTGCCAAGGACCTGCTCAGCATG
CTACAGAAAGAAACCAAAAGTGCCCAACGGGACTGATCAGTGG
AGCTTCTCTGCCGAGACTGGAGGCTTAGGGCAGGGGTAGAC
AGTGTGTGTGCAGGCTGGGGGACTCACAGTTCTGGGACTGTGC
CCAGACCTACTAGCATAGTTGGGTGGGTGGGAGGATGCGGG
ACTGGGGGGCCGACCTTGCTCTGAAATTCATGTGGGATCTCA
GAGCAGCCACTGAATTGCTCTGTAGGGGGCTAAATAGTGG

10

20

30

40

50

CCCCCACAGATACACACACCCAGACAGAGCCTGTGAGCCA
GACCTTATTTGGAGAAAAGGTCTTTGTAGATGTAATTAAAG
CATCTCAAGATGGCATCATCTGGATTATGCGGTGGGCTGT
AAGTCCTGTGATGTGTCTTTATGAGAGAAAAGGCAGAGGGA
GATTTGACACACACAGGAGGGGGCCACGTGGAGACAGAGGT
GGAGATTGGAGAAAATGTGGCCACAAGCCAGGGAACACCAG
CAGCCACCAGAAGGCCGGAAGACGTGAGGCAGGGTTCTTCC
CAGAGCCTTCGCTGCTGAGTCTGGGAATTTGTGACCGAAG
CCATAAGAAGTGGGTACACGCCCTGAGCCTCCCCACACTTG
CTCACCTGTCTCTGAGATGAGAAATCTCTACTCTGCAGCATA
TTTGGAGGATCACTGCGGGGGGCCACAGAGGTGCTGTTTCAG
ATGGCACTTTCAGAAAGACTCAGGAGAGCCCTGGGGGCAGGAGC
AGTTTGA CTGACAGCCCAGAGGGCTGCCCTCTGATTCCAC
CTGAGGCCCTGCTTTTCTCTGGCTGCAGGGGGTTCCAGGGGCC
AGGCCATTTCGCTGGCGCAGGACTCTGCTAGCAGCAACC
TGCCTGAAGTCTTCTCTTTGGCCTGGCTGAGAGTTTCTGAG
ACCTGCGCTGGAGCGGAGGTGCTTCTCTTCTCTTCTCTT
TCTTCTCTCTCTCCCTTCTCCTATCCAGCAGGCTGGACCTGC
CTGGCATCTGTGAGCTCTCCCTACTTTCTCCTATACCCCTA
ACCTTTTGTCTCTGCATGGGCGACTCCCCCAGTGAGTCTCTT
GCAGCTTTTACCCCAAGTGCCCTGCTTCTTGGAGAAATCCAAA
CTGATCCAGTTTAGGGATGATAAAGTGTAAGGGTAGGCGCTC
GGTGACTGTTTTCTCTGAGGTGTGTGACTCGTGTGAGGCAG
AAGCAGTCCCCGTGAGGCCCTCCTGGTATCTTTGTGGAGTGG
AGAACGCTTGGACCTGGAGCCAGGAGGCCCAGACATACAT
CCTGTCCGAGCTGCAGCTTCTCTGTCTCTAAATGAGCCGG
CCAGCGCAGGTGGCCAGACATCACTGTTATTCTCCTTTGA
GTCTTTTAAATCTTGTGTCTTTCTTGCAGACTCGGTGAGC
TGTGAAAGGCTATAAATAGGGGGCTTTATTTTACACTTTGAT
ACTATTTTTTTGAACATTTCATATTATTGTTAGATATTGATA
TTCATATGAAGGAGCAGGATGACTTGGGTCTTCTTGGCA
GTAGCATTGCCAGCTGATGGCCTTGGACAGTTACCTGCC
TCTCTAGGCCCTCCCTTTCTCTGTCTATGAAATACATTATA
GAATAGGATGTAGTGTGTGAGGATTTTTTTGGAGGTTAAAC
GAGTGAAATATATTTAAAGGCGCTTTTACCAGTGCCCTGGGAT
GTGCTCTGTAGTTTTCTGTGTGTGTTAACTATAAGGTTGACTT
TATGCTCATTCCTCTCTCTCCCAAAATGTCGCCCTTGGAA
AGACGGAGGCGAGCCTGGTGGAGGTGTATCTCCTAGACACC
AGCATACAGAGTGACCAACCGGGAATCGAGGGGCAGGGTCA
TGGTCACCGACTTCGAGAAATGTGCCCGAGGAGGACGGGGAC
CCGCTTCCACAGACAGGTAAGCACGGCCGCTCTGATGGGAG
GGCTGCCCTCTGCCCATATCCCCATCCTGGAGGTGGGTGGG
GACTGCCACCCCAAGAGCGTTGCAAGCTGTACTCCTGGGTG
CACCCCCCCCCAGCTGTCACTGTCCCCCTCCTGCCATCAGT
TGTGGGAAGGGCGTTTCATCCATCCAGCCACCCTGCTGATTT
GTTATAGGGTGGAGGGGGGGTCTTTCTCATGTGGTCTTTG
TGTTCTGTCGAGCAGGCCAGCAAGTGTTGACAGTCAATGGCAC
CCACCTGGCAGGGGTGGTCAAGCGGCCGGGATGCCGGCGTG
GCCAAGGGTGCCAGCATGCGCAGCCTGCGCGTGCTCAACT
GCCAAGGGGAAGGGCACGGTTAGCGGCCACCCCTCATAGGTA

10

20

30

40

50

GTGATGGCCCCAGACGCTGGGTCTCTCTCCATCTGGACCTG
GCCTGGGAGGTGGCTTGGGCTGGGGCCCCAGGGAGAGCTAAT
GTCTCCTAACCAGAATGCTGTGGCAGCCTCTGCCGCAGAG
GCCAGAGAACCAAGAGTGCCAAGGCTGGCAGGGGTTCCCAGT
GGCCACGAGTGCAGATGAAGAAACCCAGGCCCCCAAGAGGG
TCATGCAGGTAGCCCCAGGGAGTTTCAGCCTTGACCCCTGGGT
CAATGACCTTTCCACAGTTCCACACTGCTCCCCCTTTTAA
ATCCGGTGATGTCTTTATGTCTTTTGTATATGTTATCTTCA
ATGTGGAGGGACTCGAGGTGATCTAAGCAAACCTTTTCTA
TCTTCTGCTTGCATACCTCTGAGACCAGGGGACTCACTCA
CTTGCAATGACTGGGGCCCTGCAGGTACACACTGGGCCAGGCAG
ATGTGGTGGAGGGAACCTGGCAGAGGACTTTTTTCTAGACTGT
GACTACATTTAGTCCACCCAGCGGGCCCCCCTATGAAGTCC
AGTTGAGAACTAGGACTCTGGGGGGCCGGTGGACAGAGAAAG
AGGGAGGGGTCTCTCCCTTACTGACTTCTCTTCTGTGGCCA
GACATTGAGCAAAGGCCCTCTGTACAGCATGTCCTGGGGGCTG
GCCTTGCCGTAGCTGCTAAATAGTTTGACGAAACCAAGTCCA
GAGAGGGGAGGTGACTGCCAGGGTCTGCACAGCTCAAGCTG
GGGAACCTCGCTGGGAAAACTGTCAAGCTCTGGGGCAGCAGCT
TGACTTCCACTGTAAAGCCCCAGCCCCCAGGGTCAAACACT
GGCTCTGGTGCTGGCAGAGGCGAGCCCCACTAGCCTGTTTCA
AAGGCTGAGAAAGGCCCCAGGAGTCTGCCCTGTGCTCCACCA
GTTCTGCCCTGAGACTTTCCTACAGAGTACAGGTTTGTGAT
GTTCAAGTTTTTAAAGGCCAAGAATCAATAACCTTCTGCCCCA
TCAGGTGACCCCTTGTTGCTGTCTCCACCCCTTTATTGACT
GACCTCGGGCTCAGTCAAGGTCAAGTTCTCTGAAGGTCAAGTGTG
TGGAGGGGAGGGCTGTTCTTTCCCAGAAAGGCCCTTCCCCAG
GCCTGGTGCTCTGGCCCTCTGGAGGACTTCTCTGGAGAAAGTCT
CCTTCTTTGGGGTCCCCAGTCAAGTGTATGGGAAGCCCTTAT
TGCAATGACCTGGGCACGGGGGCGAGGGGCTCAACAGTCACTAT
TGCCCTTCTTGGCCACTGCCATTTCCTCTCTGTAAAGCAGG
TGATTGTGTGTCCAGTCTGAGCACAGAGATAAGCACACAG
CAGGTGCTTAATAACTAGCAGCTGTAGGCTGGGGCGCGGTG
GCTCATGCTGTAAATCCCAGCACCTTTGGGAGGGCCGAGGTG
GGCAGATCACCTGAGGTCAAGGAGTTTCGAGACCAGCCTGTT
CAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAAATACAAAAAAT
TAGCCAGGCATGGTGGTGGGTGTCTGTATCCCAGCTACTT
GGGAGGGCTAAGGCCAGGAGAAATCGCTTGAACCCAGGAGGTG
GAGGTGTCAGTGAGCTGAGATCGTGGCCACTGCAATCCAGC
CTGAGTGATAGAGCGAGATTCCATCTCAAAAAATAAATAAG
TAAATAAATAAGCAGCTGTAAATGTGGCTGTTGTTCTTCA
CTCCACACTCAGTGCCACTCCACTCCCTCCCTCCGTGGTG
TGAGGGGGCCTCACTAGCTGTCTCTAGGAGGAGCATGGCT
GTGAGATTCCAGCTCCATCCTTGGCCACGGCTCCTGGAGA
CATCTTAGAGGCCAGGATCCAGAAAGGCTCCCAACACCTCAT
TTGACAGGGGAGAAAGCTGTCAAGTTCCAGGTCCCCCTTGCA
ATCAGGGGCCAGAGCTGCGTTAGGCCCTCCAGTCTCCAGGCC
ACTGGGGCCAGAGCTCACAGGCTGGCAGAGGGTTAGAACTG
TTACTGGTGGCTGGGTGCAGTGGCTCACGCTGTAAATCTT
AGCACTTTGGGAGGGGCAAGGCCGGGAGGATCATGAGGTCA

10

20

30

40

50

G A C A T C G A G A C C A T C C T T G C T A A C A C G G T G A A G C C C C G T C
T C T A C T A A A A C T A C A A A A A A T T A G C C G G G C G T G G T G G C A G
G C G C C T G T A G T C C C A G C T A C T C A G G A G G C T G A G G C A G G A G
A A T G G C G T G A A C C C G G G A G G C G G A G C T T G C A G T G A G C C G A
G A T T G C G C C A C T G C A C T C C A G C C T G G G C A A T A G A G C G A G A
C T C C G T C T G G A A A G A A A A A A A A A A A A A G A G C T G T T A C T G
T T G A C A G T A G C A T G A G G T A G A C C A T G G C C T G C A C C A A A A T
G G G G G A G T G G A G T G C C A C T G A G G C C A G A A G G A A C C A C A C C
C T C A A G G G T G G G G A G T T A T G G T A T G G G G G G T C C T A G G C A T
G G A G T C T T T T A A T T C T T T A G A C A A T C C T G G G A G C A A C T G T
C C C T G T T T C A C A G A G G G C G G G G C C A C A C A G C T G G T G A G T G
G G C A G C C A A G A C T C T G T T C A A G T T T G T G T G G G T C C A A C A C
T T G C G G C C A C G G T G G A G G G G C A T C T G A G C C A G G C C T C A G A
G A G T G G C G G G G G A A G T T G G G T G G G G A A G T G T G C C C T T C T C
A T T C C T C T G A G G C T C A T C C T C T T G G T G C C T C T C T T T C A T G
G A A A G G G A T A A T A A G G T T A T T G T G A G G A T C C C C T G A G T T C
G T A T A T T C A G A C G C T T A G A C A G A G C C A G G C A C A G A G A A G G
G C C C G G G G T T G G C T A G T T T G A T T G C T G G T G T A A T T G C T A A
T A T C T T C C A G T T T G T A T T G G T C A A G G T T C T G C A G A G A A G C
A G A A C C A G T A G G A T G T A T A T A T T A A G A G T T T C A A G C T C A T
G T G A C C G T G C G G G C T G G C A A G T C T G A A A T C C G C A G G G C A G
G C C A G G C A G G C T G G C A A T T C C T G C A G A A T T T G A T G T T G C A
A T A C T G A G T C C T A A G G C A G T C C T G G G G C A G A A T T C C T T C T
T C C C T G G G A G G C C T C A G T C T G T T C T C T T A A G G C C T T C A A C
T G A T T A A A T G A G G C C T G C C C A A G T T A T A G A G A G T A A C C T G
C C T T A C T C C G T C T T C T G A T T T A A A T G T T A G T C A C A T C T A A
A A A A T A T T T T C G C A G C A G C A T T T C C A C T G G C T T T T G A C C A
A A C A T C A G G C C A C A A A G T T G A T C C C C A A A A T T A A C C A T C A
C T C T G T G C C T G T A A G G G A G G G G C T G G G A A A G G G G A G C A G G
T C T C C C C A A G G G G T G A C C T T G G C T T T G T T C C T C C C A G G C C
T G G A G T T T A T T C G G A A A A G C C A G C T G G T C C A G C C T G T G G G
G C C A C T G G T G G T G C T G C T G C C C C T G G C G G G T G G G T A C A G C
C G C G T C C T C A A C G C C G C C T G C C A G C G C C T G G C G A G G G C T G
G G G T C G T G C T G G T C A C C G C T G C C G G C A A C T T C C G G G A C G A
T G C C T G C C T C T A C T C C C C A G C C T C A G C T C C C G A G G T A G G T
G C T G G G G C T G C T G C C C C A A G G C G C G G G T A G G G G G C G G A G G
G C G G A G G G C G G A G G G A G G G C G G G C G G G C A G G C G G G C T T C T
T G T G G C A C G T G G G C T T C T T G T G G C A C G T T C C T G G A G G C C G
A A C C C T T C T G G C T T T G G A A G G A G T C G T C A G A G A C C C C C G C
C A T G C G G G A G G C T G G G G A G G A A G G G G C T C G A A A C C T C C A T
C A T C G C A G A G T C T G A A T A G C A G T G G C C C C G C C A T G C G C C C
A C G T A G C G G C G C C T A C G T A G C C A C G C C C C C A C A C C C C G T C
C T G G C C A C T C T C C C T C C T G A A G G T C T T C T G G T A C C C G C C C
C C T C C C C A T C T C C A T C C C C A G G C C C T G C G T C C T C T G C C C A
A T A C T C T T T G G G C C T C C C T G T T G T C C A G C T C T C T C C G C G G
C T C C A T G A C T G A C A A C T T G A G C A A G G C T A A T G T G A A T G G G
A G C G G T T G A G G G C T C A G A C C T C T C A C C C G A G G A A C A T C C A
C A G A G T G T G C C G C A T G C C C G G T G C A G T G T G G C T G C G G G G A
C A C A G A C A C G G A G C C T C G G C C C T G A G G A G C T G G G G G G C A G
T G A C C G T C C C T C C T C T G A C C C A C C A C T C C T C C A G T G T C A G

10

20

30

40

50

G A C A C T G C G G G T A T C T A G G G G A A G G A A T C T T G T T C C A C T T
C A A G T C T G G A A C T T C A A G T C T G T G T G T G T G C G T G C G C G C G
C G C G C G T T G G G G G T G G G G G T T G C A G A G C A G A T G C G T A C C T
G A C A G C G G T A A C C T A G G T C C C C C C T G G C C T A T C A A G G C T T
C C C T G G C G G C C G A A T T T A A A G G C A T C A A G C A A A C A A A G C C
C A A C A C A T C T C T G C C T T G T C C T C T C A G T T T C C C C C C G T G G
C A C T T A G A A C C A C T T G A T A C A C C G A A T A G T T T C C T A T C T C
C C C C A C T A G G A T G T A A A C T C C A C A G G G G C A T T G G G A A T G C
T G C C T G G C T A T G G T A G G G A C A G A G G G G A G C A C C A G G G C G G
G G C A G G G G T G C C A G A G T T C T G C C T G G G C A G T C A G A T T T T C
C T T A G G A G G G G A C A T T T G A G T G G G A C C C A A A C A G G T G T A T
A G C A G T T G T C C A G C C C A G C T G G C A A G G C C T G A G T C T G C C T
C T G C A A C C C C T C T C T T G G G C T C C T T T C T C T G C C A C C C A C C
T C C T C A C C T T T C C A G G T C A T C A C A G T T G G G G C C A C C A A T G
C C C A A G A C C A G C C G G T G A C C C T G G G G A C T T T G G G G A C C A A
C T T T G G C C G C T G T G T G G A C C T C T T T G C C C C A G G G G A G G A C
A T C A T T G G T G C C T C C A G C G A C T G C A G C A C C T G C T T T G T G T
C A C A G A G T G G G A C A T C A C A G G C T G C T G C C C A C G T G G C T G G
T A A G T C A C C A C C C C A C T G C C T C G G C C A C C G T G A T G C T A A C
A G C C C C T T T G G C A G T C A G G G T C T G T G C C G G G A C C T C C A G T
G C C A G G C T C T G T G C A G G G G G A C C A G A G A T G A A G T A G G C C T
G A T G G T G C C T T C A A G G A C A C T C A G T C T G A T G A G G G A G G C G
A G T G C A C A G A G G A A A C A C G A G G T C A G G G C T G T A T T A G A G G
G A G C C C A G A G G A G G C A C C T G C C C A G C C C G A G G G T C A G A G A
A G G C A T C T T G G A G G A G G G A C A T T T G A T C G G G A G C T T G A T G
G A T G A A T A G G A G T T C A C C T G G C C G A T A A G A C A G C A A C T A C
C A A G G C T T A G A G G T G T G A G A G G A G G C T G T C T T A C C T C A C T
G A G T A A G G A C T G C A G G C G G C T T A C C T T C G A G A A G A G A G C T
T A G T G T C T G T G T G C A C G T G T G T T T G T G T G T A T G T G T G T G C
G T G T G T G C A C T G G C A G G A G T C C C C T G C T G G G G C A G G A G G G
C C G G G C C A T C A C C A T C T T T C A C C A T T C A C C C C T G C A C C A G
G C A T T G C A G C C A T G A T G C T G T C T G C C G A G C C G G A G C T C A C
C C T G G C C G A G T T G A G G C A G A G A C T G A T C C A C T T C T C T G C C
A A A G A T G T C A T C A A T G A G G C C T G G T T C C C T G A G G A C C A G C
G G G T A C T G A C C C C C A A C C T G G T G G C C G C C C T G C C C C C C A G
C A C C C A T G G G G C A G G T A A G C A G G A T G G C A G G G T G G G C A A G
T C C A G G C T G G G G C T T G G G A G G T C T G T G T G A C C T T G A C A G T
C T C T C C C T T C T C C C T T G T C T G T G T A A G G A G G A T G A C G C C A
C C T T A A A T A G G A T T A A A T G A G A A T G G G G C T C T G A A A G G G C
T G T G C A A T A T T T T C A T A A C G T G T T T T T A T A G A G A C A G T T G
A G T A T G T T C T T T A A G C C C T C C T C T C T C C T A C C A T G A A C T A
A A G A T T T C T G T G G A G G T C C C C T C A C T C C C A G C A C C C C C T C
C T C A T C C C A G G C C C T T T T T G C A G G T T G G C A G C T G T T T T G C
A G G A C T G T A T G G T C A G C A C A C T C G G G G C C T A C A C G G A T G G
C C A C A G C C G T C G C C C G C T G C G C C C C A G A T G A G G A G C T G C T
G A G C T G C T C C A G T T T C T C C A G G A G T G G G A A G C G G C G G G G C
G A G C G C A T G G A G G T G A C T G T A C C C C T C C T T C G T G T G T G T G
T G T G T G T G T G T G T G T G T G T G T G T G T G T G T G T G T G T G T G
T G T C A G T G C T G G G C C C T C A G G G A C C C C C A G C A A G C C C C T C
C A T C C T C C A G A C T C C A G C T C T T C T G T A A G C T T A C A G G G C T

10

20

30

40

50

GGCCAGACCAGGAGTGGGGCACTCCTCACTTCAACGGCGGCT
GGGGGCTGCTGGAGAGAGCCACAGCGGGGAAGGGTTTCTTA
GAGGCTGCAAGGACAGTGCTGGATGGATTTTCAATGCTCAC
CTGGGTGTGAGCGTGCGGGCAGGGGCCGCGTGAGGGGTCAAGCG
ATCTGCTACTCTGGACTCAGCCATCTCTAGGCCCCCTCTCA
CTCAGGTGCTCCATGGTTCTGGGAGCTGAGAAATCTCAAA
CCAGCAA AAAAGTGGAATTGATGTTGATGCTACAGGATAG
TGCACAGATGCCATCTGGTTG CAGCATTTTGGTGGAAAGGG
CAGTGCC CAGCTAGGAGAGTGAGGAGGGGGCAGGCCATTTCT
GGCTTGAAGGAGATGGGGTCTTAATGCTCGTG TGAGAGGCA
GAGTGGGTGAGAGTGAGAGCTGGCTGGATCCTTGCTTTGGCC
TCCTGGATTTCTCTCTATCTCCATTTTGA AACCACTCTGT
GTTTGGAAAGAACTTTTGAGTATTCAGAGCTGCCCACTGGC
AGAAACAGTCTTCCCTTGGG CAGGAGTGAGCTCCTTGTC C C
AGAAAGGCTGGGTCTGGCTGGCC C C C TGGCAGGGGACACTGAT
GAGGGTGCTTGAGTTGATCCTGTCTAGTCCCTTTCTGTGT
TTTCAAAGCCCATTTCTAAAGCAGATTCCCATTTTCCGTCTT
TGACTCTAAGGCCCAAGGGGGGCAAGCTGGTCTGCCGGGGCC
CACAAACGCTTTTGGGGGTGAGGGGTGTCTACGCCATTTGCCA
GGTGCTGCCCTGCTACCC CAGGCCAAACTG CAGCGTCCACAC
AGCTCCAC CAGCTGAGGCCAGCATGGGGACCCGTGTCCAC
TGCCACCAACAGGGGCCACGTCTCTACAGGTAGGAGGCTGG
GCTTGCCCTGGGGGTGAGGAGGGGGTCTCTTTCTCCTTATGC
ACCCACTGCCCGCGAGGGCTTGGTCTCTACAAGTG TGATCC
ATGAGACTCAAGCCTGACTTTGCAGTTTCCATACTCTGGTTCT
TGCCACTTCCATGCCCTTTGAGCCTGGGGCAGGTGACCTTA
CTTCTCCTCATCTCAGCTTCTCTCCTCCATAAGAGGGGAAAA
AGGTATTACCTGCCCTCATTTGTGTTGCAAGGAGATGGGGCAG
CATCTAGGGCACTGGCCCTGGAGTATCGCAGGTGCTTTTGCC
TAAGGTGGTG CAGTCCAGGAGAGGGCAGCTCCAGAGAGAGG
CCCCCGGCTGGGGCTGAAAGGAGGGGCAGACCTCGGGTTTGA
ATTTCAACCCTGCCGCTCTATAGCTGTGTGACTTTGGGGCAA
TTACTTAACATCTCTGTATGAGGAAATGATGAGTGCTAAG
CACTTAGCTTAGTGCCCGGGACAATAATAAATTCTAGCTATC
GTTACTATTGTTTTTCATCACCCGTTTGCTTTTAAAATCCAGC
CTCTGGTATAGGCAACTATTGACGGGGCTACCCCTGTGTGCGA
AAACATGCC CAGGCAGGTAGCAGGAAGTCA CAGATGGGGGA
CCTCTTGGGGCATCAAGGGATGGTGCCCTGAGGGCTGAGCT
GTTCTGGTTTGGGTGGAGCATGAGAGGTCTGGGGAAGACAGT
GGGACTCCAGCCTGGAATAAGAGGGCTCAGAGTTGATTTCTC
GTCTGAGCACGTCCAGGGGGAACCACTGAGGGTTTGGGGAAC
AGGAGAGTGAGGGGTGAGAACTGGTTCTGGGGCACAGCAGG
CTGGCATGTAGGATGGATGTT CAGGAAAGATGAGCATAGT
CAGGTGGCTGGTGCCCTTGTCCAGGGGGAGAGGGCTCCGTCA
GGTT CAGGGGTCTCTGGCTTGGAGGGGAAGTCCGCCATGCTC
TAATCACGCTCCCCCTTTGGAAGTGCTCAGCCGATGAGCTC
ACAGGCACATGTCAGTTTGAAGTCA TGGAATCTGACTCCA
TGAAGCGCACCTCAAAGAGCACCATTTTGCAGCTAAGGGA
ACTGCAGGCTGGACATGCTGAGTGGCTGCCCCGAGCCCTT
GCAGCTAGGACATAGAGAATGCTAGTAACCAACAACCCCTAC

10

20

30

40

50

C A T G T T C A G A G C A C A T G C C A G G C T C C A T G C T G G G G C T T C G
C A C G T G T C A T C T T C A C A G T G T C C C T G T G A G T A G G T G T G G T
T T C T C T T T C C A T C T T A C A A A T G A G T A A A C A G A G C C T C A G T
G T A G C T A A G T A A C C A C T A T T T T A G G T T T C T T A G C C A A T G G
G T G T G T C T G A C T C C T A A G C C C A T G G A G G G C A T T C T G A G G T
G G T T C A G A C A G A C C C C G G C T T A C C C T T G A A C T T C T G C C T G
C T G G C T G C A T A G G G A G G G G C T G G G G G G A G T T T G A G C A T C T
C A G G C C A T A G A G C C C C T G C C T C A C T G T C T C C A T C T C T G G G
T G G A A A G A T G G T G T T T T C C C T G A G A A A C T A A G G C T C A G A G
A G G T T G A A T G G C T C T C C C A A G G T C A C A C A G C T G G T C A G C T
G C A G A G T T G A G A A C A C A G G A G T C C T G G T G C T C A G G C C A G C
A T C T C T T T T T T T C T T T G A G T T G T T T C T A G G T T T C C T A G C T
C T T G C C T C A G A C C T T A A A G A G A G A G G G T C T G A T G G G G A T G
G G C A C T G G A G A C G G A G C A T C C C A G C A T T T C A C A T C T G A G C
T G G C T T T C C T C T G C C C C A G G C T G C A G C T C C C A C T G G G A G G
T G G A G G A C C T T G G C A C C C A C A A G C C G C C T G T G C T G A G G C C
A C G A G G T C A G C C C A A C C A G T G C G T G G G C C A C A G G G A G G C C
A G C A T C C A C G C T T C C T G C T G C C A T G C C C C A G G T C T G G A A T
G C A A A G T C A A G G A G C A T G G A A T C C C G G C C C C T C A G G A G C A
G G T G A A G A G G C C C G T G A G G C C G G G T G G G T G G G G T G C T G C G
T G T C T C T C C T G C A C A G C T T T T C T G T G T C A G T T T G T G C C A C
C A C C A T A C C G C C A T G C A T C A G G G T G G C G G T T T G C C A G G T A
G A T G C T G T G G G C A G C T T C C G C C A T T G T G T G G A C A G C A T G T
A T A T G T G T C T C T G T G T G G C T G G G T C T G T T T T T G C T T T T G T
C C A G A T C A G T A A G G T T T G C T A C C T G G G T A C C C C A C T C C A C
T T G G A G T A G A A T G T G C A T A A A T A T G G C A T A A A G A A A T G C A
A T A T G C A T G C A T T T A T T G A T T G A T C T A T T T T T T T C T G A G A
T G G G G T C T T G C T G T G T T G C C C A G G C T G G T C T C A A A T T C C T
G G G C T C A A G C A A T C C T C T G G T C T C A G C C T C C C C A A G T G T T
G G G A T T A T A G G C A T G A G C C G C T G C A C C T G G C C T C T C T G A T
C T A T T T A A C A A A C C T G C T G G G A G G G T C T C A G G G T C A G G A G
C A G C A C T G G G C T C T G A G G A C A C A G A G C T C A C T C A G C C G T G
A C C C A G A G G G G G T G C C T G A G C T G C A T G C T G A A G G T T G T T A
G C A T G A C C A G C A A G G C A A G A A A A G G C C C T G C C G A G A T T A G
C A A G G C A T G T G C C A A G C C C T G G A A T G T G A C A G C C G G G C C T
T C T A G A A A C C T G A G T G T A T A A C T C T C C T T A A A A G C C A G T A
G G A G C T C C T C A A A A G G C A G C C C T A A G G A G T C C A C T C T T A A
A T G A A C T C A G A G T C A G T T T T A A A A T G C A A G T C T G T G T T G A
T T C T G G T C T G G A T G G T G C A T T C C T C G A G A G C A A A A G A C A G
T C T T G G T C T T G G A T C C A C T T G C C C T G G G T A C A C T G A G G G C
T G C T A G G T T C C A G G T G C T C T T C C T G G C A C T G G G G A G G G A T
A C A G G C C C A A G A G A C A T G C T G T T C T C C C T C C T G G A G C A T C
T A T T T T A G T G G A G G A A G A C A G A A A A C A A A C C A T T A A T A T A
G A G T A C T G A A A A G A T G C G A T G G A G A A A A C T A T A G C A A G G A
A G G G A A T G G G G T G G G A G A G A G G T C A G G A G A G G T C T C G C T G
A C A A G G T G G A C G A A A C A G G C C A T G A G G C A G A G A A C A T G T T
C C A G G C A A A G C A A A A G G C C C C A G G T G G G G A T G T G C A G G G A
G T A C C A G G A A A C C A G A G A G G T G G G A A T A G T T A T G A G A T G G
G G G G T G C C T C A G A G G G G A C A G G G C C A A G T C A G G T G A G A C C
T G A G G G T C A C A G T C A G C A G T G A G C T G G G G C C A T G C A G G G G

10

20

30

40

50

TCTGGCCTCAGAGGAGTGTGGTCTGGCCTGGATCTGAACC
TCTCACTGTGGCCTAGCTGCTGAGCTGAGAAAGAGATGACA
AGGACCTTGGGCAGAAAGCAGGGAGACTGGAGGGAGGCGGT
GGAGGGTCCAGGCGTTGGGGCGGGGGCTCAGGCTGGAGTCT
GAAGGGAGCCTGCAAGGCCTGGTGGGTGGATGTGGGTGGGA
GAGGGGGAGGATGGCACCAAGGCTCGGGCCCCCTGGACAGA
TGGAGTTGCCATTAAAGTGGGATGGGGCAGGCTATGGGGCC
ATCAGTTTTCAGAGGGATGAGTTTGGCACTGGCATGGTAGG
CATCTGTCTATCTCCACGGGCCCTCAAACCAGGCATGAAGC
AGGAGCTCACGTGTTTGGTCAAGCCATGGTGCAGAACCGCC
TGGGTGGGAGGTTGCGGGGTGGGAGATACACGGTTGTGTCC
CAAATGGGCTCTGAGCCAGCGAGGGGCCGTCTGCACCTTTGG
CCTCACAGAAAGGATGTCGGAGGGAGAAATGAAGTGTGGGT
GGGGGTCCC GGCCACGCTAGACATGTGCTTTCTTTTCTCT
CGGGCTCTGGCAGGTGACCGTGGCCTGCGAGGAGGGCTGG
ACCTTGACTGGCTGCAGTGCCCTCCCTGGGGACCTCCCCACG
TCCTGGGGGGCCTACGCCCGTAGACAACACGTTGTGTAGTCAG
GAGCCGGGACGTCAAGCACTACAGGCAGCACCCAGCGAAGGG
GCCGTGACAGCCGTTGCCATCTGCTGCCGGAGCCGGGCACC
TGGCGCAGGCCTCCCAGGAGCTCCAGTGACAGCCCCATCC
CAGGATGGGTGTCTGGGGAGGGGTCAAGGGCTGGGGCTGAG
CTTTAAATGGTTCCGACTTGTCCCTCTCTCAGCCCCCTCCA
TGGCCTGGCACGAGGGGGATGGGGATGCTTCCGCCCTTTCCG
GGGCTGCTGGCCTGGCCCTTGTAGTGGGGCAGCCTCCTTGC
CTGGAACCTCACTCACTCTGGGTGCTCTCTCCCCAGGTGGA
GGTGCCAGGAAGCTCCCTCCCTCACTGTGGGGCATTTCAC
CATTCAAACAGGTCGAGCTGTGCTCGGGTGCTGCCAGCTG
CTCCCAATGTGCCGATGTCCGTGGGCAGAAATGACTTTTAT
TGAGCTCTTGTTC CGTGC CAGGCATTCAATCCTCAGGTCT
CCACCAAGGAGGCAGGATTCTTCCCATGGATAGGGGGAGGG
GGCGGTAGGGGGCTGCAGGGGACAAACATCGTTGGGGGGGTGA
GTGTGAAAGGTGCTGATGGCCCTCATCTCCAGCTAACTGT
GGAGAAGCCCCCTGGGGGGCTCCCTGATTAATGGAGGGCTTAG
CTTTCTGGATGGCATCTAGCCAGAGGCTGGAGACAGGTGC
GCCCCCTGGTGGTCAACAGGCTGTGCTTGGTTTCTCTGAGCC
ACCTTTACTCTGCTCTATGCCAGGCTGTGTGCTAGCAACACC
CAAAGGTGGCCTGCGGGGGAGCCATCACCTAGGACTGACTC
GGCAGTGTGCAGTGGTGCATGCACTGTCTCAGCCAACCCG
CTCCACTACCCGGCAGGGGTACACATTCGCACCCCTACTTC
ACAGAGGAAGAAACCTGGAACCAGAGGGGGCGTGCCTGCC
AAGCTCACACAGCAGGAACCTGAGCCAGAAACGCAGATTGG
GCTGGCTCTGAAGCCAAGCCTCTTCTTACTTCAACCCGGCT
GGGCTCCTCATTTTTTACGGGTAAACAGTGAAGGCTGGGAAGG
GGAACACAGACCAGGAAGCTCGGTGAGTGATGGCAGAACG
ATGCCCTGCAGGCATGGAACCTTTTTC CGTTATCACCCAGGC
CTGATTCACTGGCCTGGCGGAGATGCTTCTAAGGCATGGT
CGGGGGAGAGGGCCAACAACCTGTCCCTCCTTGAGCACCCAG
CCCCACCCAAGCAAGCAGACATTTATCTTTTGGGTCTGTCT
CTCTCTGTTGCCTTTTTTACAGCCAACCTTTTCTAGACCTGT
TTTGCTTTTGTAACTTGAAGATATTTATTTCTGGGTTTTGT

AGCATTTTATTTAATATGGTGACTTTTAAATAAACA
AACAAACGTTGTCCTAAC (配列番号755)

【0286】

[0330] ヒトPCSK9アミノ酸配列 (NP_777596.2)

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLPAGARAQEDDGDYEE
LVLA LRSEEDGLAEAP EHGTTATFHRCAKDPWRLPGTYVV
VLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLT KILHVFHGLLP
GFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSSVFAQSIPWNLER
ITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRV
MVTDFENVPEEDGTRFHRQASKCD SHGTHLAGVVSGRDAG
VAKGASMRSLRVLNCQGKGTVSGTLIGLEFIRKSQQLVQP
GPLVVLPLLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRD
DACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGLTGNFGRCVD
LFAPGEDII GASSDCSTCFVSQS GTSQAAAHVAGIAAMML
SAEPELT LAELRQRLIHFS AKDVINEAWFPEDQRVLT
PNLVAALPPSTH GAGWQLFCRTVWSAHS GPTRMATAVARCAPD
EELLS CSSFSRS GKR RGERMEA QGGKLV CRAHNAFGGEGV
YAIARCCLLPQANCSVHTAPP AEASMGTRVHCHQQGHVLT
GCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASC
CHAPGLECKVKEHGIPAPQE QVTVACEEGWTLTGCSALPG
TSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCR
SRHLAQASQELQ (配列番号756)

【0287】

塩基エディタータンパク質－gRNA複合体

[0331] 別の態様では、本明細書で提供される単一のガイドRNAを、塩基エディター融合タンパク質、例えば、アデノシン塩基エディター融合タンパク質との複合体で含む複合体であって、複合体が、非改変の単一のガイドRNA及び塩基エディタータンパク質を有する複合体と比較して、増加した安定性を含み、安定性が、エクスピボ又はインビトロでの複合体の半減期によって測定される、複合体が本明細書で提供される。

【0288】

[0332] いくつかの実施形態では、複合体は、非改変の単一のガイドRNA及びCas9タンパク質を有する複合体と比較して、増加した安定性を含む。いくつかの実施形態では、複合体は、非改変の単一のガイドRNA及びCas9タンパク質を有する複合体と比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、少なくとも600%、少なくとも700%、少なくとも800%、少なくとも900%、少なくとも1000%、少なくとも2000%、少なくとも3000%、少なくとも4000%、少なくとも5000%、少なくとも6000%、少なくとも7000%、少なくとも8000%、少なくとも9000%、少なくとも10000%、少なくとも20000%、少なくとも30000%、少なくとも40000%、少なくとも50000%、少なくとも60000%、少なくとも70000%、少なくとも80000%、少なくとも90000%、又は少なくとも100000%増加した安定性を含む。いくつかの実施形態では、複合体は、非改変の単一のガイドRNA及びCas9タンパク質を有する複合体と比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍

、少なくとも1000倍、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍、少なくとも4000倍、少なくとも5000倍、少なくとも6000倍、少なくとも7000倍、少なくとも8000倍、少なくとも9000倍、又は少なくとも10000倍増加した安定性を含む。

【0289】

【0333】いくつかの実施形態では、複合体の安定性は、複合体の半減期によって測定される。いくつかの実施形態では、複合体の安定性は、エクスピボでの複合体の半減期によって測定される。いくつかの実施形態では、複合体の安定性は、インビトロでの複合体の半減期によって測定される。

【0290】

【0334】いくつかの実施形態では、複合体は、非改変の単一のガイドRNA及びCas9タンパク質を有する複合体と比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、少なくとも600%、少なくとも700%、少なくとも800%、少なくとも900%、少なくとも1000%、少なくとも2000%、少なくとも3000%、少なくとも4000%、少なくとも5000%、少なくとも6000%、少なくとも7000%、少なくとも8000%、少なくとも9000%、少なくとも10000%、少なくとも20000%、少なくとも30000%、少なくとも40000%、少なくとも50000%、少なくとも60000%、少なくとも70000%、少なくとも80000%、少なくとも90000%、又は少なくとも100000%増加した半減期を含み、複合体の半減期は、エクスピボで測定される。いくつかの実施形態では、単一のガイドRNAは、非改変の単一のガイドRNA及びCas9タンパク質を有する複合体と比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1000倍、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍、少なくとも4000倍、少なくとも5000倍、少なくとも6000倍、少なくとも7000倍、少なくとも8000倍、少なくとも9000倍、又は少なくとも10000倍増加した複合体の半減期を示し、複合体の半減期は、エクスピボで測定される。

【0291】

【0335】いくつかの実施形態では、複合体は、インビトロで測定された場合に、非改変の単一のガイドRNA及びCas9タンパク質を有する複合体と比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、少なくとも600%、少なくとも700%、少なくとも800%、少なくとも900%、少なくとも1000%、少なくとも2000%、少なくとも3000%、少なくとも4000%、少なくとも5000%、少なくとも6000%、少なくとも7000%、少なくとも8000%、少なくとも9000%、少なくとも10000%、少なくとも20000%、少なくとも30000%、少なくとも40000%、少なくとも50000%、少なくとも60000%、少なくとも70000%、少なくとも80000%、少なくとも90000%、又は少なくとも100000%増加した半減期を含み、複合体の半減期は、インビトロで測定される。いくつかの実施形態では、単一のガイドRNAは、非改変の単一のガイドRNA及びCas9タンパク質を有する複合体と比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、

0 倍、少なくとも 5 0 倍、少なくとも 6 0 倍、少なくとも 7 0 倍、少なくとも 8 0 倍、少なくとも 9 0 倍、少なくとも 1 0 0 倍、少なくとも 2 0 0 倍、少なくとも 3 0 0 倍、少なくとも 4 0 0 倍、少なくとも 5 0 0 倍、少なくとも 6 0 0 倍、少なくとも 7 0 0 倍、少なくとも 8 0 0 倍、少なくとも 9 0 0 倍、少なくとも 1 0 0 0 倍、少なくとも 2 0 0 0 倍、少なくとも 3 0 0 0 倍、少なくとも 4 0 0 0 倍、少なくとも 5 0 0 0 倍、少なくとも 6 0 0 0 倍、少なくとも 7 0 0 0 倍、少なくとも 8 0 0 0 倍、少なくとも 9 0 0 0 倍、又は少なくとも 1 0 0 0 0 倍増加した半減期を示し、複合体の半減期は、インビトロで測定される。

【0292】

[0336]別の態様では、本明細書で提供される複合体を含む細胞が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、細胞は、インビトロでの細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、細胞は、エキスピボでの細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、細胞は、インビボでの細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、細胞は、単離された細胞であってもよい。

10

【0293】

薬学的組成物

[0337]いくつかの態様では、本明細書で提供される遺伝子編集系と、薬学的に許容される担体又は賦形剤と、を含む薬学的組成物が本明細書で提供される。

【0294】

[0338]いくつかの態様では、本明細書に記載のガイド核酸と、遺伝子エディタータンパク質又は遺伝子エディタータンパク質をコードする核酸配列と、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物が本明細書で提供される。本明細書に記載のガイド核酸配列と、遺伝子エディタータンパク質又は遺伝子エディタータンパク質をコードする核酸配列と、を含む遺伝子編集系を、薬学的組成物に製剤化することができる。薬学的組成物は、薬学的に使用することができる調製物への活性化合物の処理を容易にする1つ以上の薬学的に許容される不活性成分を使用して、従来の方法で製剤化される。本開示で使用される好適な製剤及び送達方法は、概して当該技術分野で周知である。適切な製剤は、選択される投与経路に依存する。本明細書に記載される薬学的組成物の概要は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, New York, N. Y., 1980; 及び Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999)に見出すことができ、そのような開示について参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0295】

[0339]薬学的組成物は、本明細書に記載のガイド核酸配列、及び遺伝子エディタータンパク質又は遺伝子エディタータンパク質をコードする核酸配列を、1つ以上の他の化学構成要素（すなわち、薬学的に許容される成分）、例えば、担体、賦形剤、結合剤、充填剤、懸濁剤、香味剤、甘味剤、崩壊剤、分散剤、界面活性剤、滑沢剤、着色剤、希釈剤、可溶化剤、保湿剤、可塑剤、安定剤、浸透促進剤、湿潤剤、消泡剤、抗酸化剤、防腐剤、又はそれらの1つ以上の組み合わせとともに含み得る。薬学的組成物は、本明細書に記載のガイド核酸配列、及び遺伝子エディタータンパク質又は遺伝子エディタータンパク質をコードする核酸配列を、それを必要とする生物又は対象に投与することを容易にする。

40

【0296】

[0340]本開示の薬学的組成物は、当該技術分野で既知の任意の好適な方法を使用して

50

対象に投与することができる。本明細書に記載の薬学的組成物は、非経口、静脈内、皮内、筋肉内、結腸内、直腸内、又は腹腔内を含む様々な方法で対象に投与することができる。薬学的組成物は、対象の腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、又は静脈内注射によって投与することができる。薬学的組成物は、非経口的に、静脈内に、筋肉内に、又は経口的に投与することができる。

【0297】

【0341】吸入による投与のために、本明細書に記載の遺伝子編集系は、エアロゾル、ミスト、又は粉末として使用するために製剤化され得る。口腔投与又は舌下投与の場合、薬学的組成物は、従来の方法で製剤化された錠剤、トローチ剤、又はゲルの形態で製剤化され得る。本明細書に記載される薬学的組成物は、経皮剤形として調製することができる。本明細書に記載の遺伝子編集系は、筋肉内、皮下、又は静脈内注射に好適な薬学的組成物へと製剤化することができる。本明細書に記載の遺伝子編集系は、局所的に投与ことができ、溶液、懸濁液、ローション、ゲル、ペースト、薬用スティック、バーム、クリーム、又は軟膏などの様々な局所的に投与可能な組成物へと製剤化することができる。本明細書に記載される遺伝子編集系は、浣腸剤、直腸ゲル、直腸フォーム、直腸エアロゾル、坐剤、ゼリー坐剤、又は保持浣腸剤などの直腸組成物で製剤化することができる。本明細書に記載の遺伝子編集系は、水性経口分散液、エマルジョン、溶液、エリキシル剤、ゲル、及びシロップを含むがこれらに限定されない群から選択される水性懸濁液又は溶液の形態で、錠剤、カプセル、又は液体などの経口投与のために製剤化することができる。

【0298】

【0342】本明細書に記載のガイド核酸配列と、遺伝子エディタータンパク質又は遺伝子エディタータンパク質をコードする核酸配列と、を含む薬学的組成物は、治療剤を更に含む。追加の治療剤は、治療される疾患、障害、又は状態の異なる態様を調節し、複製能のある組換えアデノウイルス又は治療剤単独のいずれかの投与よりも大きな全体的利益を提供し得る。治療剤としては、化学療法剤、放射線療法剤、ホルモン療法剤、及び／又は免疫療法剤が挙げられるが、これらに限定されない。治療剤は、放射線療法剤であり得る。治療剤は、ホルモン療法剤であり得る。治療剤は、免疫療法剤であり得る。治療剤は、化学療法剤であり得る。追加の治療剤のための調製物及び投薬スケジュールは、製造業者の使用説明書に従って使用され得るか、又は当業者によって経験的に決定され得る。例えば、化学療法のための調製物及び投薬スケジュールは、The Chemotherapy Source Book, 4th Edition, 2008, M. C. Perry, Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PAにも記載されている。

【0299】

【0343】本明細書に記載のガイド核酸配列の遺伝子編集系、及び遺伝子エディタータンパク質又は遺伝子エディタータンパク質をコードする核酸配列、及び本明細書に記載される方法で治療することができる対象は、疾患又は状態を有する任意の対象であり得る。例えば、対象は、動物などの真核生物対象であってもよい。対象は、哺乳動物、例えば、ヒトであり得る。対象は、ヒトであり得る。対象は、非ヒト動物であり得る。対象は、胎児、胚、又は子供であり得る。対象は、チンパンジー、及び他の類人猿及びサル種などの非ヒト霊長類；ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどの農場動物；ウサギ、イヌ、及びネコなどの飼育動物；ラット、マウス、及びモルモットなどのげっ歯類を含む実験動物などであり得る。

【0300】

【0344】対象は、出生前（例えば、胎児）、小児（例えば、新生児、乳児、幼児、思春期前）、青年、思春期、又は成人（例えば、若年成人、中年成人、高齢者）であり得る。ヒト対象は、約0ヶ月～約120歳、又はそれより高齢であり得る。ヒト対象は、約0～約12ヶ月齢、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12ヶ月齢であり得る。ヒト対象は、約0～12歳、例えば、約0～30日齢、約1ヶ月～12ヶ月齢、約1歳～3歳、約4歳～5歳、約4歳～12歳、約1、2、3、4、5、6、

7、8、9、10、11、又は12歳であり得る。ヒト対象は、約13歳～19歳、例えば、約13、14、15、16、17、18、又は19歳であり得る。ヒト対象は、約20～約39歳、例えば、約20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、又は39歳であり得る。ヒト対象は、約40～約59歳、例えば、約40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、又は59歳であり得る。ヒト対象は、59歳より上であってもよく、例えば、約60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、又は120歳であり得る。ヒト対象は、男性対象及び／又は女性対象を含み得る。

10

【0301】

[0345]いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、ヒト対象においてiLipidの血漿Cmaxをもたらす約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、又は1000µg/mLである総量で投与される。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、ヒト対象においてiLipidの血漿Cmaxをもたらす約0.1µg/mL～約1000µg/mL、約0.2µg/mL～約900µg/mL、約0.3µg/mL～約800µg/mL、約0.4µg/mL～約700µg/mL、約0.5µg/mL～約600µg/mL、約0.6µg/mL～約500µg/mL、約0.7µg/mL～約400µg/mL、約0.8µg/mL～約300µg/mL、約0.9µg/mL～約200µg/mL、1µg/mL～約100µg/mL、約2µg/mL～約90µg/mL、約3µg/mL～約80µg/mL、約4µg/mL～約70µg/mL、約5µg/mL～約60µg/mL、約6µg/mL～約50µg/mL、約7µg/mL～約40µg/mL、約8µg/mL～約30µg/mL、又は約9µg/mL～約20µg/mLである総量で投与される。

20

30

40

【0302】

[0346]いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、ヒト対象においてPEG脂質の血漿Cmaxをもたらす約0.01µg/mL～約300µg/mL、約0.02µg/mL～約250µg/mL、約0.03µg/mL～約200µg/mL、約0.04µg/mL～約150µg/mL、約0.05µg/mL～約100µg/mL、約0.06µg/mL～約90µg/mL、約0.07µg/mL～約80µg/mL、約0.08µg/mL～約70µg/mL、約0.09µg/mL～約60µg/mL、約0.1µg/mL～約50µg/mL、約0.2µg/mL～約45µg/mL、約0.3µg/mL～約40µg/mL、約0.4µg/mL～約35µg/mL、約0.

50

【 0 3 0 3 】

20

30

50

／mL、約300 μ g $\times$ h／mL～約700 μ g $\times$ h／mL、又は約400 μ g $\times$ h／mL～約600 μ g $\times$ h／mLである総量で投与される。

【0306】

【0350】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、ヒト対象においてPEG脂質のAUCをもたらす約1 μ g $\times$ h／mL～約3000 μ g $\times$ h／mL、約10 μ g $\times$ h／mL～約2900 μ g $\times$ h／mL、約20 μ g $\times$ h／mL～約2800 μ g $\times$ h／mL、約30 μ g $\times$ h／mL～約2700 μ g $\times$ h／mL、約40 μ g $\times$ h／mL～約2600 μ g $\times$ h／mL、約50 μ g $\times$ h／mL～約2500 μ g $\times$ h／mL、約60 μ g $\times$ h／mL～約2400 μ g $\times$ h／mL、約70 μ g $\times$ h／mL～約2300 μ g $\times$ h／mL、約80 μ g $\times$ h／mL～約2200 μ g $\times$ h／mL、約90 μ g $\times$ h／mL～約2100 μ g $\times$ h／mL、約100 μ g $\times$ h／mL～約2000 μ g $\times$ h／mL、約200 μ g $\times$ h／mL～約1900 μ g $\times$ h／mL、約300 μ g $\times$ h／mL～約1800 μ g $\times$ h／mL、約400 μ g $\times$ h／mL～約1700 μ g $\times$ h／mL、約500 μ g $\times$ h／mL～約1600 μ g $\times$ h／mL、600 μ g $\times$ h／mL～約1500 μ g $\times$ h／mL、700 μ g $\times$ h／mL～約1400 μ g $\times$ h／mL、800 μ g $\times$ h／mL～約1300 μ g $\times$ h／mL、900 μ g $\times$ h／mL～約1200 μ g $\times$ h／mL、又は1000 μ g $\times$ h／mL～約1100 μ g $\times$ h／mLである総量で投与される。

【0307】

【0351】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、ヒト対象においてmRNAのAUCをもたらす約0.1 μ g $\times$ h／mL～約1000 μ g $\times$ h／mL、約0.2 μ g $\times$ h／mL～約900 μ g $\times$ h／mL、約0.3 μ g $\times$ h／mL～約800 μ g $\times$ h／mL、約0.4 μ g $\times$ h／mL～約700 μ g $\times$ h／mL、約0.5 μ g $\times$ h／mL～約600 μ g $\times$ h／mL、約0.6 μ g $\times$ h／mL～約500 μ g $\times$ h／mL、約0.7 μ g $\times$ h／mL～約400 μ g $\times$ h／mL、約0.8 μ g $\times$ h／mL～約300 μ g $\times$ h／mL、約0.9 μ g $\times$ h／mL～約200 μ g $\times$ h／mL、約1 μ g $\times$ h／mL～約100 μ g $\times$ h／mL、約2 μ g $\times$ h／mL～約90 μ g $\times$ h／mL、約3 μ g $\times$ h／mL～約80 μ g $\times$ h／mL、約4 μ g $\times$ h／mL～約60 μ g $\times$ h／mL、約5 μ g $\times$ h／mL～約50 μ g $\times$ h／mL、約6 μ g $\times$ h／mL～約40 μ g $\times$ h／mL、約7 μ g $\times$ h／mL～約30 μ g $\times$ h／mL、約8 μ g $\times$ h／mL～約20 μ g $\times$ h／mL、又は約9 μ g $\times$ h／mL～約10 μ g $\times$ h／mLである総量で投与される。

【0308】

【0352】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、約0.01mg／kg～約5mg／kg、約0.02mg／kg～約5mg／kg、約0.03mg／kg～約5mg／kg、約0.04mg／kg～約5mg／kg、約0.05mg／kg～約5mg／kg、約0.06mg／kg～約5mg／kg、約0.07mg／kg～約5mg／kg、約0.08mg／kg～約5mg／kg、約0.09mg／kg～約5mg／kg、約0.1mg／kg～約5mg／kg、約0.2mg／kg～約5mg／kg、約0.3mg／kg～約5mg／kg、約0.4mg／kg～約5mg／kg、約0.5mg／kg～約5mg／kg、約0.6mg／kg～約5mg／kg、約0.7mg／kg～約5mg／kg、約0.8mg／kg～約5mg／kg、約0.9mg／kg～約5mg／kg、約1mg／kg～約5mg／kg、約1.5mg／kg～約5mg／kg、約2mg／kg～約5mg／kg、約2.5mg／kg～約5mg／kg、約3mg／kg～約5mg／kg、約3.5mg／kg～約5mg／kg、約4mg／kg～約5mg／kg、又は約4.5mg／kg～約5mg／kgの総量で投与される。

【0309】

【0353】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、約0.01mg／kg～約3mg／kg、約0.02mg／kg～約3mg／kg、約0.03mg／kg～約3mg／kg、約0.04mg／kg～約3mg／kg、約0.05mg／kg～約3mg／kg、約0.06mg／kg～約3mg／kg、約0.07mg／kg～約3mg／kg、約0.08mg／kg～約3mg／kg、約0.09mg／kg～約3mg／kg

10

20

30

40

50

g、約0.1mg/kg～約3mg/kg、約0.2mg/kg～約3mg/kg、約0.3mg/kg～約3mg/kg、約0.4mg/kg～約3mg/kg、約0.5mg/kg～約3mg/kg、約0.6mg/kg～約3mg/kg、約0.7mg/kg～約3mg/kg、約0.8mg/kg～約3mg/kg、約0.9mg/kg～約3mg/kg、約1mg/kg～約3mg/kg、約1.5mg/kg～約3mg/kg、約2mg/kg～約3mg/kg、又は約2.5mg/kg～約3mg/kgの総量で投与される。

【0310】

【0354】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、約0.01mg/kg～約2mg/kg、約0.02mg/kg～約2mg/kg、約0.03mg/kg～約2mg/kg、約0.04mg/kg～約2mg/kg、約0.05mg/kg～約2mg/kg、約0.06mg/kg～約2mg/kg、約0.07mg/kg～約2mg/kg、約0.08mg/kg～約2mg/kg、約0.09mg/kg～約2mg/kg、約0.1mg/kg～約2mg/kg、約0.2mg/kg～約2mg/kg、約0.3mg/kg～約2mg/kg、約0.4mg/kg～約2mg/kg、約0.5mg/kg～約2mg/kg、約0.6mg/kg～約2mg/kg、約0.7mg/kg～約2mg/kg、約0.8mg/kg～約2mg/kg、約0.9mg/kg～約2mg/kg、約1mg/kg～約2mg/kg、約1.1mg/kg～約2mg/kg、約1.2mg/kg～約2mg/kg、約1.3mg/kg～約2mg/kg、約1.4mg/kg～約2mg/kg、約1.5mg/kg～約2mg/kg、約1.6mg/kg～約2mg/kg、約1.7mg/kg～約2mg/kg、約1.8mg/kg～約2mg/kg、又は約1.9mg/kg～約2mg/kgの総量で投与される。

【0311】

【0355】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、約0.01mg/kg～約1.5mg/kg、約0.02mg/kg～約1.5mg/kg、約0.03mg/kg～約1.5mg/kg、約0.04mg/kg～約1.5mg/kg、約0.05mg/kg～約1.5mg/kg、約0.06mg/kg～約1.5mg/kg、約0.07mg/kg～約1.5mg/kg、約0.08mg/kg～約1.5mg/kg、約0.09mg/kg～約1.5mg/kg、約0.1mg/kg～約1.5mg/kg、約0.2mg/kg～約1.5mg/kg、約0.3mg/kg～約1.5mg/kg、約0.4mg/kg～約1.5mg/kg、約0.5mg/kg～約1.5mg/kg、約0.6mg/kg～約1.5mg/kg、約0.7mg/kg～約1.5mg/kg、約0.8mg/kg～約1.5mg/kg、約0.9mg/kg～約1.5mg/kg、約1mg/kg～約1.5mg/kg、約1.1mg/kg～約1.5mg/kg、約1.2mg/kg～約1.5mg/kg、約1.3mg/kg～約1.5mg/kg、又は約1.4mg/kg～約1.5mg/kgの総量で投与される。

【0312】

【0356】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、約0.01mg/kg～約1.25mg/kg、約0.02mg/kg～約1.25mg/kg、約0.03mg/kg～約1.25mg/kg、約0.04mg/kg～約1.25mg/kg、約0.05mg/kg～約1.25mg/kg、約0.06mg/kg～約1.25mg/kg、約0.07mg/kg～約1.25mg/kg、約0.08mg/kg～約1.25mg/kg、約0.09mg/kg～約1.25mg/kg、約0.1mg/kg～約1.25mg/kg、約0.2mg/kg～約1.25mg/kg、約0.3mg/kg～約1.25mg/kg、約0.4mg/kg～約1.25mg/kg、約0.5mg/kg～約1.25mg/kg、約0.6mg/kg～約1.25mg/kg、約0.7mg/kg～約1.25mg/kg、約0.8mg/kg～約1.25mg/kg、約0.9mg/kg～約1.25mg/kg、約1mg/kg～約1.25mg/kg、又は約1.2mg/kg～約1.25mg/kgの総量で投与される。

【0313】

【0357】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、約0.01mg/kg～約1mg/kg、約0.02mg/kg～約1mg/kg、約0.03mg/kg～約1mg/kg、約0.04mg/kg～約1mg/kg、約0.05mg/kg～約1mg/kg、約0.06mg/kg～約1mg/kg、約0.07mg/kg～約1mg/kg、約0.08mg/kg～約1mg/kg、約0.09mg/kg～約1mg/kg、約0.1mg/kg～約1mg/kg、約0.2mg/kg～約1mg/kg、約0.3mg/kg～約1mg/kg、約0.4mg/kg～約1mg/kg、約0.5mg/kg～約1mg/kg、約0.6mg/kg～約1mg/kg、約0.7mg/kg～約1mg/kg、約0.8mg/kg～約1mg/kg、又は約0.9mg/kg～約1mg/kgの総量で投与される。

10

【0314】

【0358】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、約0.01mg/kg～約0.9mg/kg、約0.02mg/kg～約0.9mg/kg、約0.03mg/kg～約0.9mg/kg、約0.04mg/kg～約0.9mg/kg、約0.05mg/kg～約0.9mg/kg、約0.06mg/kg～約0.9mg/kg、約0.07mg/kg～約0.9mg/kg、約0.08mg/kg～約0.9mg/kg、約0.09mg/kg～約0.9mg/kg、約0.1mg/kg～約0.9mg/kg、約0.2mg/kg～約0.9mg/kg、約0.3mg/kg～約0.9mg/kg、約0.4mg/kg～約0.9mg/kg、約0.5mg/kg～約0.9mg/kg、約0.6mg/kg～約0.9mg/kg、約0.7mg/kg～約0.9mg/kg、又は約0.8mg/kg～約0.9mg/kgの総量で投与される。

20

【0315】

【0359】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、約0.01mg/kg～約0.8mg/kg、約0.02mg/kg～約0.8mg/kg、約0.03mg/kg～約0.8mg/kg、約0.04mg/kg～約0.8mg/kg、約0.05mg/kg～約0.8mg/kg、約0.06mg/kg～約0.8mg/kg、約0.07mg/kg～約0.8mg/kg、約0.08mg/kg～約0.8mg/kg、約0.09mg/kg～約0.8mg/kg、約0.1mg/kg～約0.8mg/kg、約0.2mg/kg～約0.8mg/kg、約0.3mg/kg～約0.8mg/kg、約0.4mg/kg～約0.8mg/kg、約0.5mg/kg～約0.8mg/kg、約0.6mg/kg～約0.8mg/kg、又は約0.7mg/kg～約0.8mg/kgの総量で投与される。

30

【0316】

【0360】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、約0.01mg/kg～約0.6mg/kg、約0.02mg/kg～約0.6mg/kg、約0.03mg/kg～約0.6mg/kg、約0.04mg/kg～約0.6mg/kg、約0.05mg/kg～約0.6mg/kg、約0.06mg/kg～約0.6mg/kg、約0.07mg/kg～約0.6mg/kg、約0.08mg/kg～約0.6mg/kg、約0.09mg/kg～約0.6mg/kg、約0.1mg/kg～約0.6mg/kg、約0.2mg/kg～約0.6mg/kg、約0.3mg/kg～約0.6mg/kg、約0.4mg/kg～約0.6mg/kg、又は約0.5mg/kg～約0.6mg/kgの総量で投与される。

40

【0317】

【0361】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、約0.01mg/kg～約0.3mg/kg、約0.02mg/kg～約0.3mg/kg、約0.03mg/kg～約0.3mg/kg、約0.04mg/kg～約0.3mg/kg、約0.05mg/kg～約0.3mg/kg、約0.06mg/kg～約0.3mg/kg、約0.07mg/kg～約0.3mg/kg、約0.08mg/kg～約0.3mg/kg、約0.09mg/kg～約0.3mg/kg、約0.1mg/kg～約0.3mg/kg、

50

又は約 0.2 mg/kg ~ 約 0.3 mg/kg の総量で投与される。

【0318】

【0362】いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA は、約 0.01 mg/kg、約 0.015 mg/kg、約 0.02 mg/kg、約 0.025 mg/kg、約 0.03 mg/kg、約 0.035 mg/kg、約 0.04 mg/kg、約 0.045 mg/kg、約 0.05 mg/kg、約 0.055 mg/kg、約 0.06 mg/kg、約 0.065 mg/kg、約 0.07 mg/kg、約 0.075 mg/kg、約 0.08 mg/kg、約 0.085 mg/kg、約 0.09 mg/kg、約 0.095 mg/kg、約 0.1 mg/kg、約 0.15 mg/kg、約 0.2 mg/kg、約 0.25 mg/kg、約 0.3 mg/kg、約 0.35 mg/kg、約 0.4 mg/kg、約 0.45 mg/kg、約 0.5 mg/kg、約 0.55 mg/kg、約 0.6 mg/kg、約 0.65 mg/kg、約 0.7 mg/kg、約 0.75 mg/kg、約 0.8 mg/kg、約 0.85 mg/kg、約 0.9 mg/kg、約 0.95 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.05 mg/kg、約 1.1 mg/kg、約 1.15 mg/kg、約 1.2 mg/kg、約 1.25 mg/kg、約 1.3 mg/kg、約 1.35 mg/kg、約 1.4 mg/kg、約 1.45 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 1.55 mg/kg、約 1.6 mg/kg、約 1.65 mg/kg、約 1.7 mg/kg、約 1.75 mg/kg、約 1.8 mg/kg、約 1.85 mg/kg、約 1.9 mg/kg、約 1.95 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.1 mg/kg、約 2.2 mg/kg、約 2.3 mg/kg、約 2.4 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 2.6 mg/kg、約 2.7 mg/kg、約 2.8 mg/kg、約 2.9 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.1 mg/kg、約 3.2 mg/kg、約 3.3 mg/kg、約 3.4 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 3.6 mg/kg、約 3.7 mg/kg、約 3.8 mg/kg、約 3.9 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.1 mg/kg、約 4.2 mg/kg、約 4.3 mg/kg、約 4.4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 4.6 mg/kg、約 4.7 mg/kg、約 4.8 mg/kg、約 4.9 mg/kg、又は約 5 mg/kg の総量で投与される。

10

20

【0319】

【0363】いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA は、約 0.001 mg/kg ~ 約 1000 mg/kg、約 0.002 mg/kg ~ 約 950 mg/kg、約 0.003 mg/kg ~ 約 900 mg/kg、約 0.004 mg/kg ~ 約 850 mg/kg、約 0.005 mg/kg ~ 約 800 mg/kg、約 0.006 mg/kg ~ 約 750 mg/kg、約 0.007 mg/kg ~ 約 700 mg/kg、約 0.008 mg/kg ~ 約 650 mg/kg、約 0.009 mg/kg ~ 約 600 mg/kg、約 0.01 mg/kg ~ 約 500 mg/kg、約 0.02 mg/kg ~ 約 500 mg/kg、約 0.03 mg/kg ~ 約 450 mg/kg、約 0.04 mg/kg ~ 約 400 mg/kg、約 0.05 mg/kg ~ 約 350 mg/kg、約 0.06 mg/kg ~ 約 300 mg/kg、約 0.07 mg/kg ~ 約 250 mg/kg、約 0.08 mg/kg ~ 約 200 mg/kg、約 0.09 mg/kg ~ 約 150 mg/kg、約 0.1 mg/kg ~ 約 100 mg/kg、約 0.2 mg/kg ~ 約 90 mg/kg、約 0.3 mg/kg ~ 約 85 mg/kg、約 0.4 mg/kg ~ 約 80 mg/kg、約 0.5 mg/kg ~ 約 75 mg/kg、約 0.6 mg/kg ~ 約 70 mg/kg、約 0.7 mg/kg ~ 約 65 mg/kg、約 0.8 mg/kg ~ 約 60 mg/kg、約 0.9 mg/kg ~ 約 55 mg/kg、約 1 mg/kg ~ 約 50 mg/kg、約 2 mg/kg ~ 約 45 mg/kg、約 3 mg/kg ~ 約 40 mg/kg、約 4 mg/kg ~ 約 35 mg/kg、約 5 mg/kg ~ 約 30 mg/kg、約 6 mg/kg ~ 約 25 mg/kg、約 7 mg/kg ~ 約 20 mg/kg、約 8 mg/kg ~ 約 15 mg/kg、又は約 9 mg/kg ~ 約 10 mg/kg の総量で投与される。

30

40

【0320】

【0364】いくつかの実施形態では、ガイド RNA 及び mRNA は、約 0.005 mg/kg ~ 約 1000 mg/kg、約 0.01 mg/kg ~ 約 1000 mg/kg、約 0.05 mg/kg ~ 約 1000 mg/kg、約 0.1 mg/kg ~ 約 1000 mg/kg、約

50

0.5mg/kg～約1000mg/kg、約1mg/kg～約1000mg/kg、約5mg/kg～約1000mg/kg、約10mg/kg～約1000mg/kg、約20mg/kg～約1000mg/kg、約30mg/kg～約1000mg/kg、約40mg/kg～約1000mg/kg、約50mg/kg～約1000mg/kg、約60mg/kg～約1000mg/kg、約70mg/kg～約1000mg/kg、約80mg/kg～約1000mg/kg、約90mg/kg～約1000mg/kg、約100mg/kg～約1000mg/kg、約150mg/kg～約1000mg/kg、約200mg/kg～約1000mg/kg、約250mg/kg～約1000mg/kg、約300mg/kg～約1000mg/kg、約350mg/kg～約1000mg/kg、約400mg/kg～約1000mg/kg、約450mg/kg～約1000mg/kg、約500mg/kg～約1000mg/kg、約550mg/kg～約1000mg/kg、約600mg/kg～約1000mg/kg、約650mg/kg～約1000mg/kg、約700mg/kg～約1000mg/kg、約750mg/kg～約1000mg/kg、約800mg/kg～約1000mg/kg、約850mg/kg～約1000mg/kg、約900mg/kg～約1000mg/kg、又は約950mg/kg～約1000mg/kgの総量で投与される。

10

【0321】

【0365】いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びmRNAは、約0.001mg/kg～約950mg/kg、約0.001mg/kg～約900mg/kg、約0.001mg/kg～約850mg/kg、約0.001mg/kg～約800mg/kg、約0.001mg/kg～約750mg/kg、約0.001mg/kg～約700mg/kg、約0.001mg/kg～約650mg/kg、約0.001mg/kg～約600mg/kg、約0.001mg/kg～約550mg/kg、約0.001mg/kg～約500mg/kg、約0.001mg/kg～約450mg/kg、約0.001mg/kg～約400mg/kg、約0.001mg/kg～約350mg/kg、約0.001mg/kg～約300mg/kg、約0.001mg/kg～約250mg/kg、約0.001mg/kg～約200mg/kg、約0.001mg/kg～約150mg/kg、約0.001mg/kg～約100mg/kg、約0.001mg/kg～約90mg/kg、約0.001mg/kg～約80mg/kg、約0.001mg/kg～約70mg/kg、約0.001mg/kg～約60mg/kg、約0.001mg/kg～約50mg/kg、約0.001mg/kg～約40mg/kg、約0.001mg/kg～約30mg/kg、約0.001mg/kg～約20mg/kg、約0.001mg/kg～約10mg/kg、約0.001mg/kg～約9mg/kg、約0.001mg/kg～約8mg/kg、約0.001mg/kg～約7mg/kg、約0.001mg/kg～約6mg/kg、約0.001mg/kg～約5mg/kg、約0.001mg/kg～約4mg/kg、約0.001mg/kg～約3mg/kg、約0.001mg/kg～約2mg/kg、約0.001mg/kg～約1mg/kg、約0.001mg/kg～約0.9mg/kg、約0.001mg/kg～約0.8mg/kg、約0.001mg/kg～約0.7mg/kg、約0.001mg/kg～約0.6mg/kg、約0.001mg/kg～約0.5mg/kg、約0.001mg/kg～約0.4mg/kg、約0.001mg/kg～約0.3mg/kg、約0.001mg/kg～約0.2mg/kg、約0.001mg/kg～約0.1mg/kg、約0.001mg/kg～約0.09mg/kg、約0.001mg/kg～約0.08mg/kg、約0.001mg/kg～約0.07mg/kg、約0.001mg/kg～約0.06mg/kg、約0.001mg/kg～約0.05mg/kg、約0.001mg/kg～約0.04mg/kg、約0.001mg/kg～約0.03mg/kg、約0.001mg/kg～約0.02mg/kg、約0.001mg/kg～約0.01mg/kg、約0.001mg/kg～約0.009mg/kg、約0.001mg/kg～約0.008mg/kg、約0.001mg/kg～約0.007mg/kg、約0.001mg/kg～約0.006mg/kg、約0.001mg/kg～約0.005mg/kg

20

30

40

50

、約0.001mg/kg～約0.004mg/kg、約0.001mg/kg～約0.003mg/kg、又は約0.001mg/kg～約0.002mg/kgの総量で投与される。

【0322】

脂質ナノ粒子（LNP）

【0366】本明細書に記載されるLNPは、1つ以上の特定の用途又は標的のために設計することができる。ナノ粒子（LNP）組成物又は組成物の要素は、特定の用途又は標的に基づいて、かつ／又は有効性、毒性、費用、使いやすさ、及び利用可能性に基づいて選択することができる。同様に、ナノ粒子組成物の特定の製剤は、特定の用途又は標的のために選択され得る1つ以上の記載された脂質を含む組成物である。製剤に使用するのに好適なリン酸電荷中和剤には、スペルミジン及び1,3-プロパンジアミンが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0323】

【0367】いくつかの実施形態では、LNPは、参照により組み込まれるConway, A. et al. 2019 Mol. Ther. 27, 866-877、及びVilliger, L. et al. 2021 Nat. Biomed. Eng. 5, 179-181に記載の方法に従って調製される。いくつかの実施形態では、LNPは、アミノ脂質、PEG-脂質と呼ばれる脂質にコンジュゲートされた平均分子量2000Daのモノメトキシポリエチレングリコール（又はメトキシポリエチルグリコール（methoxypolyethylene glycol））、コレステロール、及び1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）から構成される。いくつかの実施形態では、LNPは、独自のイオン化可能なカチオン性脂質、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、コレステロール、イオン化可能なアミノ脂質、及びPEG-脂質から構成される。

20

【0324】

【0368】いくつかの実施形態では、LNPは、約30～約160、約35～約160、約40～約160、約45～約160、約50～約160、約55～約160、約60～約160、約65～約160、約70～約160、約75～約160、約80～約160、約85～約160、約90～約160、約95～約160、約100～約160、約105～約160、約110～約160、約115～約160、約120～約160、約125～約160、約130～約160、約135～約160、約140～約160、約145～約160、約150～約160、約30～約155、約30～約150、約30～約145、約30～約140、約30～約135、約30～約130、約30～約125、約30～約120、約30～約115、約30～約110、約30～約105、約30～約100、約30～約95、約30～約90、約30～約85、約30～約80、約30～約75、約30～約70、約30～約65、約30～約60、約30～約55、約30～約50、約30～約45、約30～約40、約30～約45、約35～約45、約35～約50、約40～約50、約40～約55、約45～約55、約45～約60、約50～約60、約50～約65、約55～約60、約55～約65、約55～約70、約60～約70、約60～約75、約65～約75、約65～約80、約70～約80、約70～約85、約75～約85、約75～約90、約80～約90、約80～約95、約85～約95、約85～約100、約90～約100、約90～約105、約95～約105、約95～約110、約100～約110、約100～約115、約105～約115、約105～約120、約110～約120、約110～約125、約115～約125、約115～約130、約120～約130、約120～約135、約125～約135、約125～約140、約130～約140、約130～約145、約35～約140、約45～約130、約55～約120、約65～約110、約75～約100、又は約85～約90nmの平均流体力学直径を有する。

30

40

【0325】

【0369】いくつかの実施形態では、LNPは、約1～約97、約5～約97、約10～

50

約 97、約 15～約 97、約 20～約 97、約 25～約 97、約 30～約 97、約 35～約 97、約 40～約 97、約 45～約 97、約 50～約 97、約 55～約 97、約 60～約 97、約 65～約 97、約 70～約 97、約 75～約 97、約 80～約 97、約 1～約 95、約 1～約 90、約 1～約 85、約 1～約 80、約 1～約 75、約 1～約 70、約 1～約 65、約 1～約 60、約 1～約 55、約 1～約 50、約 1～約 45、約 1～約 40、約 1～約 35、約 1～約 30、約 1～約 25、約 1～約 20、約 1～約 15、約 1～約 10、約 10～約 30、約 10～約 35、約 15～約 35、約 15～約 40、約 20～約 40、約 20～約 45、約 25～約 45、約 25～約 50、約 30～約 50、約 30～約 55、約 35～約 55、約 35～約 60、約 40～約 60、約 40～約 65、約 45～約 65、約 45～約 70、約 50～約 70、約 50～約 75、約 55～約 75、約 55～約 80、又は約 60～約 80%のアミノ脂質を含む (mol%で)。

10

【0326】

【0370】いくつかの実施形態では、LNPは、約 1～約 40、約 1～約 38、約 1～約 36、約 1～約 34、約 1～約 32、約 1～約 30、約 1～約 28、約 1～約 26、約 1～約 24、約 1～約 22、約 1～約 20、約 1～約 18、約 1～約 16、約 1～約 14、約 1～約 12、約 1～約 10、約 1～約 8、約 1～約 6、約 1～約 4、約 1～約 2、約 2～約 40、約 4～約 40、約 6～約 40、約 8～約 40、約 10～約 40、約 12～約 40、約 14～約 40、約 16～約 40、約 18～約 40、約 20～約 40、約 22～約 40、約 24～約 40、約 26～約 40、約 28～約 40、約 30～約 40、約 32～約 40、約 34～約 40、約 36～約 40、約 38～約 40、約 2～約 35、約 2～約 30、約 2～約 25、約 2～約 20、約 2～約 15、約 2～約 10、約 2～約 8、約 2～約 6、又は約 2～約 4%のDSPCを含む (mol%で)。

20

【0327】

【0371】いくつかの実施形態では、LNPは、約 1～約 20、約 1～約 19、約 1～約 18、約 1～約 17、約 1～約 16、約 1～約 15、約 1～約 14、約 1～約 13、約 1～約 12、約 1～約 11、約 1～約 10、約 1～約 9、約 1～約 8、約 1～約 7、約 1～約 6、約 1～約 5、約 1～約 4、約 1～約 3、約 2～約 6、約 3～約 7、約 4～約 8、約 5～約 9、約 6～約 10、約 7～約 11、約 8～約 12、約 9～約 13、約 10～約 14、約 11～約 15、約 12～約 16、約 13～約 17、約 14～約 18、約 15～約 19、又は約 16～約 20%のPEG-脂質を含む (mol%で)。

30

【0328】

【0372】いくつかの実施形態では、LNPは、約 1～約 97、約 5～約 97、約 10～約 97、約 15～約 97、約 20～約 97、約 25～約 97、約 30～約 97、約 35～約 97、約 40～約 97、約 45～約 97、約 50～約 97、約 55～約 97、約 60～約 97、約 65～約 97、約 70～約 97、約 75～約 97、約 80～約 97、約 1～約 95、約 1～約 90、約 1～約 85、約 1～約 80、約 1～約 75、約 1～約 70、約 1～約 65、約 1～約 60、約 1～約 55、約 1～約 50、約 1～約 45、約 1～約 40、約 1～約 35、約 1～約 30、約 1～約 25、約 1～約 20、約 1～約 15、約 1～約 10、約 10～約 30、約 10～約 35、約 15～約 35、約 15～約 40、約 20～約 40、約 20～約 45、約 25～約 45、約 25～約 50、約 30～約 50、約 30～約 55、約 35～約 55、約 35～約 60、約 40～約 60、約 40～約 65、約 45～約 65、約 45～約 70、約 50～約 70、約 50～約 75、約 55～約 75、約 55～約 80、又は約 60～約 80%のコレステロールを含む (mol%で)。

40

【0329】

【0373】いくつかの実施形態では、LNPは、約 1～約 97、5～約 97、10～約 97、15～約 97、20～約 97、25～約 97、30～約 97、35～約 97、40～約 97、45～約 97、50～約 97、55～約 97、60～約 97、65～約 97、70～約 97、75～約 97、80～約 97、1～約 95、1～約 90、1～約 85、1～約 80、1～約 75、1～約 70、1～約 65、1～約 60、1～約 55、1～約 50、1～約 45、1～約 40、1～約 35、1～約 30、1～約 25、1～約 20、1～約 1

50

5、1～約10、10～約30、10～約35、15～約35、15～約40、20～約40、20～約45、25～約45、25～約50、30～約50、30～約55、35～約55、35～約60、40～約60、40～約65、45～約65、45～約70、50～約70、50～約75、55～約75、55～約80、又は60～約80%のアミノ脂質、1～約40、1～約38、1～約36、1～約34、1～約32、1～約30、1～約28、1～約26、1～約24、1～約22、1～約20、1～約18、1～約16、1～約14、1～約12、1～約10、1～約8、1～約6、1～約4、1～約2、2～約40、4～約40、6～約40、8～約40、10～約40、12～約40、14～約40、16～約40、18～約40、20～約40、22～約40、24～約40、26～約40、28～約40、30～約40、32～約40、34～約40、36～約40、38～約40、2～約35、2～約30、2～約25、2～約20、2～約15、2～約10、2～約8、2～約6、又は2～約4%のDSPC、1～約20、1～約19、1～約18、1～約17、1～約16、1～約15、1～約14、1～約13、1～約12、1～約11、1～約10、1～約9、1～約8、1～約7、1～約6、1～約5、1～約4、1～約3、2～約6、3～約7、4～約8、5～約9、6～約10、7～約11、8～約12、9～約13、10～約14、11～約15、12～約16、13～約17、14～約18、15～約19、及び約16～約20%のPEG-脂質を含み、残部はコレステロールである（全てmol%で）。

10

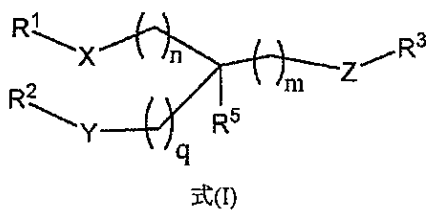
【0330】

アミノ脂質

20

【0374】アミノ脂質、リン脂質、PEG脂質、コレステロール若しくはその誘導体、ペイロード、又はそれらの任意の組み合わせを含むLNP組成物が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、アミノ脂質を含む。一態様では、式(I)の構造を有するアミノ脂質、又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物が本明細書に開示され、

【化1】

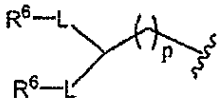


30

式中、

R^1 及び R^2 の各々が、独立して、 $C_7 \sim C_{22}$ アルキル、 $C_7 \sim C_{22}$ アルケニル、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、 $-C_2 \sim C_{10}$ アルキレン- $L-R^6$ 、又は

【化2】



40

であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、及びシクロアルキルの各々が、独立して、置換又は非置換であり、

X、Y、及びZの各々が、独立して、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-S$

50

C(=S)O-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=O)S-、-SC(=S)S-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-O、S、又は結合であり、

Lの各々が、独立して、-C(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=O)-、-C(=O)O-、-OC(=O)O-、-NR⁴C(=O)O-、-OC(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=O)NR⁴-、-NR⁴C(=NR⁴)NR⁴-、-C(=S)NR⁴-、-NR⁴C(=S)-、-C(=O)O-、-OC(=S)-、OC(=S)O-、-NR⁴C(=S)O-、-OC(=S)NR⁴-、-NR⁴C(=S)NR⁴-、-C(=O)S-、SC(=O)-、-OC(=O)S-、-NR⁴C(=O)S-、-SC(=O)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=S)O-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=O)S-、-SC(=S)S-、-NR⁴C(=S)S-、-SC(=S)NR⁴-、O、S、-C₁~C₁₀アルキレン-O-、-C₁~C₁₀アルキレン-C(=O)O-、-C₁~C₁₀アルキレン-OC(=O)-、又は結合であり、アルキレンは、置換又は非置換であり、

10

R³が、-C₀~C₁₀アルキレン-NR⁷R⁸、-C₀~C₁₀アルキレン-ヘテロシクロアルキル、又は-C₀~C₁₀アルキレン-ヘテロシクロアリールであり、

アルキレン、ヘテロシクロアルキル、及びヘテロシクロアイリル(heterocycloalyl)が、独立して、置換又は非置換であり、R⁴の各々が、独立して、水素又は置換若しくは非置換のC₁~C₆アルキルであり、

20

R⁵は、水素、又は置換若しくは非置換のC₁~C₆アルキルであり、

R⁶の各々が、独立して、置換若しくは非置換のC₃~C₂₂アルキル又は置換若しくは非置換のC₃~C₂₂アルケニルであり、

R⁷及びR⁸の各々が、独立して、水素又は置換若しくは非置換のC₁~C₆アルキルであるか、又はR⁷及びR⁸が、これらが接続する窒素とともに、置換若しくは非置換のC₂~C₆ヘテロシクリルを形成し、

pが、1~10から選択される整数であり、

n、m、及びqの各々が、独立して、0、1、2、3、4、又は5である。

【0331】

【0375】式(I)のいくつかの実施形態では、その構造が1つより多くの非対称C原子を保有する場合、各非対称C原子は、独立して、ラセミ体、キラル的に純粋なR及び／又はキラル的に純粋なS異性体、又はそれらの組み合わせを表す。

30

【0332】

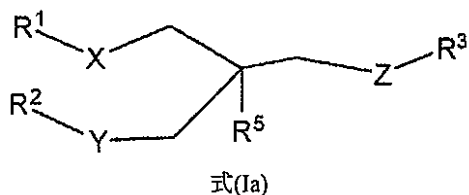
【0376】いくつかの実施形態では、式(I)のn及びqの各々は、独立して、0、1、2、又は3である。いくつかの実施形態では、式(I)のn、m、及びqの各々は、1である。

【0333】

【0377】いくつかの実施形態では、式(1)の化合物は、式(Ia)の構造を有するか、又はその薬学的に許容される塩若しくは薬学的に許容される溶媒和物を有し、

【化3】

40

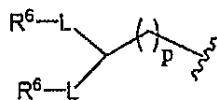


式中、

R¹及びR²の各々が、独立して、C₇~C₂₂アルキル、C₇~C₂₂アルケニル、C₃~C₈シクロアルキル、-C₂~C₁₀アルキレン-L-R⁶、又は

50

【化 4】



であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、及びシクロアルキルの各々が、独立して、置換又は非置換であり、

X、Y、及びZの各々が、独立して、 $C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(D)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(E)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、O、S、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-O-$ 、又は結合であり、アルキレンは、置換又は非置換であり、

10

Lの各々が、独立して、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、O、S、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-C(=O)O-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-OC(=O)-$ 、又は結合であり、アルキレンは、置換又は非置換であり、

20

R^3 が、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン $-NR^7R^8$ 、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン $-$ ヘテロシクロアルキル、又は $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン $-$ ヘテロシクロウイル(heterocyclo wyl)であり、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、及びヘテロシクロアリールは、独立して、置換又は非置換であり、

30

R^4 の各々が、独立して、水素、又は窒素若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R^5 は、水素、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R^6 の各々が、独立して、置換若しくは非置換の $C_3 \sim C_{22}$ アルキル又は置換若しくは非置換の $C_3 \sim C_{22}$ アルケニルであり、

R^7 及び R^8 の各々が、独立して、水素又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであるか、又は R^7 及び R^8 が、これらが接続する窒素とともに、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリルを形成し、

40

pが、1～10から選択される整数である。

【0334】

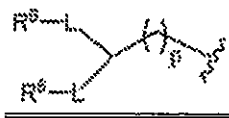
[0378]式(Ia)のいくつかの実施形態では、その構造が1つより多くの非対称C原子を保有する場合、各非対称C原子は、独立して、ラセミ体、キラル的に純粋なR及び／又はキラル的に純粋なS異性体、又はそれらの組み合わせを表す。

【0335】

[0379]いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^1 及び R^2 は、独立して、 $C_7 \sim C_{22}$ アルキル、 $C_7 \sim C_{22}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{10}$ アルキレン $-L-R^6$ 、又は

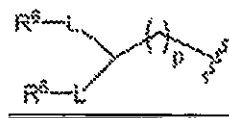
50

【化 5】



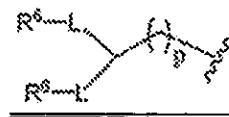
であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、及びシクロアルキルの各々は、独立して、置換又は非置換である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^1 及び R^2 は、独立して、 $C_{10} \sim C_{20}$ アルキル、 $C_{10} \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_8 \sim C_7$ アルキレン-L- R^6 、又は

【化 6】



であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、及びシクロアルキルの各々は、独立して、置換又は非置換である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^1 は、

【化 7】



である。

【0336】

【0380】いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の L の各々は、独立して、O、S、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-O-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-C(=O)O-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-OC(=O)-、又は結合であり、アルキレンは、置換又は非置換である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の L の各々は、独立して、O、S、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン-O-、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン-C(=O)O-、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン-OC(=O)-、又は結合であり、アルキレンは、置換又は非置換である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の L の各々は、独立して、O、S、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン-O-、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン-C(=O)O-、 $-C_1 \sim C_3$ アルキレン-OC(=O)-、又は結合であり、アルキレンは、直鎖又は分岐の非置換アルキレンである。

【0337】

【0381】いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^6 の各々は、独立して、置換若しくは非置換の直鎖 $C_3 \sim C_{22}$ アルキル又は置換若しくは非置換の直鎖 $C_3 \sim C_{22}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^6 の各々は、独立して、置換若しくは非置換の $C_3 \sim C_{20}$ アルキル又は置換若しくは非置換の $C_3 \sim C_{20}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^6 の各々は、独立して、置換若しくは非置換の $C_3 \sim C_{10}$ アルキル又は置換若しくは非置換の $C_3 \sim C_{10}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^6 の各々は、独立して、置換又は非置換の $C_3 \sim C_{10}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^6 の各々は、独立して、置換又は非置換の n -ペンチル、 n -ヘキシル、 n -ヘプチル、 n -オクチル、 n -ノニル、 n -デシル、 n -ウンデシル、又は n -ドデシルである。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^6 の各々は、独立して、置換又は非置換の n -オクチルである。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^6 の各々は、 n -オクチルである。

【0338】

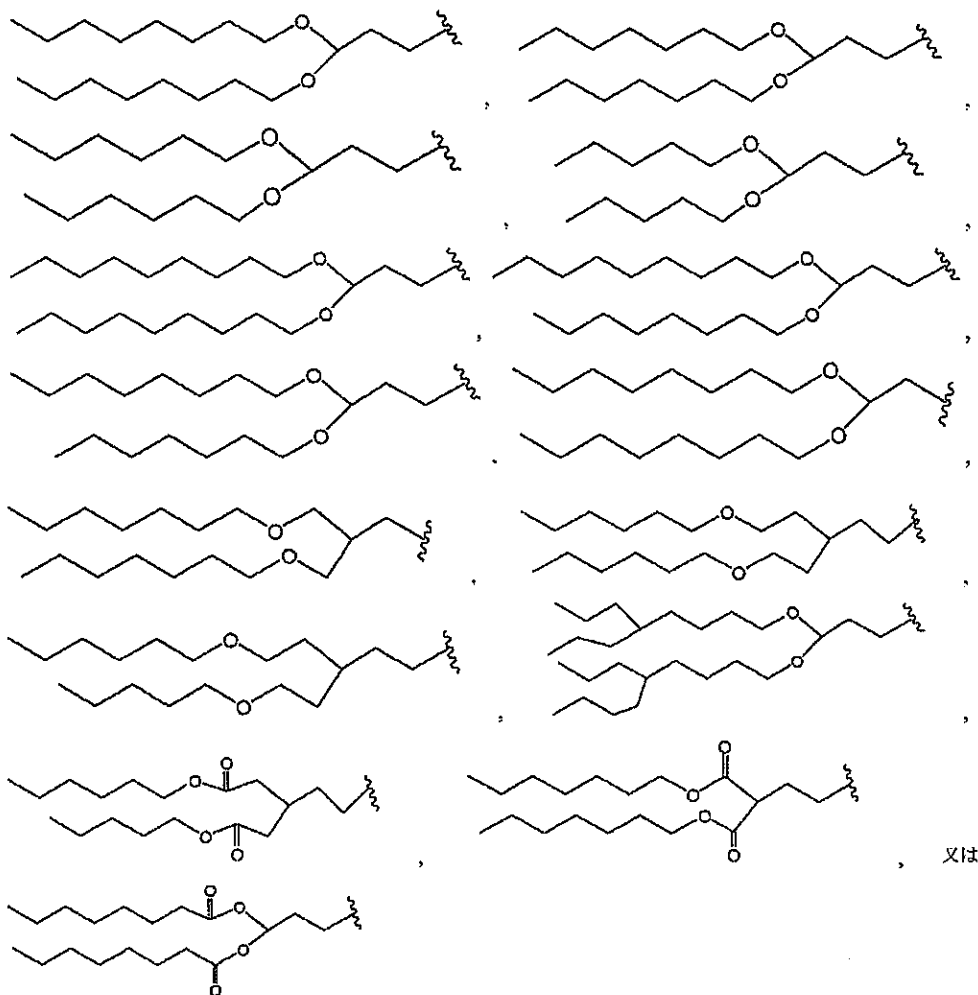
[0382]いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のLの各々は、独立して、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C_{10}\sim C_{10}$ アルキレン $-O-$ 、又はOである。いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のLの各々は、Oである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のLの各々は、 $-C_1\sim C_3$ アルキレン $-O-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)中のpは、1、2、3、4、又は5である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)中のpは、2である。

[0339]

[0383]いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^1 は、以下である。

[化8]

10



20

30

[0340]

[0384]いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 の各々は、独立して、H、置換又は非置換の $C_1\sim C_4$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 の各々は、独立して、置換又は非置換の直鎖 $C_1\sim C_4$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 の各々は、Hである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 の各々は、H、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、又は $-CH(CH_3)_2$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 の各々は、独立して、H又は $-CH_3$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 の各々は、 $-CH_3$ である。

40

[0341]

[0385]いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)中のXは、 $-C(=O)O-$ 又は $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)中のXは、 $-C(=O)NR^4-$ 又は $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態で

50

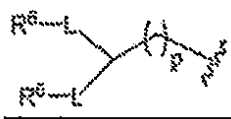
は、式 (I) 及び式 (I a) 中の X は、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ 、又は $-\text{NHC}(=\text{O})-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) 中の X は、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)-\text{OC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)-$ 、 $\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}-$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{NH})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{N}(\text{CH}_3)-$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{NH})\text{N}(\text{CH}_3)-$ 、 $\text{NHC}(=\text{NMe})\text{NH}-$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{NMe})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(=\text{NMe})\text{N}(\text{CH}_3)-$ 、又は $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{NMe})\text{N}(\text{CH}_3)-$ である。

10

【0342】

【0386】いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^2 は、 $\text{C}_7 \sim \text{C}_{22}$ アルキル、 $\text{C}_7 \sim \text{C}_{22}$ アルケニル、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ アルキレン- $\text{L}-\text{R}^6$ 、又は

【化9】



であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、及びシクロアルキルの各々は、独立して、置換又は非置換である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^2 は、置換若しくは非置換の $\text{C}_7 \sim \text{C}_{22}$ アルキル又は置換若しくは非置換の $\text{C}_7 \sim \text{C}_{22}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^2 は、置換若しくは非置換の直鎖 $\text{C}_7 \sim \text{C}_{22}$ アルキル又は置換若しくは非置換の直鎖 $\text{C}_7 \sim \text{C}_{22}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^2 は、置換若しくは非置換の $\text{C}_{10} \sim \text{C}_{20}$ アルキル又は置換若しくは非置換の $\text{C}_{10} \sim \text{C}_{20}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^2 は、非置換 $\text{C}_{10} \sim \text{C}_{20}$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^2 は、非置換 $\text{C}_{10} \sim \text{C}_{20}$ アルケニルである。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^2 は、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ アルキレン- $\text{L}-\text{R}^6$ である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^2 は、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ アルキレン- $\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{R}^6$ 又は $-\text{C}_2 \sim \text{C}_{10}$ アルキレン- $\text{OC}(=\text{O})-\text{R}^6$ である。

20

30

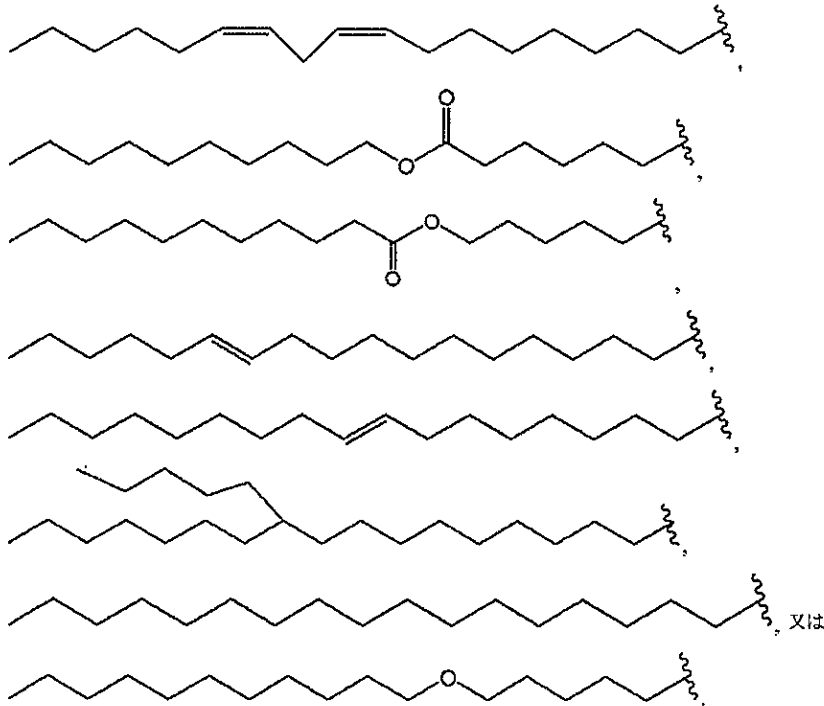
【0343】

【0387】いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^2 は、以下である。

40

50

【化 10】



10

20

【0344】

【0388】いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) 中の Y は、 $-C(=O)O-$ 又は $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) 中の Y は、 $-C(=O)NR^4-$ 又は $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) 中の Y は、 $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、又は $-NHC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) 中の Y は、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、又は $-NR^4C(=O)NR^4-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) 中の Y は、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、 $-NHC(=O)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)N(CH_3)-$ 又は $-N(CH_3)C(=O)NH-$ である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) 中の Y は、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、又は $-NHC(=O)NH-$ である。

30

【0345】

【0389】いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 又は $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、アルキレン及びヘテロシクロアルキルは、独立して、置換又は非置換である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_1 \sim C_6$ アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_1 \sim C_4$ アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_1$ アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_2$ アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_3$ アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_4$ アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_5$ アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_0 \sim C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態

40

50

では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_1 \sim C_6$ アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、ヘテロシクロアルキルは、1～3個の窒素と0～2個の酸素を含む。いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、 $-C_1 \sim C_6$ アルキレン-ヘテロシクロアルキルである。

【0346】

[0390]いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^7 及び R^8 の各々は、独立して、水素、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 の各々は、独立して、水素、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_3$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 の各々は、独立して、置換又は非置換の $C_1 \sim C_3$ アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 の各々は、独立して、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、又は $-CH(CH_3)_2$ である。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 の各々は、 CH_3 である。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 の各々は、 $-CH_2CH_3$ である。

10

【0347】

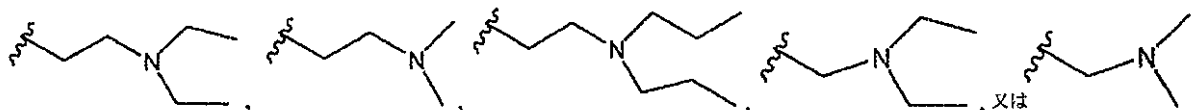
[0391]いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^7 及び R^8 は、これらが接続する窒素とともに、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクリルを形成する。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 は、これらが接続する窒素とともに、置換若しくは非置換の $C_2 \sim C_6$ ヘテロシクロアルキルを形成する。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 は、これらが接続する窒素とともに、置換若しくは非置換の3～7員のヘテロシクロアルキルを形成する。

20

【0348】

[0392]いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、以下である。

【化11】

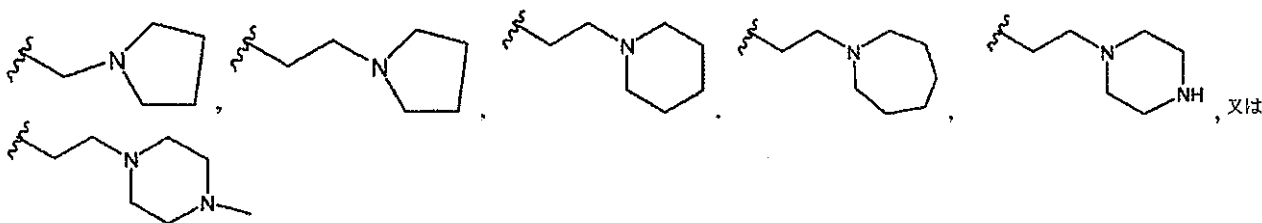


【0349】

[0393]いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、以下である。

30

【化12】

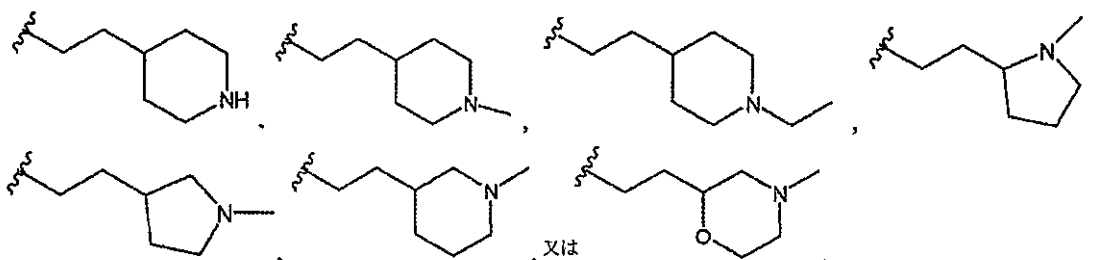


【0350】

[0394]いくつかの実施形態では、式 (I) 及び式 (I a) の R^3 は、以下である。

40

【化13】



50

【0351】

[0395]いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)中のZは、 $-C(=O)O-$ 又は $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(Ia)中のZは、 $-C(=O)NR^4-$ 又は $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)中のZは、 $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、又は $-NHC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)中のZは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(O)NR^4-$ 、又は $-NR^4C(=O)NR^4-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)中のZは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、 $-NHC(=O)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-NHC(=O)N(CH_3)-$ 又は $-N(CH_3)C(=O)NH-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)中のYは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、又は $-NHC(=O)NH-$ である。

10

【0352】

[0396]いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^5 は、水素、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_3$ アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^5 は、 H 、 $-CH_3$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、又は $-CH(CH_3)_2$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^5 は、 H である。

20

【0353】

[0397]いくつかの実施形態では、LNPは、複数のアミノ脂質を含む。例えば、LNP組成物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれより多くのアミノ脂質を含み得る。別の例について、LNP組成物は、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも9、少なくとも10、又は少なくとも20個のアミノ脂質を含み得る。なお別の例について、LNP組成物は、最大で2、最大で3、最大で4、最大で5、最大で6、最大で7、最大で9、最大で10、最大で20、又は最大で30個のアミノ脂質を含み得る。

【0354】

[0398]いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第1のアミノ脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第1のアミノ脂質及び第2のアミノ脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第1のアミノ脂質、第2のアミノ脂質、及び第3のアミノ脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第1のアミノ脂質、第2のアミノ脂質、第3のアミノ脂質、及び第4のアミノ脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第4のアミノ脂質を含まない。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第3のアミノ脂質を含まない。いくつかの実施形態では、第2のアミノ脂質に対する第1のアミノ脂質のモル比は、約0.1~約1.0である。いくつかの実施形態では、第2のアミノ脂質に対する第1のアミノ脂質のモル比は、約0.20~約5である。いくつかの実施形態では、第2のアミノ脂質に対する第1のアミノ脂質のモル比は、約0.25~約4である。いくつかの実施形態では、第2のアミノ脂質に対する第1のアミノ脂質のモル比は、約0.25、約0.33、約0.5、約1、約2、約3、又は約4である。

30

40

【0355】

[0399]いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約4：1：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約1：1：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約2：1：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約2：2：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約3：2：1である。いくつかの実施

50

実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約3：1：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約5：1：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約3：3：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約4：4：1である。

【0356】

【0400】いくつかの実施形態では、LNP組成物は、1つ以上のアミノ脂質を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のアミノ脂質は、粒子中に存在する全脂質の約40mol%～約65mol%を構成する。いくつかの実施形態では、1つ以上のアミノ脂質は、粒子中に存在する全脂質の約40mol%、約41mol%、約42mol%、約43mol%、約44mol%、約45mol%、約46mol%、約47mol%、約48mol%、約49mol%、約50mol%、約51mol%、約52mol%、約53mol%、約54mol%、約55mol%、約56mol%、約57mol%、約58mol%、約59mol%、約60mol%、約61mol%、約62mol%、約63mol%、約64mol%、又は約65mol%を構成する。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質は、粒子中に存在する全アミノ脂質の約1mol%～約99mol%を構成する。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質は、粒子中に存在する全アミノ脂質の約16.7mol%～約66.7mol%を構成する。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質は、粒子中に存在する全アミノ脂質の約20mol%～約60mol%を構成する。

【0357】

【0401】いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、イオン化可能な脂質である。イオン化可能な脂質は、1つ以上のイオン化可能な窒素原子を含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のイオン化可能な窒素原子のうちの少なくとも1つは、正に帯電している。いくつかの実施形態では、LNP組成物中のイオン化可能な窒素原子の少なくとも10mol%、20mol%、30mol%、40mol%、50mol%、60mol%、70mol%、80mol%、90mol%、95mol%、又は99mol%は、正に帯電している。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、一級アミン、二級アミン、三級アミン、イミン、アミド、グアニジン部分、ヒスチジン残基、リジン残基、アルギニン残基、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、一級アミン、二級アミン、三級アミン、グアニジン部分、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、三級アミンを含む。

【0358】

【0402】いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、カチオン性脂質である。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、イオン化可能な脂質である。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、1つ以上の窒素原子を含む。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、1つ以上のイオン化可能な窒素原子を含む。例示的なカチオン性及び／又はイオン化可能な脂質としては、限定されないが、3-（ジドデシルアミノ）-N1，N1，4-トリドデシル-1-ピペラジンエタンアミン（KL10）、N142-（ジドデシルアミノ）エチル-N1，N4，N4-トリドデシル-1，4-ピペラジンジエタンアミン（KL22）、14，25-ジドリデシル-15，18，21，24-テトラアザ-オクタトリアコンタン（KL25）、1，2-ジリノレイルオキシ-N，N-ジメチルアミノプロパン（DLin-DMA）、2，2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1，3]-ジオキサラン（DLin-KC2-DMA）、ヘプタトリアコンター-6，9，28，31-テトラエン-19-イル 4-（ジメチルアミノ）ブタノエート（DLin-MC3-DMA）、2，2-ジリノレイル-4-（2-ジメチルアミノエチル）-[1，3]-ジオキサラン（DLin-KC2-DMA）、1，2-ジオレイルオキシ-N，N-ジメチルアミノプロパン（DODMA）、2-（{8-[(3β)-コレスター-5-エン-3-イルオキシ]オクチル}オキシ）-N，N-ジメチル-3-[(9Z，12Z)-オクタデカ

ー 9, 12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン (オクチル-CLINDMA)、(2R)-2-({8-[(3β)-コレスター-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N, N-ジメチル-3-[(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン (オクチル-CLINDMA (2R))、及び (2S)-2-({8-[(3β)-コレスター-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N, N-ジメチル-3-[(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン (オクチル-CLINDMA (2S)) が挙げられる。

【0359】

[0403]いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアミノ脂質は、薬学的に許容される塩などの塩の形態をとることができる。アミノ脂質の全ての薬学的に許容される塩は、本開示に包含される。本明細書で使用される場合、アミノ脂質はまた、その薬学的に許容される塩、並びにそのジアステレオマー、鏡像異性体、及びエピマー形態を含む。

【0360】

[0404]いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアミノ脂質は、1つ以上の立体中心を有し、各立体中心は、R配座又はS配座のいずれかで独立して存在する。本明細書に提示される脂質には、全てのジアステレオマー、エナンチオマー、及びエピマーの形態、並びにそれらの適切な混合物が含まれる。本明細書で提供される脂質には、全てがシス、トランス、syn、anti、エントゲゲン(E)、ツザメン(Z)の異性体、及びそれらの適切な混合物が含まれる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の脂質は、化合物のラセミ混合物を光学活性分解剤と反応させてジアステレオマー化合物/塩の対を形成し、ジアステレオマーを分離し、光学的に純粋なエナンチオマーを回収することによって、それらの個々の立体異性体として調製される。いくつかの実施形態では、エナンチオマーの分割は、本明細書に記載の化合物の共有結合ジアステレオマー誘導体を使用して行われる。別の実施形態では、ジアステレオマーは、溶解度の差に基づいて、分離/分解技術によって分離される。他の実施形態では、立体異性体の分離は、クロマトグラフィーによって、又は形成するジアステレオマー塩によって行われ、再結晶化、又はクロマトグラフィー、又はそれらの任意の組み合わせによる分離によって行われる。Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981。一態様では、立体異性体は、立体選択的合成によって得られる。

【0361】

[0405]いくつかの実施形態では、アミノ脂質などの脂質は、本明細書に開示される構造に基づいて置換される。いくつかの実施形態では、アミノ脂質などの脂質は、非置換である。別の実施形態では、本明細書に記載の脂質は、(例えば、放射性同位体により)同位体標識されるか、又は発色団又は蛍光性部分、生物発光性標識、又は化学発光性標識の使用を含むが、これらに限定されない、別の他の手段によって標識される。

【0362】

[0406]本明細書に記載の脂質は、同位体標識された化合物を含み、これらは、本明細書に提示される様々な式及び構造に列挙されるものと同一であるが、1つ以上の原子が、天然に通常見られる原子質量又は質量数とは異なる原子質量又は質量数を有する原子によって置き換えられるという事実について同一ではない。本発明の脂質に組み込まれ得る同位体の例としては、水素、炭素、窒素、酸素、硫黄、フッ素、及び塩素の同位体、例えば、 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl が挙げられる。一態様では、本明細書に記載の同位体標識された脂質、例えば、 ^3H 及び ^{14}C などの放射性同位体が組み込まれているものは、薬物及び/又は基質組織分布アッセイにおいて有用である。一態様では、重水素などの同位体による置換は、より大きな代謝安定性から生じるある特定の治療上の利点、例えば、インビボ半減期の増加又は必要投薬量の減少を提供する。

【0363】

【0407】いくつかの実施形態では、アミノ脂質の非対称炭素原子は、エナンチオマー的に濃縮された形態で存在する。ある特定の実施形態では、アミノ脂質の非対称炭素原子は、（S）配座又は（R）配座において、少なくとも50%のエナンチオマー過剰、少なくとも60%のエナンチオマー過剰、少なくとも70%のエナンチオマー過剰、少なくとも80%のエナンチオマー過剰、少なくとも90%のエナンチオマー過剰、少なくとも95%のエナンチオマー過剰、又は少なくとも99%のエナンチオマー過剰を有する。

【0364】

【0408】いくつかの実施形態では、開示されるアミノ脂質は、N-オキシドに変換され得る。いくつかの実施形態では、N-オキシドは、酸化剤（例えば、3-クロロペルオキシ安息香酸及び／又は過酸化水素）による処理によって形成される。したがって、記載されるアミノ脂質のN-オキシド化合物であって、価数及び構造によって許容される場合、N-O又は N^+-O^- と指定され得るものが本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、本開示の化合物中の窒素は、N-ヒドロキシ又はN-アルコキシに変換され得る。例えば、N-ヒドロキシ化合物は、rac-CPBAなどの酸化剤による親アミンの酸化によって調製することができる。示され、特許請求される全ての窒素含有化合物もまた考慮される。したがって、記載されるアミノ脂質のN-ヒドロキシ及びN-アルコキシ（例えば、N-OR、ここで、Rは、置換又は非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルケニル、 $C_1 \sim C_6$ アルキニル、3～14員の炭素環又は3～14員の複素環）誘導体も本明細書に開示される。

【0365】

PEG-脂質

【0409】本明細書で使用される場合、「PEG脂質」又は「PEG-脂質」は、ポリエチレングリコール構成要素を含む脂質を指す。

【0366】

【0410】いくつかの実施形態では、記載されるLNP組成物は、PEG-脂質を含む。いくつかの実施形態では、記載されるLNP組成物は、2つ以上のPEG-脂質を含む。例示的なPEG-脂質としては、脂質が挙げられるが、これに限定されない。例示的なPEG脂質としては、PEG改変ホスファチジルエタノールアミン、PEG改変ホスファチジン酸、PEG改変セラミド、PEG改変ジアルキルアミン、PEG改変ジアシルグリセロール、PEG改変ジアルキルグリセロール、及びこれらの混合物も挙げられるが、これらに限定されない。例えば、1つ以上のPEG脂質は、PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC、PEG-DSPE脂質、又はそれらの組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、PEG部分は、任意選択的に置換されたエチレングリコール又はエチレンオキシドの直鎖又は分岐鎖のポリマーである。いくつかの実施形態では、PEG部分は、例えば、1つ以上のアルキル、アルコキシ、アシル、ヒドロキシ、又はアリール基によって置換されている。いくつかの実施形態では、PEG部分は、PEG-ポリウレタン又はPEG-ポリプロピレンなどのPEGコポリマーを含む（例えば、j. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992)を参照されたい）。いくつかの実施形態では、PEG部分は、PEGコポリマーを含まず、例えば、PEGモノポリマーであってもよい。例示的なPEG脂質としては、PEG-ジラウロイルグリセロール、PEG-ジミリスチルグリセロール（PEG-DMG）、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステアロイルグリセロール（distearoylglycerol）（PEG-DSPE）、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステイルグリセロール（disteilylglycerol）、PEG-ジラウロイルグリカミド（dilawylglycamide）、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、PEG-ジステリルグリカミド、PEG-コレステロール、及びPEG-DMB（3，4-ジテトラデコキシルベンジル-〔オメガ〕-メチル-ポリ（

エチレングリコール) エーテル)、1, 2-ジミリスチル-*s n*-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000])が挙げられるが、これらに限定されない。

【0367】

[0411]いくつかの実施形態では、PEG脂質は、PEG-脂質コンジュゲート、例えば、ジアルキルオキシプロピルにカップリングしたPEG (例えば、PEG-DAAコンジュゲート)、ジアシルグリセロールにカップリングしたPEG (例えば、PEG-DAGコンジュゲート)、コレステロールにカップリングしたPEG、ホスファチジルエタノールアミンにカップリングしたPEG、及びセラミドにコンジュゲートしたPEG (例えば、米国特許第5, 885, 613号を参照されたい)、カチオン性PEG脂質、ポリオキサゾリン(POZ)-脂質コンジュゲート (例えば、POZ-DAAコンジュゲート、例えば、WO2010/006282を参照されたい)、ポリアミドオリゴマー (例えば、ATTA-脂質コンジュゲート)、並びにこれらの混合物である。

10

【0368】

[0412]PEG-脂質は、1つ以上のエチレングリコール単位、例えば、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも120、又は少なくとも150のエチレングリコール単位を含み得る。いくつかの実施形態では、PEG-脂質の数平均分子量は、約200Da~約5000Daである。いくつかの実施形態では、PEG-脂質の数平均分子量は、約500Da~約3000Daである。いくつかの実施形態では、PEG-脂質の数平均分子量は、約750Da~約2500Daである。いくつかの実施形態では、PEG-脂質の数平均分子量は、約750Da~約2500Daである。いくつかの実施形態では、PEG-脂質の数平均分子量は、約500Da、約750Da、約1000Da、約1250Da、約1500Da、約1750Da、又は約2000Daである。いくつかの実施形態では、1つ以上のPEG-脂質の多分散指数(PDI)は、2より小さい。いくつかの実施形態では、1つ以上のPEG-脂質のPDIは、最大で1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、又は3.0である。いくつかの実施形態では、1つ以上のPEG-脂質のPDIは、少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、又は3.0である。

20

30

【0369】

[0413]いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒子中に存在する全脂質の約0.1mol%~約10mol%を構成する。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒子中に存在する全脂質の約0.1mol%~約6mol%を構成する。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒子中に存在する全脂質の約0.5mol%~約5mol%を構成する。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒子中に存在する全脂質の約1mol%~約3mol%を構成する。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒子中に存在する全脂質の約2.0mol%~約2.5mol%を構成する。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、粒子中に存在する全脂質の約1mol%、約1.1mol%、約1.2mol%、約1.3mol%、約1.4mol%、約1.5mol%、約1.6mol%、約1.7mol%、約1.8mol%、約1.9mol%、約2.0mol%、約2.1mol%、約2.2mol%、約2.3mol%、約2.4mol%、約2.5mol%、約2.6mol%、約2.7mol%、約2.8mol%、約2.9mol%、又は約3.0mol%を構成する。

40

【0370】

リン脂質

[0414]本明細書で使用される場合、「リン脂質」は、リン酸部分及び不飽和脂肪酸鎖などの1つ以上の炭素鎖を含む脂質を指す。リン脂質は、1つ以上の多重(例えば、二重

50

又は三重）結合を含み得る。いくつかの実施形態では、リン脂質は、膜への融合を容易にし得る。例えば、カチオン性リン脂質は、膜（例えば、細胞膜又は細胞内膜）の1つ以上の負に帯電したリン脂質と相互作用し得る。リン脂質の膜への融合は、LNPの1つ以上の要素が膜を通過すること、すなわち、1つ以上の要素の細胞への送達を可能にし得る。

【0371】

【0415】いくつかの実施形態では、記載されるLNP組成物は、リン脂質を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミンアミン、グリセロリン脂質、スフィンゴリン脂質、グリセロホスホノ、スフィンゴ脂質ホスホノ脂質、天然レシチン、及び水素化リン脂質からなる群から選択される脂質を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリンを含む。例示的なホスファチジルコリンとしては、大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン（EPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DPPC）、2-オレオイル-1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（POPC）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMP C）、及びジオレオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、リン脂質は、DSPCである。

10

【0372】

【0416】いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルエタノールアミンアミンを含む。いくつかの実施形態では、ホスファチジルエタノールアミンは、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（DMPE）、16-0-Monome Le PE、16-0-ジメチルPE、18-1-トランスPE、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン（POPE）、又は1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン（SOPE）である。いくつかの実施形態では、リン脂質は、グリセロリン脂質を含む。いくつかの実施形態では、グリセロリン脂質は、プラズマローゲン、ホスファチデート、又はホスファチジルコリンである。いくつかの実施形態では、グリセロリン脂質は、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール（POPG）、又はリゾホスファチジルコリンである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、スフィンゴリン脂質を含む。いくつかの実施形態では、スフィンゴリン脂質は、スフィンゴミエリン、セラミドホスホエタノールアミン、セラミドホスホグリセロール、又はセラミドホスホグリセロリン酸である。いくつかの実施形態では、リン脂質は、天然レシチンを含む。いくつかの実施形態では、天然レシチンは、卵黄レシチン又は大豆レシチンである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、水素化リン脂質を含む。いくつかの実施形態では、水素化リン脂質は、水素化大豆ホスファチジルコリンである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、及びジリノレオイルホスファチジルコリンからなる群から選択される。

20

30

40

【0373】

【0417】いくつかの実施形態では、リン脂質は、以下から選択される脂質を含む。1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）。1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、1,2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DLPC）、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-ホスホコリン（DMP C）、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3

50

ーホスホコリン (DOPC)、1, 2-ジパルミトイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC)、1, 2-ジウンデカノイル-*sn*-グリセロ-ホスホコリン (DUPC)、2-オレオイル-1-パヒニトイル (pahnitoyl)-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC)、1, 2-ジオ-*O*-オクタデセニル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (18:0 ジエテルPC)、1-オレオイル-2-コレステリルヘミスクシノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (OChemSPC)、1-ヘキサデシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (C16 LysopC)、1, 2-ジリノレノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジアラキドノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジドコサヘキサエノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジフィタノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (ME 10 16.0 PE)、1, 2-ジステアロイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1, 2-ジリノレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1, 2-ジリノレノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1, 2-ジアラクリドノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1, 2-ジドコサヘキサエノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1, 2-ジオールエオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-*rac*-(1-グリセロール) ナトリウム塩 (DOPG)、及びスフィンゴミエリン。

【0374】

【0418】リン脂質は、リン脂質部分と、1つ以上の脂肪酸部分と、を含み得る。リン脂質部分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、2-リゾホスファチジルコリン、又はスフィンゴミエリンを含み得る。脂肪酸部分は、ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、エルカ酸、フィタン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、又はドコサヘキサエン酸を含み得る。いくつかの特定の実施形態では、リン脂質は、1つ以上のアルキンで官能化又は架橋されてもよく、これは、アジドへの曝露時に銅触媒付加環化を受け得る。

【0375】

【0419】いくつかの実施形態では、LNP組成物は、複数のリン脂質、例えば、少なくとも2、3、4、5、又はそれより多くの異なるリン脂質を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、粒子中に存在する全脂質の1mol%~20mol%を構成する。いくつかの実施形態では、リン脂質は、粒子中に存在する全脂質の約5mol%~約15mol%を構成する。いくつかの実施形態では、リン脂質は、粒子中に存在する全脂質の約8mol%~約12mol%を構成する。いくつかの実施形態では、リン脂質は、粒子中に存在する全脂質の約9mol%、10mol%、又は11mol%を構成する。

【0376】

コレステロール

【0420】いくつかの実施形態では、LNP組成物は、コレステロール又はその誘導体を含む。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、構造脂質を含む。構造脂質は、ステロイド、ステロール、アルキルレゾレイノール、コレステロール又はそれらの誘導体、フェ 40 コステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンベステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソール酸、アルファトコフェロール、及びそれらの組み合わせから選択することができる。いくつかの実施形態では、構造脂質は、プレドニゾロン、デキサメタゾン、プレドニゾン、及びヒドロコルチゾンなどのコルチコステロイドである。いくつかの実施形態では、コレステロール又はその誘導体は、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノール、又はコレステロールヘミスクシネートである。いくつかの実施形態では、コレステロール又はその誘導体は、コレステロールである。

【0377】

【0421】いくつかの実施形態では、コレステロール又はその誘導体は、コレステロール

10

20

30

40

50

誘導体である。いくつかの実施形態では、コレステロール誘導体は、極性コレステロール類似体である。いくつかの実施形態では、極性コレステロール類似体は、5 α -コレスタノール、5 β -コプロスタノール、コレステリル-(2'-ヒドロキシ)-エチルエーテル、コレステリル-(4'-ヒドロキシ)-ブチルエーテル、又は6-ケトコレスタノールである。いくつかの実施形態では、極性コレステロール類似体はコレステリル-(4'-ヒドロキシ)-ブチルエーテルである。いくつかの実施形態では、コレステロール誘導体は、非極性コレステロール類似体である。いくつかの実施形態では、非極性コレステロール類似体は、5 α -コレスタン、コレステノン、5 α -コレスタノン、5 β -コレスタノン、又はコレステチルデカノエート(cholestetyl decanoate)である。

10

【0378】

【0422】いくつかの実施形態では、コレステロール又はその誘導体は、粒子中に存在する全脂質の20mol%~50mol%を構成する。いくつかの実施形態では、コレステロール又はその誘導体は、粒子中に存在する全脂質の約20mol%、約21mol%、約22mol%、約23mol%、約24mol%、約25mol%、約26mol%、約27mol%、約28mol%、約29mol%、約30mol%、約31mol%、約32mol%、約33mol%、約34mol%、約35mol%、約36mol%、約37mol%、約38mol%、約39mol%、約40mol%、約41mol%、約42mol%、約43mol%、約44mol%、約45mol%、約46mol%、約47mol%、約48mol%、又は約50mol%を構成する。

20

【0379】

リン酸電荷中和剤

【0423】いくつかの実施形態では、本明細書に記載のLNPは、リン酸電荷中和剤を含む。いくつかの実施形態では、リン酸電荷中和剤は、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、リジン、ヒスチジン、カチオン性デンドリマー、ポリアミン、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、リン酸電荷中和剤は、1つ以上の窒素原子を含む。いくつかの実施形態では、リン酸電荷中和剤は、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態では、ポリアミンは、1,3-プロパンジアミン、スペルミン、スペルミジン、ノルスペルミジン、トリス(2-アミノエチダミン、シクレン、1,4,7-トリアザシクロノナン、1,1,1-トリス(アミノメチル)エタン、ジエチレントリアミン、トリエチレントトラミン、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、ポリアミンは、1,3-プロパンジアミン、1,4-ブタンジアミン、スペルミン、スペルミジン、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、リン酸電荷中和剤のN/P比は、0.01~10である。いくつかの実施形態では、リン酸電荷中和剤のN/P比は、約0.05~約2である。いくつかの実施形態では、リン酸電荷中和剤のN/P比は、約0.1~約1である。いくつかの実施形態では、リン酸電荷中和剤のN/P比は、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、又は約1である。いくつかの実施形態では、リン酸電荷中和剤のNIP比は、約0.25、0.5、又は0.75である。

30

【0380】

抗酸化剤

【0424】いくつかの実施形態では、本明細書に記載のLNPは、1つ以上の抗酸化剤を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗酸化剤は、カチオン性脂質、ペイロード、又は両方の分解を減少させるように機能する。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗酸化剤は、親水性抗酸化剤を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗酸化剤は、エチレンジアミン四酢酸(ethylenediaminetetraacetic acid)(EDTA)及びクエン酸塩などのキレート剤である。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗酸化剤は、EDTAである。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗酸化剤は、親油性抗酸化剤を含む。いくつかの実施形態では、親油性抗酸化剤は、ビタミンE異性体又はポリフェノールを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗酸化剤は、少なく

40

50

とも 1 m M、少なくとも 1 0 m M、少なくとも 2 0 m M、少なくとも 5 0 m M、又は少なくとも 1 0 0 m M の濃度で L N P 組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、1 つ以上の抗酸化剤は、粒子中に約 2 0 m M の濃度で存在する。

【0381】

ペイロード

【0425】本明細書に記載の L N P は、治療剤又は目的の標的などのペイロードを送達するように設計することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される L N P は、本明細書に記載される塩基エディター系の 1 つ以上の構成要素を取り囲む。例えば、L N P は、ガイド RNA、ガイド RNA をコードする核酸、ガイド RNA をコードするベクター、塩基エディター融合タンパク質、塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸、プログラマブル DNA 結合ドメイン、プログラマブル DNA 結合ドメインをコードする核酸、デアミナーゼ、デアミナーゼをコードする核酸、又はそれらの全て若しくは任意の組み合わせのうちの 1 つ以上を取り囲み得る。いくつかの実施形態では、核酸は、DNA である。いくつかの実施形態では、核酸は、RNA、例えば、m RNA である。

10

【0382】

【0426】追加の例示的な治療剤としては、抗体（例えば、モノクローナル、キメラ、ヒト化、ナノボディ、及びそれらの断片など）、コレステロール、ホルモン、ペプチド、タンパク質、化学療法薬及び他の種類の抗新生物剤、低分子量薬物、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素核酸、アンチセンス核酸、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、アンチセンス DNA 若しくは RNA 組成物、キメラ DNA：RNA 組成物、アロザイム、アプタマー、リボザイム、デコイ及びそれらのアナログ、プラスミド及び他の種類の発現ベクター、及び小さな核酸分子、RNA i 剤、短鎖干渉核酸（s i N A）、メッセンジャーリボ核酸（メッセンジャー RNA、m RNA）、短鎖干渉 RNA（s i R N A）、二本鎖 RNA（d s R N A）、マイクロ RNA（m i R N A）、及び短ヘアピン RNA（s h R N A）分子、ペプチド核酸（P N A）、ロックド核酸リボヌクレオチド（L N A）、モルホリノヌクレオチド、トレオース核酸（T N A）、グリコール核酸（G N A）、s i s i R N A（低分子内部セグメント化干渉 RNA）、a i R N A（非対称干渉 RNA）、並びに細胞培養物、対象又は生物などの関連細胞及び／又は組織に対するセンス鎖とアンチセンス鎖との間に 1、2 個、又はそれより多くのミスマッチを有する s i R N A が挙げられるが、これらに限定されない。治療剤は、精製又は部分的に精製することができ、天然に存在するもの、合成物、又は化学的に改変されたものであり得る。いくつかの実施形態では、治療剤は、RNA i 剤、短鎖干渉核酸（s i N A）、短鎖干渉 RNA（s i R N A）、二本鎖 RNA（d s R N A）、マイクロ RNA（m i R N A）、又は短ヘアピン RNA（s h R N A）分子である。いくつかの実施形態では、治療剤は、m RNA である。

20

30

【0383】

【0427】いくつかの実施形態では、ペイロードは、1 つ以上の核酸（複数可）（すなわち、1 つ以上の核酸分子実体）を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、一本鎖核酸である。いくつかの実施形態では、一本鎖核酸は、DNA である。いくつかの実施形態では、一本鎖核酸は、RNA である。いくつかの実施形態では、核酸は、二本鎖核酸である。いくつかの実施形態では、二本鎖核酸は、DNA である。いくつかの実施形態では、二本鎖核酸は、RNA である。いくつかの実施形態では、二本鎖核酸は、DNA-RNA ハイブリッドである。いくつかの実施形態では、核酸は、メッセンジャー RNA（m RNA）、マイクロ RNA、非対称干渉 RNA（a i R N A）、短ヘアピン RNA（s h R N A）、又は D i c e r-S u b s t r a t e d s R N A である。

40

【0384】

他の脂質

【0428】いくつかの実施形態では、開示される L N P 組成物は、ヘルパー脂質を含む。いくつかの実施形態では、開示される L N P 組成物は、中性脂質を含む。いくつかの実施形態では、開示される L N P 組成物は、ステルス脂質を含む。いくつかの実施形態では、

50

開示される L N P 組成物は、追加の脂質を含む。

【0385】

[0429] 本明細書で使用される場合、本開示の脂質組成物における使用に好適な中性脂質としては、例えば、様々な中性、非荷電性、又は双性イオン性の脂質を含む。本開示における使用に好適な中性リン脂質の例としては、限定されないが、5-ヘプタデシルベンゼン-1,3-ジオール（レゾルシノール）、1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DPPC）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、ホスホコリン（DOPC）、1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DMPC）、ホスファチジルコリン（PLPC）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DAPC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、卵ホスファチジルコリン（EPC）、ジラウリロイルホスファチジルコリン（DLPC）、1-ミリストイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン（MPPC）、1-パルミトイル-2-ミリストイルホスファチジルコリン（PMP）、1-パルミトイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン（PSPC）、1,2-ジアラキドイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DBPC）、1-ステアロイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン（SPPC）、1,2-ジエイコセノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DEPC）、2-オレオイル-1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（POPC）、リゾホスファチジルコリン、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）、ジリノレオイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（POPE）、リゾホスファチジルエタノールアミン、及びそれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態では、中性リン脂質は、DSPC及びジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（DMPE）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、中性リン脂質は、DSPCである。中性脂質は、LNPの処理を安定化し、改良するように機能し得る。

【0386】

[0430] ヘルパー脂質は、トランスフェクション（例えば、生物学的に活性な薬剤を含む、本明細書で提供される組成物を含むナノ粒子（LNP）のトランスフェクション）を増強する脂質を指し得る。ヘルパー脂質がトランスフェクションを増強する機構には、粒子の安定性を増強することが含まれる。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、膜融合性を増強する。「ヘルパー脂質」には、ステロイド、ステロール、及びアルキルレゾルシノールが含まれ得る。本開示において使用するのに好適なヘルパー脂質としては、限定されないが、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノール、及びヘミコハク酸コレステロールが挙げられ得る。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、ヘミコハク酸コレステロールである。

【0387】

[0431] 「ステルス脂質」は、ナノ粒子がインビボ（例えば血管中）で存在し得る時間の長さを変化させる脂質を指し得る。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を減少させ、粒径を制御することによって製剤化プロセスを補助し得る。本明細書において使用されるステルス脂質は、LNPの薬物動態特性を調節し得る。本開示の脂質組成物における使用に好適なステルス脂質としては、限定されないが、脂質部分に連結した親水性頭部基を有するステルス脂質が挙げられ得る。本開示の脂質組成物における使用に好適なステルス脂質及びそのような脂質の生化学に関する情報は、Romberg et al, Pharmaceutical Research, Vol. 25, No. 1 2008, pg. 55-71 及び I-Toekstra et al, Biochimica et Biophysica Acta 1660 (2004) 41-52 において見出すことができる。追加の好適なPEG脂質は、WO2006/007712に開示される。

【0388】

【0432】いくつかの実施形態では、ステルス脂質は、PEG脂質である。一実施形態では、ステルス脂質の親水性頭部基は、PEGに基づくポリマー（ポリ（エチレンオキシド）と呼ばれることもある）、ポリ（オキサゾリン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（グリセロール）、ポリ（N-ビニルピロリドン）、ポリアミノ酸、及びポリN-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドから選択されるポリマー部分を含む。ステルス脂質は、脂質部分を含み得る。いくつかの実施形態では、ステルス脂質の脂質部分は、独立して約C4～約C40の飽和若しくは不飽和の炭素原子を含むアルキル鎖長を有するジアルキルグリセロール基又はジアルキルグリカミド基を含むものを含め、ジアシルグリセロール又はジアシルグリカミドに由来していてもよく、鎖は、1つ以上の官能基（例えば、アミド若しくはエステルなど）を含んでいてもよい。ジアルキルグリセロール又はジアルキルグリカミド基は、1つ以上の置換アルキル基を更に含み得る。

10

【0389】

【0433】ヘルパー脂質、中性脂質、ステルス脂質、及び／又は他の脂質の構造及び特性は、W02017/173054A1、W02019/067999A1、US2018/0290965A1、US2018/0147298A1、US2016/0375134A1、US8236770、US8021686、US8236770B2、US7371404B2、US7780983B2、US7858117B2、US2018/0200186A1、US2007/0087045A1、W02018/119514A1、及びW02019/067992A1に更に記載されており、これらの全ては、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0390】

LNP製剤化

【0434】本明細書に記載されるLNPは、1つ以上の特定の用途又は標的のために設計することができる。ナノ粒子（LNP）組成物又は組成物の要素は、特定の用途又は標的に基づいて、かつ／又は有効性、毒性、費用、使いやすさ、及び利用可能性に基づいて選択することができる。同様に、ナノ粒子組成物の特定の製剤は、特定の用途又は標的のために選択され得る1つ以上の記載された脂質を含む組成物である。製剤に使用するのに好適なリン酸電荷中和剤には、スベルミジン及び1,3-プロパンジアミンが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0391】

【0435】記載されるLNP製剤は、1つ以上の特定の用途又は標的のために設計することができる。例えば、ナノ粒子組成物は、哺乳動物の体内の特定の細胞、組織、器官、又はそれらの系若しくは群にRNAなどの治療剤を送達するように設計され得る。特定の身体標的に対する選択性を高めるために、ナノ粒子組成物の物理化学的特性を変化させてもよい。例えば、粒径は、異なる器官の開窓サイズに基づいて調整され得る。ナノ粒子組成物に含まれる治療剤はまた、所望の1つ以上の送達標的に基づいて選択されてもよい。例えば、治療剤は、特定の適応症、状態、疾患、若しくは障害、及び／又は特定の細胞、組織、器官、若しくは系若しくはそれらの群への送達（例えば、局所的若しくは特異的送達）のために選択されてもよい。ある特定の実施形態では、ナノ粒子組成物は、細胞内で翻訳されて目的のポリペプチドを産生することができる目的のポリペプチドをコードするmRNAを含み得る。そのような組成物は、特定の器官に特異的に送達されるように設計され得る。

40

【0392】

【0436】LNP組成物中の治療剤の量は、ナノ粒子組成物のサイズ、組成、所望の標的及び／又は用途、又は他の特性に依存し得る。例えば、ナノ粒子組成物に含まれるRNAの量は、RNAのサイズ、配列、及び他の特徴に依存し得る。ナノ粒子組成物中の治療剤及び他の要素（例えば、脂質）の相対量も変化し得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物中の治療剤に対する脂質構成要素の重量／重量比は、約5：1～約60：1、例えば約5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1、11：1、12：1、13

50

：1、14：1、15：1、16：1、17：1、18：1、19：1、20：1、25：1、30：1、35：1、40：1、45：1、50：1、及び60：1であり得る。例えば、治療剤に対する脂質構成要素の重量／重量比は、約10：1～約40：1であってもよい。ある特定の実施形態では、重量／重量比は、約20：1である。ナノ粒子組成物中の治療剤の量は、吸光分光法（例えば、紫外線可視分光法）を使用して測定することができる。

【0393】

【0437】いくつかの実施形態では、LNP組成物は、RNAなどの1つ以上の核酸を含む。いくつかの実施形態では、特定のNIP比を提供するように1つ以上のRNA、脂質、及びそれらの量を選択してもよい。NIP比は、約1～約30から選択することができる。N／P比は、約2～約10から選択することができる。いくつかの実施形態では、NIP比は、約0.1～約50である。いくつかの実施形態では、N／P比率は、約2～約8である。いくつかの実施形態では、NIP比は、約2～約15、約2～約10、約2～約8、約2～約6、約3～約15、約3～約10、約3～約8、約3～約6、約4～約15、約4～約10、約4～約8、又は約4～約6である。いくつかの実施形態では、N／P比は、約2、約2.5、約3、約3.5、約4、約4.5、約5、約5.5、約6、又は約6.5である。いくつかの実施形態では、NIP比は、約4～約6である。いくつかの実施形態では、NIP比は、約4、約4.5、約5、約5.5、又は約6である。

【0394】

【0438】いくつかの実施形態では、LNPは、約50%～約70%、約70%～約90%、又は約90%～約100%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態では、LNPは、約75%～約95%の範囲の平均封入効率で形成される。

【0395】

【0439】別の態様では、本明細書で提供される組成物を含む脂質ナノ粒子（LNP）が本明細書で提供される。本明細書で使用される場合、脂質ナノ粒子（LNP）組成物又はナノ粒子組成物は、1つ以上の記載される脂質を含む組成物である。LNP組成物は、典型的には、マイクロメートル以下の程度のサイズであり、脂質二重層を含み得る。ナノ粒子組成物は、脂質ナノ粒子（LNP）、リポソーム（例えば、脂質小胞）、及びリポプレックスを包含する。いくつかの実施形態では、LNPは、1000nm、500nm、250nm、200nm、150nm、100nm、75nm、50nm、又は25nmより小さな直径を有する任意の粒子を指す。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、1～1000nm、1～500nm、1～250nm、25～200nm、25～100nm、35～75nm、又は25～60nmの範囲のサイズであり得る。いくつかの実施形態では、500nm以下の直径を有する脂質二重層を有するリポソーム。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のLNPは、約1nm～約2500nm、約10nm～約1500nm、約20nm～約1000nm、約30nm～約150nm、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、約70nm～約100nm、約80nm～約100nm、約90nm～約100nm、約70～約90nm、約80nm～約90nm—又は約70nm～約80nmの平均直径を有し得る。本明細書に記載のLNPは、約30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm、150nm、又はそれより大きな平均直径を有し得る。本明細書に記載されるLNPは、実質的に非毒性であり得る。

【0396】

【0440】いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性、アニオン性、又は中性脂質から作製され得る。いくつかの実施形態では、LNPは、トランスフェクション活性及びナノ粒子安定性を増強するためのヘルパー脂質として、融合性リン脂質1，2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）又は膜成分コレステロ

ールなどの中性脂質を含み得る。いくつかの実施形態では、LNPは、疎水性脂質、親水性脂質、又は疎水性及び親水性脂質の両方を含み得る。当該技術分野で既知の任意の脂質又は脂質の組み合わせを使用して、LNPを生成することができる。LNPを生成するために使用される脂質の例としては、限定されないが、DOTMA (N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)、DOSPA (N,N-ジメチル-N-([2-スベルミンカルボキサミド]エチル)-2,3-ビス(ジオレイルオキシ)-1-プロパンイミニウム五塩酸塩)、DOTAP (1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン)、DMRIE (N-(2-ヒドロキシエチル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ-1-プロパンイミニウムプロミド)、DC-コレステロール (3 β -[N-(N',N'-ジメチルアミノ)エタン]-カルバモイル) コレステロール)、DOTAP-コレステロール、GAP-DMORIE-DPYPE、及びGL67A-DOPE-DMPE (2-ビス(ジメチルホスフィノ)エタノ)-ポリエチレングリコール(PEG)が挙げられる。カチオン性脂質の例としては、限定されないが、98N12-5、C12-200、DLin-KC2-DMA (KC2)、DLin-MC3-DMA (MC3)、XTC、MD1、及び7C1が挙げられる。中性脂質の例としては、限定されないが、DPSC、DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン)、POPC (1-パルミトイル-2-オレイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DOPE、及びSM (スフィンゴミエリン)が挙げられる。PEG改変脂質の例としては、限定されないが、PEG-DMG (ジミリストイルグリセロール)、PEG-CerC14、及びPEG-CerC20が挙げられる。いくつかの実施形態では、脂質は、LNPを生成するために任意の数のモル比で組み合わせられてもよい。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、LNPを生成するために、広範囲のモル比で脂質(複数可)と組み合わせられてもよい。

【0397】

【0441】「置換された」という用語は、別途指示されない限り、所与の構造内の1つ以上の水素基を、限定されないが、ハロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロシクリル、チオール、アルキルチオ、オキソ、チオキシ、アリールチオ、アルキルチオアルキル、アリールチオアルシル(arylthioalkyl)、アルキルスルホニル、アルキルスルホニルアルキル、アリールスルホニルアルキル、アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アイイルアミノカルボニル(aiylaminocarbonyl)、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ハロアルキル、アミノ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アルキルアミノ、アリールアミノ、アルキルアミノアルキル、アイイルアミノアルキル(aiylaminoalkyl)、アミノアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシアリール、カルボキシアリール、アルコキシカルボニルアルキル、アミノカルボニルアルキル、アシル、アラルコキシカルボニル、カルボン酸、スルホン酸、スルホニル、ホスホン酸、アリール、ヘテロアリール、複素環式、及び脂肪族基を含む特定の置換基の基で置き換えることを指す。置換基は、更に置換され得ることを理解されたい。例示的な置換基としては、アミノ、アルキルアミノなどが挙げられる。

【0398】

【0442】本明細書で使用される場合、「置換基」という用語は、指定された原子の通常の価数を超えず、置換が安定した化合物をもたらすことを条件として、指定された原子位置で置換され、指定された原子上の1つ以上の水素を置き換える、コア分子の原子上の位置変数を意味する。置換基及び／又は変数の組み合わせは、そのような組み合わせが安定した化合物をもたらす場合のみ許容される。当業者は、本明細書に記載又は示されるように満たされないように見える価数を有する任意の炭素及びヘテロ原子が、記載又は示される価数を満たすのに十分な数の水素原子(複数可)を有すると想定されることに留意すべきである。ある特定の事例では、結合点として二重結合を有する1つ以上の置換基(例えば、「オキソ」又は「=O」)は、置換基内に本明細書に記載されるか、示されるか、又は列挙されてもよく、その構造は、式(I)のコア構造への結合点として単結合のみを示

してもよい。当業者であれば、単結合のみが示されているが、それらの置換基に対して二重結合が意図されていることを理解するであろう。

【0399】

【0443】「アルキル」という用語は、1～20個の炭素原子を有し、単結合によって分子の残りに接続する、直鎖又は分岐鎖の炭化水素鎖基を指す。最大10個の炭素原子を含むアルキルは、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキルと称され、同様に、例えば、最大6個の炭素原子を含むアルキルは、 $C_1 \sim C_6$ アルキルである。他の数の炭素原子を含むアルキル（及び本明細書で定義される他の部分）も同様に表される。アルキル基には、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_1 \sim C_9$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_7$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_5$ アルキル、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_2$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ アルキル及び $C_4 \sim C_8$ アルキルが含まれるが、これらに限定されない。代表的なアルキル基には、メチル、エチル、*n*-プロピル、1-メチルエチル（*i*-プロピル）、*n*-ブチル、*i*-ブチル、*s*-ブチル、*n*-ペンチル、1, 1-ジメチルエチル（*t*-ブチル）、3-メチルヘキシル、2-メチルヘキシル、1-エチル-*n*-プロピルなどが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アルキルは、メチル又はエチルである。いくつかの実施形態では、アルキルは、 $-CH(CH_3)_2$ 又は $-C(CH_3)_3$ である。本明細書で特に別途記載されない限り、アルキル基は、以下に記載されるように任意選択的に置換されてもよい。「アルキレン」又は「アルキレン鎖」は、分子の残りをラジカル基に連結する直鎖又は分岐鎖の二価炭化水素鎖を指す。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-CI-12-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、又は $-CH_2CH_2CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-CH_2CH_2CH_2-$ である。

【0400】

【0444】「アルケニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合が存在する、アルキル基の一種を指す。一実施形態では、アルケニル基は、式 $-C(R)=CR^2$ を有し、*R*は、同じであっても異なってもよいアルケニル基の残りの部分を指す。いくつかの実施形態では、*R*は、*H*又はアルキルである。いくつかの実施形態では、アルケニルは、エテニル（すなわち、ビニル）、プロペニル（すなわち、アリル）、ブテニル、ペンテニル、ペンタジエニルなどから選択される。アルケニル基の非限定的な例としては、 $-CH=CH_2$ 、 $-C(CH_3)=CH_2$ 、 $-CH=CHCH_3$ 、 $-C(CH_3)=CHCH_3$ 、及び $-CH_2CH=CH_2$ が挙げられる。

【0401】

【0445】「シクロアルキル」という用語は、単環式又は多環式の非芳香族基を指し、環を形成する原子（すなわち骨格原子）の各々が炭素原子である。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、飽和又は部分的に不飽和である。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、スピロ環式化合物又は架橋化合物である。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、芳香族環と縮合される（この場合、シクロアルキルは、非芳香族環炭素原子を介して結合される）。シクロアルキル基は、3～10個の環原子を有する基を含む。代表的なシクロアルキルには、3～10個の炭素原子、3～8個の炭素原子、3～6個の炭素原子、又は3～5個の炭素原子を有するシクロアルキルが含まれるが、これらに限定されない。単環式シクロアルキル基は、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルを含む。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、又はシクロヘキシルである。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロペンテニル又はシクロヘキセニルである。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロペンテニルである。多環式基として、例えば、アダマンチル、1, 2-ジヒドロナフタレニル、1, 4-ジヒドロナフタレニル、テトラインyl（tetra inyl）、デカリニル、3, 4-ジヒドロナフタレニル-1（2*H*）-オン、スピロ[2.2]ペンチル、ノルボミル、及び二環式[1.1.1]ペンチルが挙げられる。本明細書で特

に別途記載されない限り、シクロアルキル基は、任意選択的に置換されてもよい。構造に応じて、シクロアルキル基は、一価又は二価（すなわち、シクロアルキレン基）であり得る。

【0402】

【0446】「複素環」又は「複素環式」という用語は、窒素、酸素、及び硫黄から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含む複素芳香族環（ヘテロアリールとしても知られる）及びヘテロシクロアルシル（heterocycloalkyl）環（複素脂肪族基としても知られる）を指し、各複素環式基は、その環系に3～12個の原子を有し、任意の環が2つの隣接するO又はS原子を含有しないことを条件とする。「ヘテロシクリル」は、複素環式化合物の任意の環原子から水素原子を除去することによって形成される一価の基である。いくつかの実施形態では、複素環は、単環式、二環式、多環式、スピロ環式又は架橋化合物である。非芳香族複素環式基（ヘテロシクロアルキルとしても知られる）は、その環系に3～12個の原子を有する環を含み、芳香族複素環式基は、その環系に5～12個の原子を有する環を含む。複素環式基としては、ベンゾ縮合環系が挙げられる。非芳香族複素環式基の例は、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、オキサゾリジノニル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、チオキサニル、ピペラジニル、アジリジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモピペリジニル、オキセパニル、チエパニル、オキサゼピニル、ジアゼピニル、チアゼピニル、1, 2, 3, 6-テトラヒドロピリジニル、ピロリン-2-イル、ピロリン-3-イル、インドリニル、2H-ピラニル、4Hピラニル、ジオキサニル、1, 3-ジオキサソラニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサニル、3-アザビシクロ[4.1.0]ヘプタニル、3h-インドリル、インドリン-2-オニル、イソインドリン-1-オニル、イソインドリン-1, 3-ジオニル、3, 4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オニル、3, 4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オニル、イソインドリン-1, 3-ジチオニル、ベンゾ[d]オキサゾール-2(3H)-オニル、1H-ベンゾ[d]イミダゾール-2(3H)-オニル、ベンゾ[d]チアゾール-2(3H)-オニル、及びキノリジニルである。芳香族複素環式基の例は、ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フチル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピローリル、キノリニル、イソキノリニル、インドリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、シンノリニル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、イソインドリル、プテリジニル、プリニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、ベンゾフラザニル、ベンゾチオフエニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、及びフロピリジニルである。前述の基は、可能である場合、C結合（又はC連結）又はN結合のいずれかである。例えば、ピロールに由来する基は、ピロール-1-イル（N結合）又はピロール-3-イル（C結合）の両方を含む。更に、イミダゾールに由来する基としては、イミダゾール-1-y1又はイミダゾール-3-イル（両方ともN結合）又はイミダゾール-2-イル、イミダゾール-4-イル又はイミダゾール-5-イル（全てC結合）が挙げられる。複素環式基は、ベンゾ縮合環系を含む。非芳香族複素環は、任意選択的に、ピロリジン-2-オンなどの1つ又は2つのオキソ(=O)部分で置換される。いくつかの実施形態では、二環式複素環の2つの環のうちの少なくとも1つは、芳香族である。いくつかの実施形態では、二環式複素環の両方の環が芳香族である。

【0403】

【0447】「ヘテロシクロアルキル」という用語は、窒素、酸素、及び硫黄から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含むシクロアルキル基を指す。本明細書で特に別途記載されない限り、ヘテロシクロアルキル基は、縮合（アリール又はヘテロウイル(heterowyl)環と縮合した場合、ヘテロシクロアルキルは、非芳香族環原子を介して結合

される)又は架橋環系を含み得る単環式又は二環式環系であり得る。ヘテロシクロリル基中の窒素、炭素又は硫黄原子は、任意選択的に酸化され得る。窒素原子は、任意選択的に四級化され得る。ヘテロシクロアルキル基は、部分的又は完全に飽和している。ヘテロシクロアルキル基の例としては、限定されないが、ジオキサニル、チエニル [1, 3] ジチアニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、デカヒドロキノリル、デカヒドロイソキノリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、オクタヒドロインドリル、オクタヒドロイソインドリル、2-オキソピペラジニル、2-オキソピペリジニル、2-オキソピロリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、ピラゾリジニル、キヌクリジニル、チアゾリジニル、テトラヒドロフリル、トリチアニル、テトラヒドロピラニル、チオモルホリニル、チアモルホリニル、1-オキソチオモルホリニル、1, 1-ジオキソ-ジホモルホリニルが挙げられる。ヘテロシクロアルキルという用語はまた、単糖、二糖、及びオリゴ糖を含むが、これらに限定されない、炭水化物の全ての環形態を含む。別途注記されない限り、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~12個の炭素を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~10個の炭素を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~10個の炭素と1又は2個のN原子を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~10個の炭素と3又は4個のN原子を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~12個の炭素、0~2個のN原子、0~2個のO原子、0~2個のP原子、及び0~1個のS原子を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2~12個の炭素、1~3個のN原子、0~1個のO原子、及び0~1個のS原子を有する。ヘテロシクロアルキル中の炭素原子の数を指す場合、ヘテロシクロアルキル中の炭素原子の数は、ヘテロシクロアルキルを構成する原子(ヘテロ原子を含む)(すなわち、ヘテロシクロアルキル環の骨格原子)の総数と同じではないことが理解される。本明細書で特に別途記載されない限り、ヘテロシクロアルキル基は、任意選択的に置換され得る。本明細書で使用される場合、「テテロシクロアルキレン(tetrocycloalkylene)」という用語は、二価のヘテロシクロアルキル基を指すことができる。

10

20

30

40

50

[0404]

[0448]「ヘテロアリアル」という用語は、窒素、酸素、及び硫黄から選択される1つ以上の環ヘテロ原子を含むアリアル基を指す。ヘテロアリアルは、単環式又は二環式である。単環式ヘテロアリアルの例示的な例としては、ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピローリル、ピリダジニル、トリアジニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、インドリジン、インドール、ベンゾフラン、ベンゾチオフエン、インダゾール、ベンズイミダゾール、プリン、キノリジン、キノリン、イソキノリン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、1, 8-ナフチリジン、及びピテリジンが挙げられる。単環式ヘテロアリアルの例示的な例としては、ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピローリル、ピリダジニル、トリアジニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、及びフラザニルが挙げられる。二環式ヘテロアリアルの例示的な例としては、インドリジン、インドール、ベンゾフラン、ベンゾチオフエン、インダゾール、ベンズイミダゾール、プリン、キノリジン、キノリン、イソキノリン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、1, 8-ナフチリジン、及びプテリジンが挙げられる。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルは、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、チアゾリル、チエニル、チアジアゾリル又はフリルである。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルは、環内に0~6個のN原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルは、環内に1~4個のN原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルは、環内に4~6個のN原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテ

ロアリールは、環内に0～4個のN原子、0～1個のO原子、0～1個のP原子、及び0～1個のS原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、環中に1～4個のN原子、0～1個のO原子、及び0～1個のS原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、C₁～C₉ヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、単環式ヘテロアリールは、C₁～C₅ヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、単環式ヘテロアリールは、5員又は6員の単環式ヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、二環式ヘテロアリールは、C₆～C₉ヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、ヘテロアリール基は、部分的に還元されて、本明細書に定義されるヘテロシクロアルキル基を形成する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリール基は完全に還元されて、本明細書に定義されるヘテロシクロアルキル基を形成する。

10

【0405】

[0449]本明細書で使用される場合、「N/P比」は、(例えば、脂質構成要素及びRNAを含むナノ粒子組成物中の)核酸分子実体(又は複数の核酸分子実体)中のリン酸基に対する脂質(又は複数の脂質)中の(例えば、生理学的pH範囲で)イオン化可能な窒素原子のモル比である。イオン化可能な窒素原子は、例えば、約pH1、約pH2、約pH3、約pH4、約pH5、約pH6、約pH7、約pH7.5、又は約pH8、又はそれより大きなpHでプロトン化され得る窒素原子を含み得る。生理学的pH範囲は、例えば、異なる細胞区画(器官、組織、及び細胞など)及び体液(血液、CSF、胃液、乳、胆汁、唾液、涙、及び尿など)のpH範囲を含み得る。ある特定の実施形態では、生理学的pH範囲は、哺乳動物の血液のpH範囲、例えば、約7.35～約7.45のpH範囲を指す。同様に、1つ以上のイオン化可能な窒素原子を有するリン酸電荷中和剤の場合、N/P比は、核酸中のリン酸基に対するリン酸電荷中和剤中のイオン化可能な窒素原子のモル比を指し得る。いくつかの実施形態では、イオン化可能な窒素原子は、5～14のpH範囲内でイオン化可能な窒素原子を指す。

20

【0406】

[0450]本明細書に記載のgRNA及びmRNA薬物基質を封入するLNP製剤は、2021年3月4日出願された共同所有の米国特許出願第17/192,709号(国際出願番号第PCT/US21/20955号を有する同じ日に出願された並行したPCT出願)に開示されているものなどのGalNAc脂質製剤を含むように改変され得ることが更に企図される。そのようなGalNAc脂質製剤の使用は、ヘテロ接合性及びホモ接合性の家族性高コレステロール血症患者集団に関連するものなどのLDL-R欠損細胞におけるLNP取り込みを増強することができると理解される。

30

【0407】

[0451]リン酸基を含有しないペイロードの場合、N/P比は、ペイロード中の全負電荷に対する脂質中のイオン化可能な窒素原子のモル比を指すことができる。例えば、LNP組成物のN/P比は、LNP組成物中に存在するペイロード中の全負電荷に対するLNP組成物中の全イオン化可能な窒素原子のモル比を指すことができる。

【0408】

[0452]本明細書で使用される場合、アミノ脂質は、pH範囲4～14の間でプロトン化可能(又はイオン化可能)である、少なくとも1つの一級、二級、又は三級アミン部分を含有し得る。いくつかの実施形態では、アミン部分/複数のアミン部分は、アミノ脂質の親水性頭部基として機能する。核酸-脂質ナノ粒子製剤中のアミノ脂質(又は複数のアミノ脂質)のアミン部分(複数可)の大部分が生理学的pHでプロトン化されるとき、ナノ粒子はカチオン性脂質ナノ粒子(cLNP)と称され得る。核酸-脂質ナノ粒子製剤中のアミノ脂質(又は複数のアミノ脂質)のアミン部分(複数可)の大部分が生理学的pHでプロトン化されないが、酸性pHでプロトン化され得る場合、例えば、エンドソームpHは、イオン化可能脂質ナノ粒子(iLNP)と称され得る。cLNPを構成するアミノ脂質は、一般に、カチオン性アミノ脂質(cLipid)と称され得る。iLNPを構成するアミノ脂質は、イオン化可能なアミノ脂質(iLipid)と称され得る。アミノ脂質は、生理学的pHにおいてiLipid又はcLipidであり得る。

40

50

【0409】

【0453】追加のLNPは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT出願公開第WO2021/207712号に見出すことができる。

【0410】

GaLNAC-LNP

【0454】いくつかの態様では、GaLNAC-脂質ナノ粒子（GaLNAC-LNP）を含む製剤を調製する方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、（i）1つ以上の核酸活性剤、（ii）ステロール又はその誘導体、リン脂質、ステルス脂質、及びアミノ脂質から選択される1つ以上の脂質賦形剤、並びに／又は（iii）GaLNAC-脂質受容体標的化コンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、水性緩衝液中に1つ以上の核酸活性剤を含む第1の溶液を提供することを含み得る。いくつかの実施形態では、本方法は、（i）1つ以上の脂質賦形剤のうちの少なくとも1つ及び（ii）水混和性有機溶媒中の受容体標的化コンジュゲートの少なくとも一部を含む第2の溶液を提供することを含み得る。いくつかの実施形態では、本方法は、抗酸化剤を上述の第1の溶液と組み合わせることを含み得る。いくつかの実施形態では、本方法は、上述の第1の溶液と上述の第2の溶液とを混合することを含み得る。いくつかの実施形態では、本方法は、上述の第1及び第2の溶液の混合物をインキュベートして、GaLNAC-LNPを形成することを含み得る。いくつかの実施形態では、本方法は、希釈、緩衝液交換、濃縮、濾過、凍結、解凍、インキュベーション、及びGaLNAC-LNP評価から選択される1つ以上のプロセスを実施することを含み得る。

【0411】

【0455】いくつかの実施形態では、本方法のステップは、同時に行われる。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、順次行われる。

【0412】

【0456】いくつかの実施形態では、水性緩衝液は、ポリエチレングリコールを含む。いくつかの実施形態では、ポリエチレングリコールは、約200～約1000（例えば、約200、約400、約500、約600、又は約1000）の範囲の数平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、本方法は、GaLNAC-脂質を水溶液中で希釈して、希釈されたGaLNAC-LNP溶液を生成することを更に含む。いくつかの実施形態では、GaLNAC-LNPは、対象に直接投与するように構成される。いくつかの実施形態では、本方法は、上述のGaLNAC-LNPを溶液中で1回以上希釈することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、上述の水混和性有機溶媒を緩衝溶液と1回以上交換することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、上述のGaLNAC-LNPを濃縮することを更に含む。いくつかの実施形態では、濃縮することは、上述のGaLNAC-LNPを膜に通すことを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、第2の濃縮プロセスを更に含み、第2の濃縮は、交換緩衝液を膜に通すことによって上述のGaLNAC-LNPを濃縮することを含む。

【0413】

【0457】いくつかの実施形態では、本方法は、膜を介して上述のGaLNAC-LNPを濾過することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、ステップeの後の第2のインキュベーションを更に含み、インキュベーションは、約1分～約120分間行われる。いくつかの実施形態では、本方法は、上述のGaLNAC-LNPを約-80摂氏（℃）～約25℃の温度で保存することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、上述のGaLNAC-LNPを約-80摂氏（℃）又は約2℃～約8℃の温度で保存することを更に含む。

【0414】

【0458】いくつかの実施形態では、本方法は、（i）保存されたGaLNAC-LNPを解凍することと、（ii）GaLNAC-LNPをプールすることと、（iii）GaLNAC-LNPを溶液中で希釈することと、（iv）上述のGaLNAC-LNPの用量を対象に投与する前に、膜を介して上述のGaLNAC-LNPを濾過することと、を

含むことを更に含む。いくつかの実施形態では、ステップ (i i i) 及び (i v) を行う順序は逆である。いくつかの実施形態では、上述の混和性有機溶媒は、エタノールである。いくつかの実施形態では、上述の抗酸化剤は、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A) である。いくつかの実施形態では、上述の第 2 の溶液は、全ての受容体標的化コンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、上述の受容体標的化コンジュゲートの少なくとも一部は、混合ステップの前に 1 つ以上の脂質と組み合わせられる。

【0415】

[0459]いくつかの実施形態では、混合は、インラインミキサー、クロスミキサー、又は T ミキサー装置で行われる。いくつかの実施形態では、混合は、層状混合、ボルテックス混合、乱流混合、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、タンジェンシャルフロー過 (T F F) プロセスを使用して上述の G a l N A c - L N P を濃縮することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、クロマトグラフィー、透析、又は T F F プロセスを使用して緩衝液交換を行うことを更に含む。

10

【0416】

[0460]いくつかの実施形態では、受容体標的化コンジュゲートは、1 つ以上の N - アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 又は G a l N A c 誘導体を含む。いくつかの実施形態では、混合は、上述の第 1 の溶液を第 1 の混合チャンバに別々に導入する第 1 のポートと、上述の第 2 の溶液を上述の第 1 の混合チャンバに別々にかつ同時に導入する第 2 のポートとを含む上述の第 1 の混合チャンバを有するインライン混合装置によって行われる。いくつかの実施形態では、上述の第 1 の溶液は、R N A を含む。いくつかの実施形態では、上述の G a l N A c - 脂質受容体標的化コンジュゲートの濃度 (m o l %) は、約 0 . 0 1 m o l % ~ 約 1 0 m o l % である。いくつかの実施形態では、上述の中性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C) である。いくつかの実施形態では、上述のステルス脂質は、ポリエチレングリコール-ジミリスチルグリセロール (P E G - D M G) である。いくつかの実施形態では、上述の第 2 の溶液中の上述のステルス脂質濃度は、0 m o l % ~ 約 5 m o l % である。いくつかの実施形態では、上述の核酸剤濃度は、約 0 . 1 ~ 約 5 m g / m L (例えば、約 0 . 1、0 . 2 5、0 . 5、0 . 7 5、1、1 . 5、2、2 . 5、3、4、又は 5 m g / m L) である。いくつかの実施形態では、上述の混合物は、約 1 分 ~ 約 2 4 時間インキュベートされる。いくつかの実施形態では、上述の混合物は、約 1 分 ~ 約 1 2 0 分間インキュベートされる。いくつかの実施形態では、上述の混合物は、約 1 時間インキュベートされる。いくつかの実施形態では、最終的な G a l N A c - L N P 溶液は、T r i s 緩衝液を含む。

20

30

【0417】

[0461]いくつかの実施形態では、最終的な G a l N A c - L N P 溶液は、凍結保護剤を更に含む。いくつかの実施形態では、上述の凍結保護剤は、スクロースである。いくつかの実施形態では、上述の最終溶液中の上述の凍結保護剤の濃度は、約 0 . 1 m M ~ 約 5 0 0 m M である。いくつかの実施形態では、上述の最終溶液中の上述の凍結保護剤の濃度は、約 1 5 0 m M ~ 約 5 0 0 m M である。いくつかの実施形態では、上述の最終溶液中の上述の凍結保護剤の濃度は、約 3 0 0 m M である。

【0418】

40

[0462]いくつかの実施形態では、G a l N A c - L N P は、約 - 8 0 摂氏 (°C) の温度で保存される。いくつかの実施形態では、最終的な G a l N A c - L N P 溶液は、凍結保護剤を更に含まない。いくつかの実施形態では、上述の G a l N A c - L N P は、約 2 °C ~ 約 8 °C で保存される。いくつかの実施形態では、上述の G a l N A c - L N P は、約 6 ~ 約 9 の p H を有する溶液中にある。いくつかの実施形態では、上述の G a l N A c - L N P は、約 7 ~ 8 (例えば、7 ~ 8、7 . 2 ~ 7 . 8、7 . 3 ~ 7 . 7、又は 7 . 4 ~ 7 . 6) の p H を有する溶液中にある。

【0419】

[0463]いくつかの実施形態では、本方法は、上述の第 2 の溶液中に、総体積の少なくとも 0 . 0 1 (例えば、少なくとも 0 . 0 1、0 . 0 5、0 . 1、又は 0 . 5) m o l %

50

の濃度で上述の受容体標的化コンジュゲートを導入することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、上述の第2の溶液中に、総体積の少なくとも1mol%の濃度で上述の受容体標的化コンジュゲートを導入することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、上述の第2の溶液中に、総体積の少なくとも3mol%の濃度で上述の受容体標的化コンジュゲートを導入することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、上述の第2の溶液中に、総体積の少なくとも5mol%の濃度で上述の受容体標的化コンジュゲートを導入することを更に含む。

【0420】

【0464】いくつかの実施形態では、本方法は、上述の第2の溶液中に、総体積の少なくとも7mol%の濃度で上述の受容体標的化コンジュゲートを導入することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、上述の第2の溶液中に、総体積の少なくとも9mol%の濃度で上述の受容体標的化コンジュゲートを導入することを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、上述の第2の溶液中に、総体積の少なくとも10mol%の濃度で上述の受容体標的化コンジュゲートを導入することを更に含む。

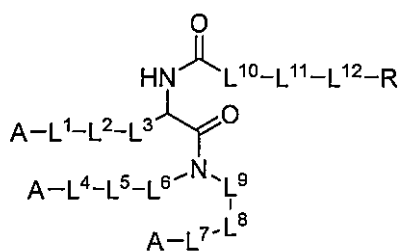
【0421】

【0465】別の態様では、本明細書に記載される方法によって調製することができるGalNAc-LNPが本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、上述のLNPにわたるGalNAc-脂質の分布は、実質的に均一である。いくつかの実施形態では、GalNAc-脂質は、約0.01~0.5mol%の濃度でGalNAc-LNP中に存在する。

【0422】

【0466】別の態様では、式(II)の化合物を含む受容体標的化コンジュゲートを含むGalNAc-LNPが本明細書に記載される：

【化14】



式(II)

式中、Aは、受容体標的化部分であり；

各L¹、L²、L³、L⁴、L⁵、L⁶、L⁷、L⁸、L⁹、L¹⁰、及びL¹²は、独立して、置換若しくは非置換のC₁~C₁₂アルキレン、置換若しくは非置換のC₁~C₁₂ヘテロアルキレン、置換若しくは非置換のC₂~C₁₂アルケニレン、置換若しくは非置換のC₂~C₁₂アルキニレン、-(CH₂CH₂O)_m-、-(OCH₂CH₂)_m-、-O-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、-S(=O)(=NR¹)-、-C(=O)-、-C(=N-OR¹)-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-C(=O)C(=O)-、-C(=O)N(R¹)-、-N(R¹)C(=O)-、-OC(=O)N(R¹)-、-N(R¹)C(=O)O-、-N(R¹)C(=O)N(R¹)-、-C(=O)N(R¹)C(=O)-、-S(=O)₂N(R¹)-、-N(R¹)S(=O)₂-、-N(R¹)-、-N(OR¹)-、-O[(P=O)O-]O-、-O[(P=O)S-]O-、-(CH₂)_p-O-、-O-(CH₂)_p-O-、-O-(CH₂)_p-、-S-S-、又は結合であり；

L¹¹は、-(CH₂CH₂O)_n-、-(OCH₂CH₂)_n-、又は結合であり；

各R¹は、独立して、H、又は置換若しくは非置換のC₁~C₆アルキルであり；

Rは、親油性有機残基であり；

mは、1~10から選択される整数であり；

nは、1~200から選択される整数であり；そして

10

20

30

40

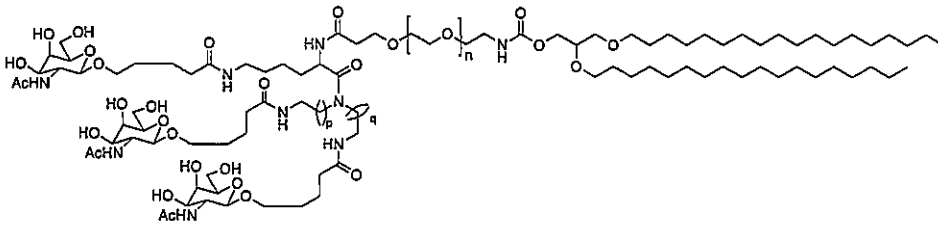
50

p は、1～200から選択される整数である。

【0423】

【0476】いくつかの実施形態では、受容体標的化コンジュゲートは、以下から選択される：

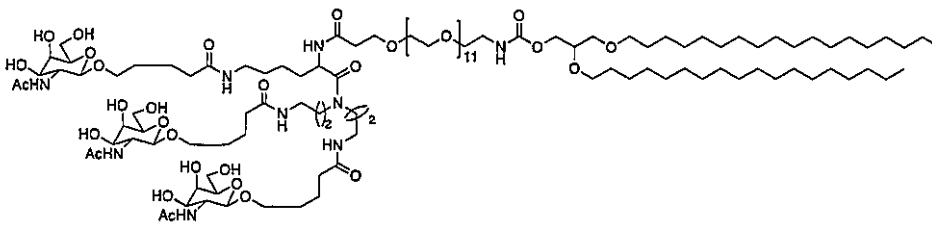
【化15】



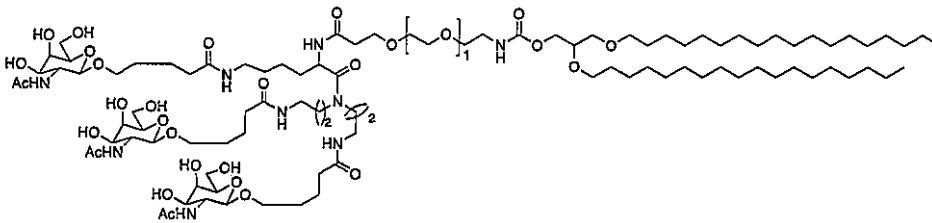
1001

式中、p及びqの各々が、独立して、1～5の整数であり、nは、1～50の整数である；

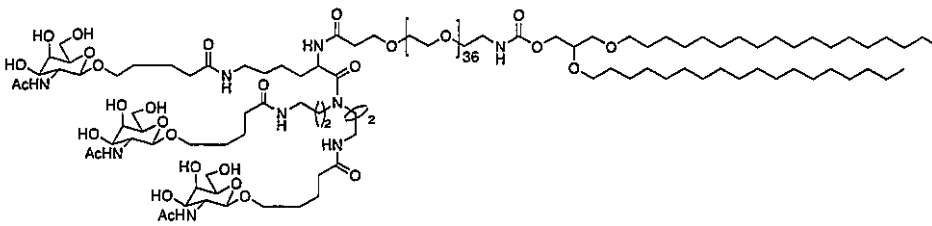
【化16】



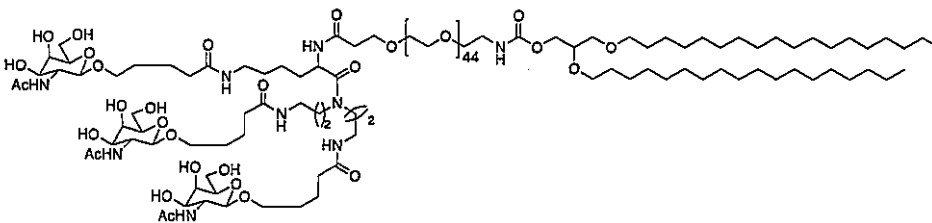
1002、



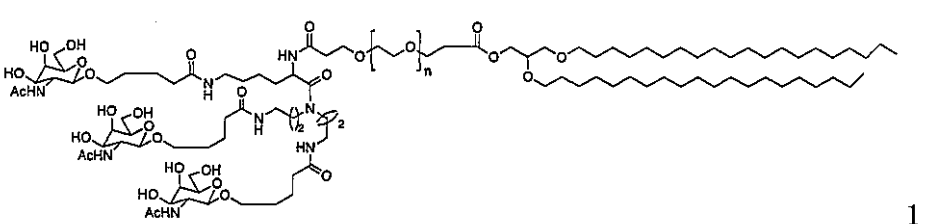
1003、



1004、



1005、



1006

式中、nは、1～50の整数である；

10

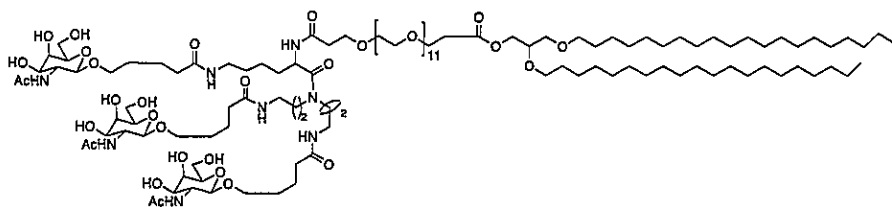
20

30

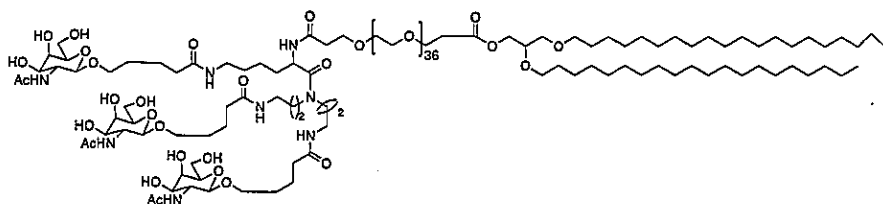
40

50

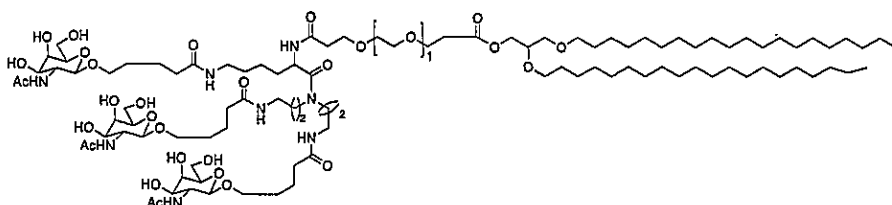
【化 1 7】



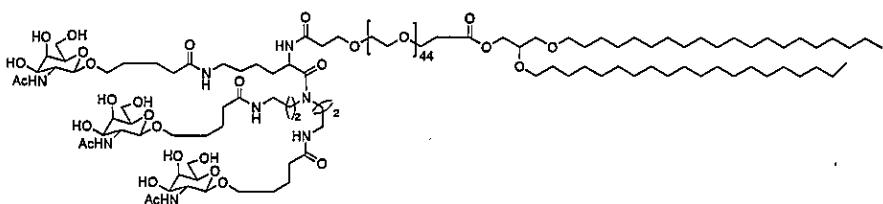
1007、



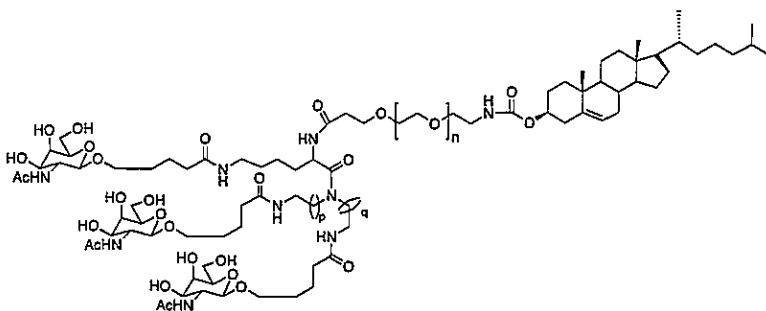
1008、



1009、



1010、



1011

式中、 p 及び q の各々が、独立して、1～5の整数であり、 n は、1～50の整数である；

10

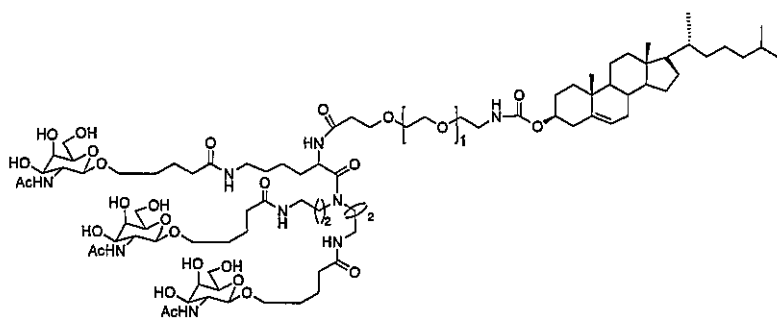
20

30

40

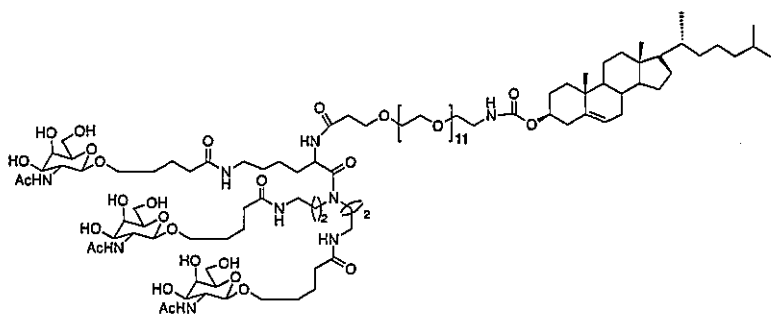
50

【化 1 8】



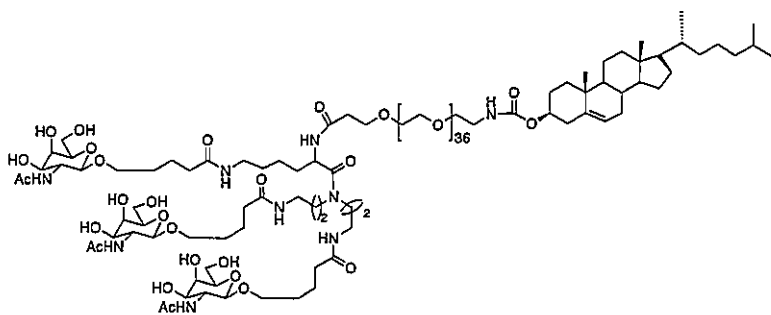
1012、

10



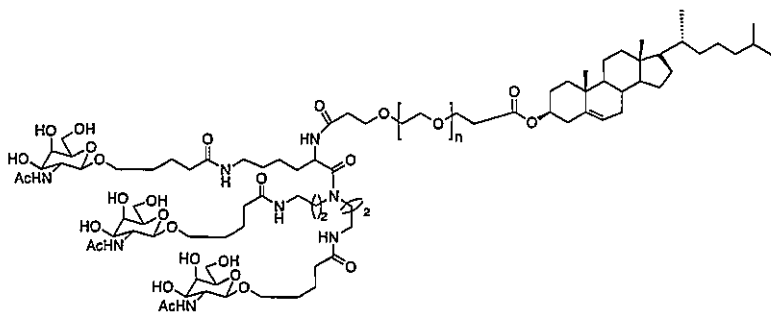
1013、

20



1014、

30



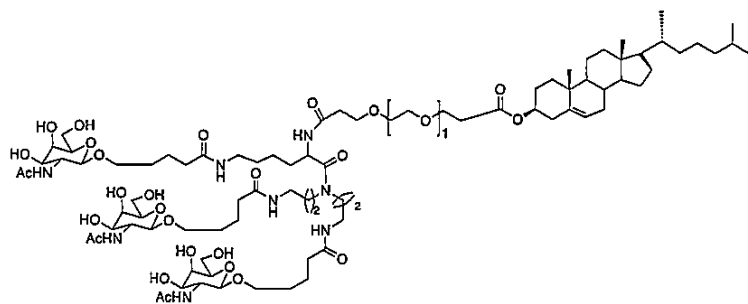
1015

式中、 n は、1～50の整数である；

40

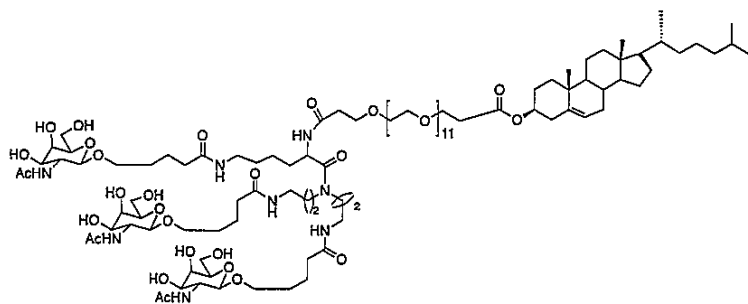
50

【化 1 9】



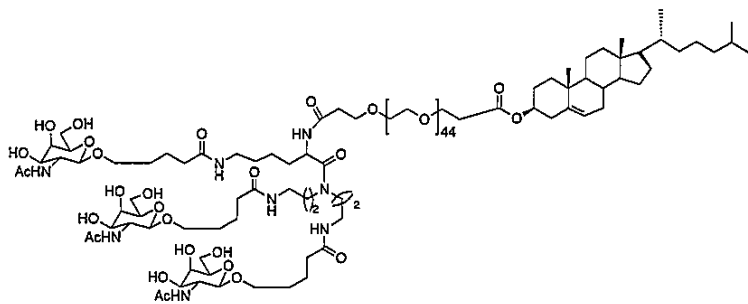
1 0 1 6、

10



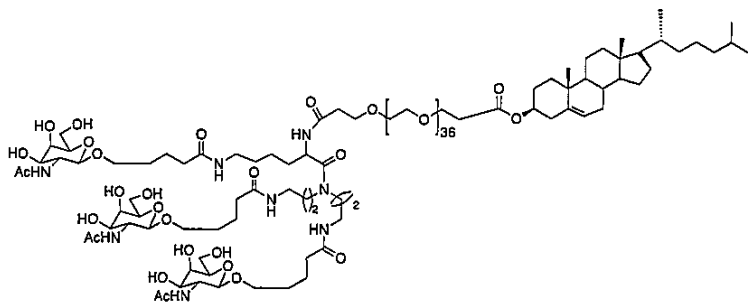
1 0 1 7、

20



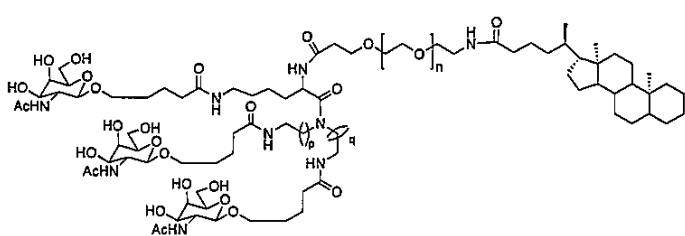
1 0 1 8、

30



1 0 1 9、

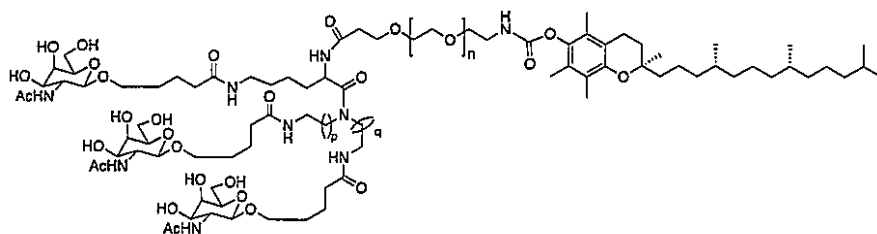
40



1 0 6 0、

式中、 p 及び q の各々が、独立して、 $1 \sim 5$ の整数であり、 n は、 $1 \sim 50$ の整数である；

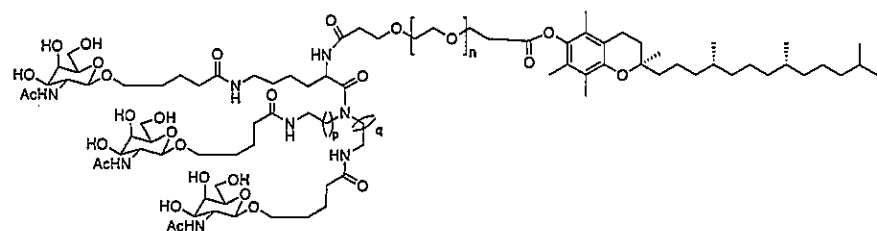
【化 2 0】



1 0 6 5

式中、 p 及び q の各々が、独立して、1～5の整数であり、 n は、1～50の整数である；

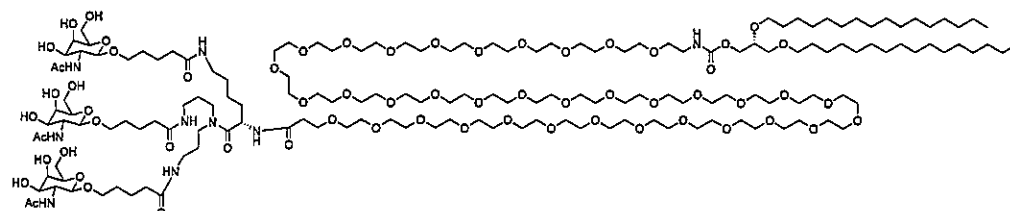
【化 2 1】



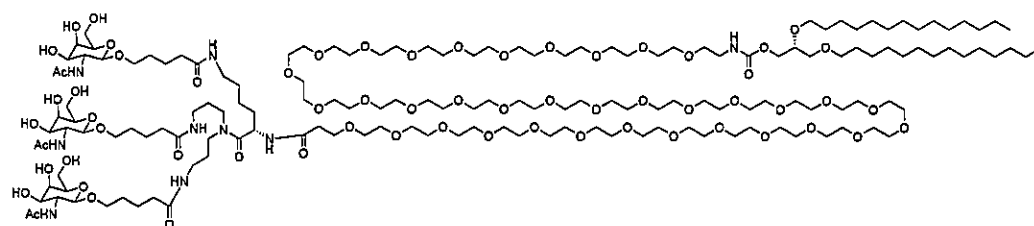
1 0 6 6

式中、 p 及び q の各々が、独立して、1～5の整数であり、 n は、1～50の整数である；

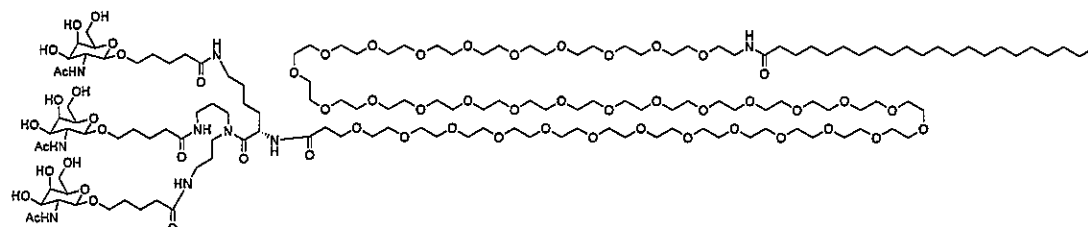
【化 2 2 - 1】



1 0 7 5、

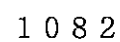
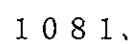
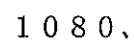
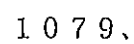
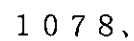


1 0 7 6、



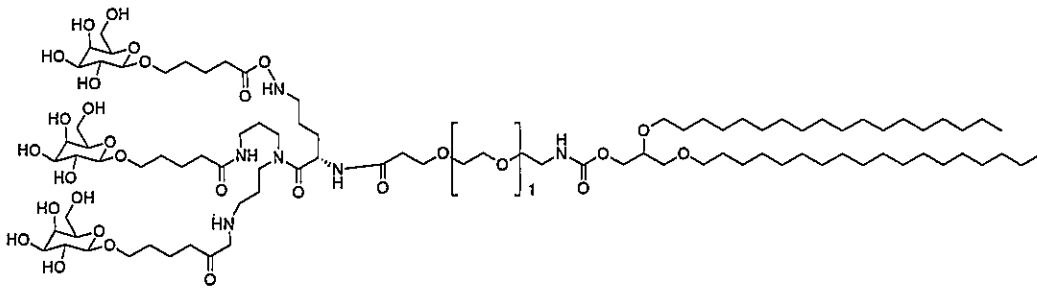
1 0 7 7、

10



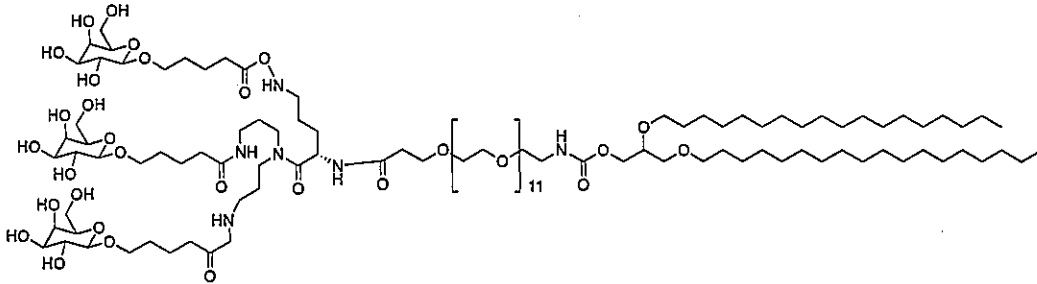
(式中、n は、1～50の整数である)、

【化 2 3】



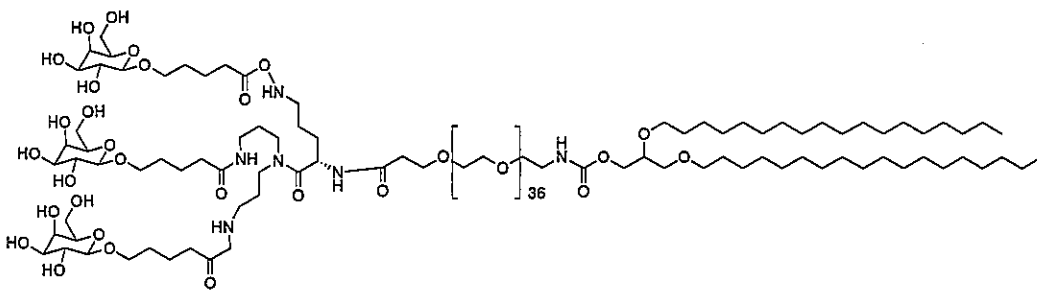
1083、

10



1084、及び

20

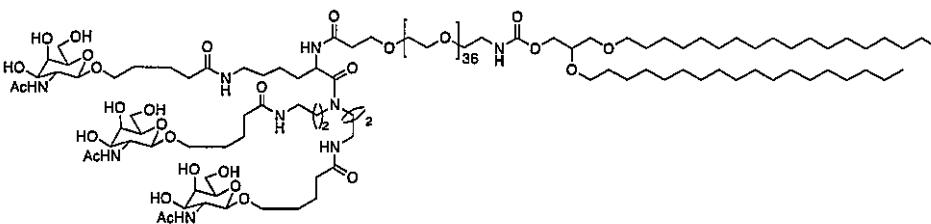


1085。

【0424】

【0484】いくつかの実施形態では、受容体標的化コンジュゲートコンジュゲートは、以下である。

【化 2 4】



1004。

30

【0425】

【0485】別の態様では、GalNAc-LNPを含む薬学的組成物であって、GalNAc-LNPが、

40

(i) 1つ以上の核酸活性剤と、

(ii) ステロール又はその誘導体、リン脂質、ステルス脂質、及びアミノ脂質から選択される1つ以上の脂質賦形剤と、

(iii) GalNAc-脂質受容体標的化コンジュゲートと、を含み、

GalNAc-LNPが、表11から選択される賦形剤mol%比を含む、薬学的組成物が本明細書に記載される。

【0426】

【0486】リン酸基を含有しないペイロードの場合、N/P比は、ペイロード中の全負電荷に対する脂質中のイオン化可能な窒素原子のモル比を指すことができる。例えば、LNP組成物のN/P比は、LNP組成物中に存在するペイロード中の全負電荷に対するLNP組成物中の全イオン化可能な窒素原子のモル比を指すことができる。

50

【0427】

[0487]本明細書で使用される場合、アミノ脂質は、pH範囲4～14の間でプロトン化可能（又はイオン化可能）である、少なくとも1つの一級、二級、又は三級アミン部分を含有し得る。いくつかの実施形態では、アミン部分／複数のアミン部分は、アミノ脂質の親水性頭部基として機能する。核酸－脂質ナノ粒子製剤中のアミノ脂質（又は複数のアミノ脂質）のアミン部分（複数可）の大部分が生理学的pHでプロトン化されるとき、ナノ粒子はカチオン性脂質ナノ粒子（cLNPs）と称され得る。核酸－脂質ナノ粒子製剤中のアミノ脂質（又は複数のアミノ脂質）のアミン部分（複数可）の大部分が生理学的pHでプロトン化されないが、酸性pHでプロトン化され得る場合、例えば、エンドソームpHは、イオン化可能脂質ナノ粒子（iLNPs）と称され得る。cLNPsを構成するアミノ脂質は、一般に、カチオン性アミノ脂質（cLipid）と称され得る。iLNPsを構成するアミノ脂質は、イオン化可能なアミノ脂質（iLipid）と称され得る。アミノ脂質は、生理学的pHにおいてiLipid又はcLipidであり得る。

10

【0428】

治療方法

[0488]本開示は、アテローム動脈硬化性心血管疾患を治療又は予防することを必要とする対象においてそれを行うための方法であって、本方法が、対象に、治療有効量の本明細書に開示されるガイド核酸、遺伝子編集系、又は薬学的組成物を投与することを含む、方法を更に提供する。上述の必要とする対象は、ANGPTL3遺伝子における遺伝子編集を必要とする対象であり得る。本明細書に開示される遺伝子編集系は、高いオンターゲット効率を有するが低いオフターゲット効果を有する対象において、ANGPTL3遺伝子における編集を達成することができる。ガイド核酸は、遺伝子エディタータンパク質を、対象におけるANGPTL3遺伝子の核酸変化に影響を及ぼすように指示することができる。開示された遺伝子編集系によって達成される遺伝子編集又は塩基変化は、次世代配列決定又はサンガー配列決定によって測定される場合、対象における全肝臓細胞の少なくとも35%において生じ、それによって対象における状態を治療又は予防することができる。

20

【0429】

[0489]本明細書に開示される方法は、対象のANGPTL3遺伝子において少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、又は少なくとも約90%のオンターゲット編集を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象のANGPTL3遺伝子において少なくとも40%のオンターゲット編集を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象のANGPTL3遺伝子において少なくとも約45%のオンターゲット編集を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象のANGPTL3遺伝子において少なくとも約50%のオンターゲット編集を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象のANGPTL3遺伝子において少なくとも約55%のオンターゲット編集を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象のANGPTL3遺伝子において少なくとも約60%のオンターゲット編集を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象のANGPTL3遺伝子において少なくとも約65%のオンターゲット編集を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象のANGPTL3遺伝子において約50%のオンターゲット編集を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象のANGPTL3遺伝子において約55%のオンターゲット編集を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象のANGPTL3遺伝子において約60%のオンターゲット編集を達成することができる。

30

40

【0430】

[0490]本明細書に開示される方法は、対象の血漿ANGPTL3タンパク質の少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%の減少を達成することがで

50

きる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿 A N G P T L 3 タンパク質の少なくとも約 70 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿 A N G P T L 3 タンパク質の少なくとも約 80 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿 A N G P T L 3 タンパク質の少なくとも約 90 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿 A N G P T L 3 タンパク質の少なくとも約 95 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿 A N G P T L 3 タンパク質の少なくとも約 96 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿 A N G P T L 3 タンパク質の少なくとも約 97 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿 A N G P T L 3 タンパク質の少なくとも約 98 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿 A N G P T L 3 タンパク質の少なくとも約 99 % の減少を達成することができる。

10

【0431】

【0491】本明細書に開示される方法は、対象の H D L - C の少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、又は少なくとも約 80 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の H D L - C の少なくとも約 20 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の H D L - C の少なくとも約 30 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の H D L - C の少なくとも約 40 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の H D L - C の少なくとも約 50 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の H D L - C の少なくとも約 60 % の減少を達成することができる。

20

【0432】

【0492】本明細書に開示される方法は、対象の血漿トリグリセリドの少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、又は少なくとも約 70 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿トリグリセリドの少なくとも約 10 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿トリグリセリドの少なくとも約 20 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿トリグリセリドの少なくとも約 30 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿トリグリセリドの少なくとも約 40 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿トリグリセリドの少なくとも約 50 % の減少を達成することができる。本明細書に開示される方法は、対象の血漿トリグリセリドの少なくとも約 60 % の減少を達成することができる。

30

【0433】

【0493】本明細書に開示される方法は、深刻な安全性及び／又は毒性の懸念なく、対象における A N G P T L 3 遺伝子におけるオンターゲット編集、血漿 A N G P T L 3 タンパク質の減少、H D L - C レベルの減少、及び／又は血漿トリグリセリドの減少を効果的に達成することができる。

【実施例】

40

【0434】

【0494】以下の実施例は、本発明者らが本発明の様々な態様とみなすものの範囲を限定することを意図するものではない。

【0435】

【0495】一般に、本明細書に提示されるデータに関して、様々な g R N A : m R N A 比が採用され得るが、それとは反対に明示的に指定されない限り、本明細書に記載及び提示される試験及びデータに記載される遺伝子編集系は、重量で 1 : 1 の m R N A に対する g R N A の比を採用することが理解されるべきである。同様に、様々な投薬方法が採用され得るが、それとは反対に明示的に指定されない限り、本明細書に記載され、提示される試験及びデータにおいて m g / k g によって指定される投薬は、L N P に含有され、かつ対

50

象に静脈内投薬される投薬対象の体重 1 k g 当たりの総 g R N A 及び m R N A を合わせた m g 数を指す。

【0436】

実施例 1. 様々な用量の P C S K 9 塩基エディターでの非ヒト初代肝臓細胞に対するヒト初代肝臓細胞の P C S K 9 編集割合を比較するインビトロ効力試験

【0496】図 1 は、本明細書に記載の L N P 塩基エディター製剤の実施形態を使用して、初代非ヒト霊長類肝細胞（例えば、初代カニクイザル肝細胞（P C H））と比較した、初代ヒト肝細胞（P H H）における P C S K 9 遺伝子の編集率を示すデータを表す。垂直軸は、P C S K 9 遺伝子編集標的部位における A から G への編集を定量化するために、次世代配列決定（N G S）を使用して測定された P C S K 9 遺伝子の編集率を表す。水平軸は、細胞が曝露された g R N A G A 3 4 6 の濃度の l o g をプロットする。P H H 及び P C H 細胞に投与された L N P には、1 : 1 の m R N A : g R N A 重量比で m R N A M A 0 0 4 及びガイド R N A G A 3 4 6 のペイロードが含まれており、複数のロットの初代ヒト肝細胞及び初代非ヒト霊長類肝細胞に対して異なる濃度で滴定した。初代ヒト肝細胞に対して滴定された濃度は、3 . 0 2 5 n M から 3 . 4 6 9 n M の g R N A へと拡張された。初代非ヒト肝細胞に対して滴定された濃度は、9 . 0 3 5 n M から 1 1 . 6 8 n M の g R N A へと拡張された。各群の細胞について、P C S K 9 遺伝子の編集率を、各 g R N A 濃度で分析し、図 1 に示されるグラフ上にプロットした。図 1 に示されるように、相対的な効力は、製剤が、非ヒト霊長類肝臓細胞よりもヒト初代肝臓細胞において顕著に高い効力を有することを示し、このことは、製剤が、ヒトに投与されたときに、本明細書に記載される N H P 試験で使用されるものよりも有意に低い臨床用量を使用しつつ、本明細書に記載される N H P 試験で見られるものと同等以上のヒト肝臓細胞において P C S K 9 編集をもたすことが可能である可能性を裏付けている。

10

20

【0437】

実施例 2. A B E m R N A M A 0 0 4 及びガイド R N A G A 3 4 6 のペイロードとともに製剤化された P C S K 9 L N P を静脈内投与したインビボ長期間非ヒト霊長類試験

【0497】図 2 ～図 7 に示されるのは、試験プロトコル（図 2）、並びに注入後 1 5 日目の全肝臓 D N A 編集及び注入後 1 4 日目の P C S K 9 タンパク質減少を評価する肝生検によるベースラインからの P C S K 9 編集変化率（図 3）、延長された注入後の期間にわたる P C S K 9 タンパク質減少（図 4）、延長された注入後の期間にわたる L D L - C 減少（図 5）、延長された注入後の期間にわたる A L T 酵素レベル（図 6）、及び延長された注入後の期間にわたる空腹時グルコースレベル（図 7）を示す、試験から生成されたデータである。

30

【0438】

【0498】図 2 に示されるように、試験は、単回用量の 0 . 7 5 m g / k g を静脈内注入された 4 匹の N H P の第 1 の群、単回用量の 1 . 5 m g / k g を静脈内注入された 2 2 匹の N H P の第 2 の群、並びに g R N A 及び m R N A 薬物基質ペイロードを含まない単回用量の同じ L N P 送達ビヒクルを静脈内注入された 1 0 匹の N H P の第 3 の群（「ビヒクル対照」）を含んでいた。0 . 7 5 m g / k g 及び 1 . 5 m g / k g 用量は、全 R N A 薬物基質ペイロード（すなわち、m R N A 及び g R N A の併せた重量）を使用して計算され、脂質ナノ粒子送達ビヒクルの重量を含まない。したがって、例えば、0 . 7 5 m g / k g の用量は、投与される N H P の各キログラム重量に対して N H P に静脈内注入される 0 . 7 5 m g の組み合わせられた m R N A 及び g R N A 重量に相当する。N H P の各群は、以前に本明細書に記載された同じ L N P 送達ビヒクルを使用して、単回の静脈内注入を介して投与された。第 1 群及び第 2 群について、製剤化された L N P には、1 : 1 の m R N A : g R N A 重量比で m R N A M A 0 0 4 及びガイド R N A G A 3 4 6 のペイロードが含まれていた。ビヒクル対照の第 3 群について、1 0 匹の N H P に、投与された L N P が薬物基質を含有しなかった（m R N A も g R N A も含有しなかった）ことを除き、第 1 群及び第 2 群と同じ L N P を投与した。各 N H P 群からの血清試料を、投与直前及び図 2 ～図

40

50

7に示される間隔で収集し、(1)血液PCSK9レベル、(2)血液LDL-Cレベルを含む主要エンドポイント、並びに(1)肝機能検査、(2)グルコースホメオスタシス、及び(3)アデニンデアミナーゼ(ADA)レベルを含む安全性エンドポイントについて分析し、これらをサイトカイン活性の指標として使用する。肝生検を介して、肝臓組織試料を定期的な間隔でNHPの各群から収集し、全肝臓PCSK9 DNA編集を含む主要エンドポイントについて分析した。

【0439】

[0499]図3は、注入後14日目のベースラインと比較した血液中のPCSK9減少率のウォーターフォールプロットである。プロットの左側は、10匹のビヒクル対照群のNHPを示し、プロットの右側は、1.5mg/kgの薬物基質を投与された22匹のNHPを示す。プロット上の各棒グラフは、個々のNHPを表す。プロットに示されるように、群中の22匹のNHPの平均PCSK9減少は、注入後14日目でおおよそ87%であった。PCSK9減少における高レベルの一貫性は、PCSK9血液レベルが投与前のベースラインを上回って、また、下回って散在する10匹のビヒクル治療されたNHPと比較して、22匹の投与された全ての動物にわたってプロットに示される。

10

【0440】

[0500]図4は、(注入後から測定された)長期間にわたる3群のNHPにおける血液PCSK9レベルの変化を、ベースライン(グラフ上で0として示される)からの割合変化として表すグラフである。血液PCSK9レベルを、図4のグラフに示される間隔で、NHPから収集された血清から分析した。図4に示されるように、示される2つの用量レベル(0.75mg/kg及び1.5mg/kg)での一貫した持続的な用量応答が観察され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT出願公開第WO2021/207712号に記載される3mg/kg用量のNHP試験に記載される試験に対する更なる確認を提供する。

20

【0441】

[0501]図5は、図4と同じ間隔で、かつ注入後の同じ延長された期間にわたって、投与前のベースラインからの変化割合としての血液LDL-Cの変化を示すグラフである。図5に示されるように、血液LDL-Cは、第2群の22匹のNHPにおいて、より高用量の1.5mg/kgで60%より大きく低下し、第1群の4匹のNHPにおいて、より低用量の0.75mg/kgで40%より大きく低下する。10匹のNHPのビヒクル対照の第3群は、ほぼ注入後のベースラインを維持していた。特に、第1群及び第2群におけるLDL-Cの減少は、試験期間にわたって持続する耐久性のあるものであることが観察され、それによって、単回用量の本明細書に記載の薬物基質が、ASCVDを引き起こすことが既知である血液脂質(LDL-C)への障害にわたる曝露を持続的に低下させることができることを更に裏付けており、それによって、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT出願公開第WO2021/207712号に記載される研究に関連して記載されるものの更なる確認を提供する。

30

【0442】

[0502]図6は、図4～図5と同様の同じ間隔及び注入後の同じ延長された期間にわたる投与前ベースラインと比較した、試験における3つの群のNHPのアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)レベルを示すグラフである。ALTは、肝臓の炎症又は損傷を測定するためのマーカーとして一般的に使用される肝臓酵素であり、本明細書では、本明細書に記載の投与された薬物製品及び基質の安全性の尺度として提示される。図6に示されるように、ALTレベルは、投与前のベースラインに対して測定される場合、投与直後に上昇し、その後、注入後約14日目までにベースラインレベルまで分解され、延長された試験期間の残りの間、投与前のベースラインレベルに維持され、このことは、PCSK9遺伝子の塩基編集後に肝臓酵素に対する長期的効果は観察されないという、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT出願公開第WO2021/207712号に関連して記載される研究の更なる確認を提供する。

40

【0443】

50

【0503】図7は、これも図4～図6と同様の同じ間隔及び注入後の同じ延長された期間にわたって行われた試験における3つの群のNHPの空腹時グルコースレベルを示すグラフである。グルコースホメオスタシスを、グルコースバイオアッセイによって評価した。PCSK9を標的とする以前の療法は、グルコースホメオスタシスへの影響を示さなかったが、それらの以前の療法と本出願の主題であるbae編集療法モダリティとの間の相違を考慮して、この分析は、全身PCSK9阻害によるグルコースホメオスタシスへの影響の理論的リスクを肯定的に除外するために行われた。図7に示されるように、グルコースホメオスタシスは、投与されたNHPのPCSK9遺伝子の塩基編集後に攪乱されなかった。更に、図7には示されていないが、試験NHPの別個のサンプリングを、数日間の自由摂食中に実施し、食後のグルコースレベルへの影響は観察されなかった。

10

【0444】

実施例3. 再生された肝細胞におけるPCSK9塩基エディターの耐久性を評価するための部分肝切除マウスモデル

【0504】図8～10に示されるのは、マウス試験プロトコル（図8）、及び再生されたPCSK9編集肝臓細胞における肝臓編集の耐久性を示す試験から生成されたデータ（図9～図10）である。図8～図10に示されるように、4つの群のマウスに、本明細書に記載され、実施例2に関連して同じLNP送達ビヒクルの単回静脈内注入を行った。第1群のマウスに、 0.5 mg/kg 、すなわち、マウスの体重1キログラム当たり 0.5 mg の薬物基質RNA（mRNA及びガイドRNA）を1：1のmRNA：ガイドRNA重量比で）を静脈内注入によって投与し、第1群のマウスにおいて注入後11日目に部分肝切除を行い、その手術から得られた肝臓の切除された葉を収集し、PCSK9編集のために分析した。第2の群のマウスに、第1の群と同じ 0.5 mg/kg を静脈内注入によって投与し、この第2の群において、マウスの注入後11日目に偽の部分肝切除手術を行った。第3の群のマウスに、同じLNPビヒクルからmRNA MA004及びRNA GA257ペイロードを引いたものを投与し、この第3の群において、マウスの注入後11日目に部分肝切除手術を行った。第3の群のマウスに、同じLNPビヒクルからmRNA MA004及びRNA GA257ペイロードを引いたものを投与し、この第4の群において、マウスの注入後11日目に偽の部分肝切除手術を行った。投与前、注入後7日目、及び図10で特定された間隔で血清を収集し、これを使用して血液PCSK9タンパク質を測定した。注入後22日目に、マウスの各群の一部を安楽死させ、それらのマウスの肝臓組織を、PCSK9編集について分析した。注入後95日目に、試験中の残りのマウスを安楽死させ、それらのマウスの肝臓組織を、PCSK9編集について分析した。

20

30

【0445】

【0505】図8の右下のグラフは、試験の対象であるマウスにおける部分肝切除後の肝臓／脳比の時間依存性変動を示す。そこに示されるように、マウスにおける肝臓／脳のほぼ正常な比は、部分肝切除後のおよそ9日目に再確立されることを見出した。

【0446】

【0506】第1群のマウスは、図10において、「 0.5 mg/kg ＋部分肝切除術」と称される。第2群のマウスは、図10において、「 0.5 mg/kg ＋偽」と称される。第3群のマウスは、図10において、「ビヒクル＋部分肝切除術」と称される。第4群のマウスは、図10において、「ビヒクル＋偽」と称される。図1に示されるように、収集された血清試料から測定された血液PCSK9の減少は、部分肝切除後の複数の肝再生サイクルの後であっても、第1群及び第2群のマウスの部分肝切除後に維持された。

40

【0447】

【0507】図9に示されるのは、部分肝切除を受けた投薬マウスの切除された葉から採取された肝臓試料から、注入後22日目及び95日目の剖検時にNGS（以前に記載したように）によって評価されたPCSK9編集データである。図9の左のグラフに示されるように、 0.5 mg/kg を投与された偽手術の第2の群のマウスは、注入後22日目及び95日目に安楽死させたマウスの両方において、ほぼ60%のPCSK9編集割合を維持していた。図9の右側のグラフに示されるように、 0.5 mg/kg を投与され、11日

50

目に部分肝切除を受けた第1群のマウスも、ほぼ60%以上のPCSK9編集割合を維持し、そのPCSK9編集割合は、注入後11日目の部分肝切除手術からそれらのマウスから保持された切除された葉から評価されたPCSK9編集割合と同等であった。したがって、この試験は、本明細書に記載の投与された薬物製剤を使用したPCSK9の塩基編集が、治療された対象の再生された肝臓葉において持続することを確認する。

【0448】

実施例4. 性的に成熟した雄NHPにおける精子編集の証拠がないことの確認

[0508]図11に示されるのは、性的に成熟した雄NHPの精子におけるPCSK9編集のレベルを評価するNHP試験からのデータである。この試験では、6匹の性的に成熟した雄NHPに、実施例2の第2の群の22匹のNHPに使用された1.5mg/kgの同じ単回用量を静脈内注入した。7番目の性的に成熟した雄ビヒクル対照サルに、実施例2の第3の群（「ビヒクル対照」）の10匹のNHPに使用したgRNA GA346及びmRNA MA004薬物基質ペイロードビヒクルを含まない同じLNP送達ビヒクルを静脈内投与した。精子試料を、投与前、及び精子形成の1回の完全な周期よりも長い治療後11週目に収集した。編集レベルの定量化は、高い感度を有するように最適化された高感度標的化された標的化アンプリコンアッセイを使用して行った。図11に示されるように、対象NHPの精子試料中で定量化された編集レベルは、対照動物と治療動物との間で類似していたため、生殖細胞系精子の編集の証拠は観察されなかった。

【0449】

実施例5. オフターゲット評価

[0509]図12～図15には、本明細書に記載のPCSK9塩基エディター製剤の潜在的なオフターゲット候補部位を評価することから生成される試験プロトコル及びデータが示されている。図12は、本明細書に記載のPCSK9塩基エディター製剤による実際のオフターゲット編集の存在を評価するために使用される実験方法を示す概略図である。左側には、複数の技術を使用して、潜在的な候補オフターゲット部位を特定するための発見方法の説明がある。そこに示されるように、発見アッセイは、One-Seqアッセイ（参考：<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.04.05.438458v1>）及びABE-ジゲノムアッセイを含む。One-Seqでは、相同性に基づく潜在的なオフターゲット活性の部位に対応する数万のdsDNA分子の合成ライブラリーを、高用量の塩基エディタータンパク質での切断について、インビトロで評価する。ABE-ジゲノム-seqでは、初代肝臓細胞からのゲノムDNAを抽出し、ABEタンパク質によってインビトロで消化し、潜在的な塩基改変の部位を、ゲノムワイド次世代配列決定分析によって決定する。これらのアッセイは両方とも、オフターゲット活性を介して切断され得る部位をもたらす。潜在的な偽陰性を更に防ぐために、バイオインフォマティクス評価を、One-Seq又はABE-ジゲノム発見アッセイのいずれかで特定されなかった高度な相同性を有する部分について行い、これらの部位は、後のパネルベースの検証アッセイにも含まれる。

【0450】

[0510]これらの発見方法を使用して潜在的なオフターゲット部位を特定すると（数百から数千の数であり得る）、高感度ハイブリッドキャプチャアッセイを使用して、実際のオフターゲット編集の存在についての評価を行った。この評価は、複数のドナー由来の複数の初代細胞において行われ、本明細書に記載のPCSK9塩基エディター製剤による全身治療の後に曝露され得る複数の組織を表す。これらの組織には、肝臓、脾臓、副腎細胞、及び高度に増殖する細胞の代表である造血幹細胞が含まれる。

【0451】

[0511]上記を使用して、潜在的なオフターゲット活性パネルを調製し、ハイブリッドキャプチャ方法を使用して、オフターゲット活性について数百～数千の部位をアッセイした。パネルに対応する部位を、RNAプローブを使用したキャプチャによって濃縮した。次いで、濃縮されたDNAを処理して、全てのパネル部位にわたる塩基改変の配列決定及び定量化を行う。

【0452】

[0512]図13に示されるように、この方法論によって使用されるアッセイは、パネルメンバーの99%より多くが0.1%未満の非参照配列（代替対立遺伝子と称される）を有するきわめて低いバックグラウンドを有する、高感度ハイブリッドキャプチャオフターゲット検証アッセイをもたらす。本明細書でオフターゲット活性を検出するために最適化されたこのハイブリッドキャプチャアッセイの純度のよい感度は、高レベルの感度を有する潜在的なオフターゲット候補部位のプロファイリング及び検出を可能にし、数千の部位に対応するようにスケーリングすることができる。

【0453】

[0513]図14～図15は、複数の細胞における上位244個の候補オフターゲット部位についての標的塩基の周囲の10塩基ウィンドウのための塩基位置にわたる編集レベルの定量化を示す、上述の方法から生成されたジッタープロットである。図14に示されるジッタープロットは、単一のPHHロットにわたる初代ヒト肝細胞に対する評価を表す。未治療のヒト肝臓と比較して、mRNA MA004及びガイドRNA GA346のペイロードを含むLNP製剤により治療されたヒト肝臓細胞の比較によって示されるように、上位244個の候補部位のいずれかの中で、初代肝細胞において検出可能なオフターゲット編集は存在しない。同様に、図15に示されるジッタープロットは、単一ロットの初代脾臓内皮細胞にわたる初代ヒト脾臓細胞に対する評価を表す。未治療のヒト脾臓細胞と比較して、mRNA MA004及びガイドRNA GA346でトランスフェクトされた（又は治療された）初代ヒト脾臓細胞との比較によって示されるように、上位244個の候補部位のいずれかの中で、初代ヒト脾臓細胞において観察された検出可能なオフターゲット編集は存在しない。

【0454】

実施例6. PCSK9の編集の生体内分布

[0514]図16は、ABE mRNA MA004及びガイドRNA GA346で構築されたLNPを投与されたNHPの生体内分布試験からのデータを表す。単回の1mg/kg用量（1:1のmRNA:gRNA重量比）を3つのNHPに静脈内注入によって投与し、2つの対照NHPにダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を同じ日に投与した。全てのNHP（投薬及び対照）を、注入後15日目に安楽死させ、安楽死させたNHPの組織試料を収集し、PCSK9編集について分析した。

【0455】

[0515]各組織試料中のPCSK9遺伝子のアデニン編集率をNGSを使用して評価し、平均アデニン編集割合を図16の棒グラフに示す。PCSK9編集は、主に肝臓に分布していた。

【0456】

実施例7. ABEバリエーション

[0516]表1及び2において指定されるものを含む、例示的な改変ABE mRNAバリエーション及び配列が本明細書に記載される。ANGPTL3を標的とするガイドRNAと組み合わせた例示的な改変ABEバリエーションのオンターゲット編集効率を図19及び図20A～図20Eに示す。ANGPTL3を標的とするガイドRNAと組み合わせた、例示的な改変ABEバリエーションのオフターゲット部位候補B2及びB6の編集を図26及び図27に示す。編集実験を、前の実施例に記載したように同様に行った。

【0457】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表1. MA040、MA041、MA045 MA064 MA065、MA066、及び
MA067の間の配列の差の概要

ID	SpCas9 ニッカーゼ領域に おけるアミノ酸変異	MA004 に対するアデニン塩基エディターコード領 域のコドンの差 (太字及び下線付き)
MA040	SpCas9 ニッカーゼ位置: D1135E ABE8.8 位置: D1333E	SpCas9 ニッカーゼ位置: コドン 1135 が GAC から GAG に変更される ABE8.8 位置: コドン 1333 が GAC から GAG に変更される
MA041	SpCas9 ニッカーゼ位置: R691A, D1135E ABE8.8 位置: R889A, D1333E	SpCas9 ニッカーゼ位置: コドン 691 が CGG から GCC に変更される コドン 1135 が GAC から GAG に変更される ABE8.8 位置: コドン 889 が CGG から GCC に変更される コドン 1333 が GAC から GAG に変更される
MA045	SpCas9 ニッカーゼ位置: R691A ABE8.8 位置: R889A	SpCas9 ニッカーゼ位置: コドン 691 が CGG から GCC に変更される ABE8.8 位置: コドン 889 が CGG から GCC に変更される
MA064 Hypa	SpCas9 ニッカーゼ位置: N692A、M694A、 Q695A、H698A ABE8.8 位置: N890A、M892A、 Q893A、H896A	SpCas9 ニッカーゼ位置: コドン 692 が AAC から GCC に変更される コドン 694 が AUG から GCC に変更される コドン 695 が CAG から GCC に変更される コドン 698 が CAC から GCC に変更される ABE8.8 位置: コドン 890 が AAC から GCC に変更される コドン 892 が AUG から GCC に変更される コドン 893 が CAG から GCC に変更される コドン 896 が CAC から GCC に変更される

【0458】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

MA065	SpCas9 ニッカーゼ位置: K855A ABE8.8 位置: K1053A	SpCas9 ニッカーゼ位置: コドン 855 が AAG から GCC に変更される ABE8.8 位置: コドン 1053 が AAG から GCC に変更される
MA066 eSpCas9(1.1)	SpCas9 ニッカーゼ位置: K848A、K1003A、R1060A ABE8.8 位置: K1046A、K1201A、 K1258A	SpCas9 ニッカーゼ位置: コドン 848 が AAG から GCC に変更される コドン 1003 が AAG から GCC に変更される コドン 1060 が CGG から GCC に変更される ABE8.8 位置: コドン 1046 が AAG から GCC に変更される コドン 1201 が AAG から GCC に変更される コドン 1258 が CGG から GCC に変更される
MA067 eSpCas9(1.0)	SpCas9 ニッカーゼ位置: K810A、K1003A、R1060A ABE8.8 位置: K1008A、K1201A、 K1258A	SpCas9 ニッカーゼ位置: コドン 810 が AAG から GCC に変更される コドン 1003 が AAG から GCC に変更される コドン 1060 が CGG から GCC に変更される ABE8.8 位置: コドン 1008 が AAG から GCC に変更される コドン 1201 が AAG から GCC に変更される コドン 1258 が CGG から GCC に変更される

10

20

【 0 4 5 9】

【表 2 - 1】

30

表2. 高忠実度ABE MA040、MA041、MA045、MA064 MA065、MA066、及びMA067の配列

MA040 mRNA 配列:		
領域	配列	配列 番号
5'UTR	AGGAAAU'AAGAGAGAAAAGAAGAGu'AAGAAGAAAU'Au'AAGAGCCA CC	689

40

【 0 4 6 0】

50

【表 2 - 2】

高忠実度 ABE CDS	GGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTGACAGCG GCGAGACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGG TACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGC AACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGA GAGCTTCTGTTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCAT CTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACC TGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCC ACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACA AGCTGTTTATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTGAGGAGA ACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCC GGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCC GGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTGCGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG GGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCC AAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCT GCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAA GAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACAC CGAGATCACCAGGCCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACG ACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGCAGC AGTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC GGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTAC AAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCT GCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCT TCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACG CCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACC GGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGG GCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCTGGATGACCCGCAAGA GCGAGGAGACAATACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAG GGCGCCAGCGCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAG AACCTGCCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAG TACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAT CGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCT GAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGA TCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCAG ACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAG AACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTGAG GACCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACCTGTTTC GACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTG GGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGA GCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTCAAGAGCGACGGCTTCGCCAACC GGAACCTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG ACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAG CACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTG CAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCA CAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGAGAACGAGACCA CCCAGAAGGGCCAGAAGAAGACCGGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGT	717

10

20

30

40

【 0 4 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

	GGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGC TGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGG ACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGG GGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGA AGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTG GACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACACGGCAGAT CACAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGT ACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTC AAGAGCAAGCTGGTGAAGGACTTCCAGTTCTACAAG GTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAAC GCCGTGGTGGGACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAG CGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGAT CGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCT TCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCA ACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACAAACGGCGAGACA GGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCAGAA GGTGTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGC AGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGC GACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGG CGGCTTCGAGAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGTGGTGGTGGCCAA GGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTCAAGAGCGTGAAGGAGCTGC TGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCG ACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATC ATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAG CGGATGTCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGC CCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCAGCCACTACGA GAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCTG TGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTG CTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGC CGAGAACATCATCCACCTGTTACCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGC CGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAG CACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGG CCTGTACGAGACACGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGAGG GCGCCGACAAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGTTCGAGAGCCCCAAG AAGAAGCGGAAGGTGTGA	10
3'UTR	GCGGCCGCGu'u'AAu'u'AAGCu'GCCu'u'Cu'GCGGGGCGu'u'GCCu'u'Cu'GGC CAu'GCCCu'u'Cu'u'Cu'Cu'CCCu'u'GCACCu'Gu'ACCu'Cu'u'GGu'Cu'u'u'G AAu'AAAGCCu'GAGu'AGGAAGu'Cu'AGA	700
MA040 ア ミノ酸配 列	MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAI GLHDPTAHAEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRI GRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLCRF FRMPRRVFNAQKKAQSSTDGSGSSGGSSGSETPGTSESATPESGSGSSGGS DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEE SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADRLLI	718

【 0 4 6 3 】

【表 2 - 5】

	YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEEPNINASG VDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD LAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILR VNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGS IPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEFVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHS LLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDILLFKTNRKVTV KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTIAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRL SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIE ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGSGILKEHPVENTQLQNEKLYL YYLQNGRDMYVDQELDNRLSDYDVHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN RGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLV SDFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGD YKVDYVRKMIKSEQIEGKATKAYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRLIE TNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTETVQTGGFSKESILPKR NSDKLIARKKDWDPKKYGGFESPTVAYSVLVVAKEKGSKKLKSVKEL LGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLENGRKRMLA SAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGGPEDNEQKQLFVEQHKH YLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLN LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGDE GADKRTADGSEFESPKKKRKV	
MA041 mRNA 配列:		
領域	配列	
5'UTR	AGGAAAu'AAGAGAGAAAAGAAGAGu'AAGAAGAAu'Au'AAGAGCCA CC	689
高忠実度 ABE CDS	ATGAGCGAGGTGGAGTTCAGCCACGAGTACTGGATGCGGCACGCCCTG ACCCTGGCCAAGCGGGCCCGGACGAGCGGGAGGTGCCCGTGGGCGC CGTGCTGGTGCTGAACAACCGGGTGATCGGCGAGGGCTGGAACCGGG CCATCGGCCTGCACGACCCACCGCCACGCCGAGATCATGGCCCTGC GGCAGGGCGGCCCTGGTGATGCAGAACTACCGGCTGATCGACGCCACCC TGTACGTGACCTTCGAGCCCTGCGTGATGTGCGCCGGCGCCATGATCC ACAGCCGGATCGGCCGGGTGGTGTTCGGCGTGCGGAACGCCAAGACC GGCGCCGCCCGCAGCCTGATGGACGTGCTGCACCACCCCGCATGAAC CACCGGGTGGAGATCACCGAGGGCATCCTGGCCGACGAGTGCGCCGC CCTGCTGTGCCGTTCTTCCGGATGCCCCGGCGGGTGTCAACGCCCA GAAGAAGGCCAGAGCAGACCGACAGCGCGGCAGCAGCGCGGCA GCAGCGGCAGCAGACACCCGGCACCAGCGAGAGCGCCACCCCGAG AGCAGCGCGGCAGCAGCGCGGCAGCGACAAGAAGTACAGCATCGG CCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGA GTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACC GGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCG GCGAGACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGCGG TACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGC AACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTCCACCGGCTGGAGGA	719

【 0 4 6 4 】

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

	GGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCAGCCAGCGGA AGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGCGGCCTGAGCGAGCTG GACAAGGCCCGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACACGGCAGAT CACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGT ACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTC AAGAGCAAGCTGGTGAAGGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAG GTGCGGGAGATCAACAACCTACCACACGCCCACGACGCCTACCTGAAC GCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAG CGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGAT CGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCT TCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCA ACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACAAACGGCGAGACA GGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCAGAA GGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGC AGACCGGGCGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGC GACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGG CGGCTTCGAGAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAA GGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTCAAGAGCGTGAAGGAGCTGC TGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCG ACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATC ATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTGAGCTGGAGAACGGCCGGAAG CGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGC CCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCTGTACCTGGCCAGCCACTACGA GAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCG TGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTG CTGAGCGCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGC CGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGC CGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAG CACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGG CCTGTACGAGACACGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGAGG GCGCCGACAAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGTTCGAGAGCCCCAAG AAGAAGCGGAAGGTGTGA		10
3'UTR	GCGGCCGCu'u'AAu'u'AAGCu'GCCu'u'Cu'GCGGGGCu'u'GCCu'u'Cu'GGC CAu'GCCCu'u'Cu'u'Cu'Cu'CCCu'u'GCACCu'Gu'ACCu'Cu'u'GGu'Cu'u'u'G AAu'AAAGCCu'GAGu'AGGAAGu'Cu'AGA	700	20
MA041 ア ミノ酸配 列	MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNRRVIGEGWNRAI GLHDPTAHAEIMALRQGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRI GRVVFVGRNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLCRF FRMPRRVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEE SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLI YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD LAEDAKLQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILR VNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG	720	30
			40

【 0 4 6 6 】

【表 2 - 8】

	YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGS IPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKS LLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDILLFKTNRKVTV KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTIAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRL SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANANFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIE ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGSGILKEHPVENTQLQNEKLYL YYLQNGRDMYVDQELDNRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN RGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLV SDFRKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGD YKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIE TNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKR NSDKLIARKKDWDPKKYGGFESPTVAYSVLVAKVEKGSKKLKSVKEL LGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEENGRRKMLA SAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGGSPEDNEQKQLFVEQHKH YLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIHLFTLTN LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDE GADKRTADGSEFESPKKKRKV	
MA045 mRNA 配列:		
領域	配列	
5'UTR	AGGAAAU'AAGAGAGAAAAGAAGAGU'AAGAAGAAU'Au'AAGAGCCA CC	689
高忠実度 ABE CDS	ATGAGCGAGGTGGAGTTCAGCCACGAGTACTGGATGCGGCACGCCCTG ACCCTGGCCAAGCGGGCCCGGGACGAGCGGGAGGTGCCCGTGGGCGC CGTGCTGGTGCTGAACAACCGGGTGATCGGCGAGGGCTGGAACCGGG CCATCGGCCTGCACGACCCACCGCCACGCCGAGATCATGGCCCTGC GGCAGGGCGGCCTGGTGATGCAGAACTACCGGCTGATCGACGCCACCC TGTACGTGACCTTCGAGCCCTGCGTGATGTGCGCCGGCGCCATGATCC ACAGCCGGATCGGCCGGGTGGTGTTCCGGCTGCGGAACGCCAAGACC GGCGCCGCCGGCAGCCTGATGGACGTGCTGCACCAACCCCGCATGAAC CACCGGGTGGAGATCACCGAGGGCATCCTGGCCGACGAGTGCGCCGC CCTGCTGTGCCGTTCTTCCGGATGCCCCGGCGGGTGTCAACGCCCA GAAGAAGGCCCAGAGCAGCACCGACAGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCA GCAGCGGCAGCGAGACACCCGGCACCAGCGAGAGCGCCACCCCGAG AGCAGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCAGCGACAAGAAGTACAGCATCGG CCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGA GTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACC GGCAGACATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCG GCGAGACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGG TACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGC AACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGA GAGCTTCTGGTGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT CGGCAACATCGTGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCAT CTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGACAGCACCGACAAGGCCGACC TGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGCC	721

10

20

30

40

【 0 4 6 7 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

	CACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGT ACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTC AAGAGCAAGCTGGTGAAGGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAG GTGCGGGAGATCAACAACCTACCACACGCCCACGACGCCTACCTGAAC GCCGTGGTGGGACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAG CGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGAT CGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCT TCTACAGCAACATCATGAACCTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCA ACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCCTGATCGAGACAAACGGCGAGACA GGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAA GGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGC AGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGC GACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGG CGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAA GGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTCAAGAGCGTGAAGGAGCTGC TGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCG ACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATC ATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTGAGCTGGAGAACGGCCGGAAG CGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGC CCTGCCAGCAAGTACGTGAACCTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGA GAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTG TGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTG CTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGC CGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGC CGCCTTCAAGTACTTCGACACCAACATCGACCGGAAGCGGTACACCAG CACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGG CCTGTACGAGACACGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGAGG GCGCCGACAAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGTTCGAGAGCCCCAAG AAGAAGCGGAAGGTGTGA	
3'UTR	GCGGCCGCu'u'AAu'u'AAGCu'GCCu'u'Cu'GCGGGGCu'u'GCCu'u'Cu'GGC CAu'GCCCu'u'Cu'u'Cu'Cu'CCCu'u'GCACCu'Gu'ACCu'Cu'u'GGu'Cu'u'u'G AAu'AAAGCCu'GAGu'AGGAAGu'Cu'AGA	700
MA045 ア ミノ酸配 列	MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPGAVLVLNNRVIGEGWNRAI GLHDPTAHAEIMALRQGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRI GRVVFGRNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLCRF FRMPRRVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESGGSSGGS DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEE SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLLI YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFQQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD LAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLLAAKNLSDAILLSDILR VNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGS IPHQIHLGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKS LLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV	722

10

20

30

40

【 0 4 6 9 】

【表 2 - 1 1】

	KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRL SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANANFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAICKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIEM ARENQTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYL YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN RGKSDNPSEEVVKMKMNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLV SDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGD YKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRLIE TNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKR NSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKEL LGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLA SAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEQNEQQLFVEQHKH YLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTN LGAPAAFYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQISITGLYETRIDLSQLGGDE GADKRTADGSEFESPKKKRKV	
MA064(Hypa)mRNA 配列:		
領域	配列	
5'UTR	AGGAAAU'AAGAGAGAAAAGAAGAGu'AAGAAGAAAU'Au'AAGAGCCA CC	689
高忠実度 ABE CDS	Au'GAGCGAGGu'GGAGu'u'CAGCCACGAGu'ACu'GGAu'GCGGCACGCC Cu'GACCCu'GGCCAAGCGGGCCCCGGGACGAGCGGGAGGu'GCCCGu'GG GCGCCGu'GGu'GGu'GGu'GAACAACCGGu'GAu'CGGCGAGGGGu'GGA ACCGGGCCAu'CGGCCu'GCACGACCCCCACCGCCACGCCGAGAu'CAu' GGCCCu'GCGGCAGGGCGGCCu'GGu'GAu'GCAGAACu'ACCGGGu'GAu' CGACGCCACCCu'Gu'ACGu'GACCu'u'CGAGCCCu'GCGu'GAu'Gu'GCGC CGGCGCCAu'GAu'CCACAGCCGGAu'CGGCCGGGu'GGu'Gu'u'CGGCGu' GCGGAACGCCAAGACCGGCGCGCGGCCGAGCCu'GAu'GGACGu'GGu'G CACCACCCCGGCAu'GAACCACGGGu'GGAGAu'CACCGAGGGCAu'CC u'GGCCGACGAGu'GCGCCGCCCu'GGu'Gu'GCCGGu'u'Cu'u'CCGGAu'GC CCCGCGGGGu'Gu'u'CAACGCCCAGAAGAAGGCCAGAGCAGCACCAG CAGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCAGCAGCGGCAGCGAGACACCGGCA CCAGCGAGAGCGCCACCCCGAGAGCAGCGGCGGCAGCGCGCGGC AGCGACAAGAAGu'ACAGCAu'CGGCCu'GGCCAu'CGGCACCAACAGCG u'GGGGu'GGGCCu'GAu'CACCGACGAGu'ACAAGGu'GCCAGCAAGA AGu'u'CAAGGu'GGu'GGGCAACACCGACCGGCACAGCAu'CAAGAAGAA CCu'GAu'CGGCGCCCu'GGu'Gu'u'CGACAGCGGCGAGACAGCCGAGGCC ACCCGGCu'GAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGu'ACACCGGCGGAAGA ACCGGAu'Cu'GGu'ACCu'GCAGGAGAu'Cu'u'CAGCAACGAGAu'GGCCA AGGu'GGACGACAGCu'u'Cu'u'CCACCGGu'GGAGGAGAGCu'u'CCu'GG u'GGAGGAGGACAAGAAGCAGAGCGGCACCCCAu'Cu'u'CGGCAACAu' CGu'GGACGAGGu'GGCCu'ACCACGAGAAGu'ACCCACCAu'Cu'ACCAC Cu'GCGGAAGAAGCu'GGu'GGACAGCACCGACAAGGCCGACCu'GCGGC u'GAu'Cu'ACCu'GGCCu'GGCCACAu'GAu'CAAGu'u'CCGGGGCCACu' u'CCu'GAu'CGAGGCGGACCu'GAACCCGACAACAGCGACGu'GGACAA GCu'Gu'u'CAu'CCAGCu'GGu'GCAGACCu'ACAACCAGCu'Gu'u'CGAGGA GAACCCCAu'CAACGCCAGCGGCGu'GGACGCCAAGGCCAu'CCu'GAGC	723

【0 4 7 0】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 2】

	GCCCCGGu'GAGCAAGAGCCGGCGGu'GGAGAACCu'GAu'CGCCCAGC u'GCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCu'Gu'u'CGGCAACCu'GAu'CGCCCu' GAGCCu'GGGCCu'GACCCCAACu'u'CAAGAGCAACu'u'CGACCu'GGCC GAGACGCCAAGCu'GCu'GGCCAGAu'CGGCGACCAu'ACGACGACGACC u'GGACAACCu'GGu'GGCCAGAu'CGGCGACCAu'ACGCCGACCu'Gu'u' 'CCu'GGCCGCCAAGAACCu'GAGCGACGCCAu'CCu'GGu'GAGCGACAu' CCu'GCGGGu'GAACACCGAGAu'CACCAAGGCCCCCu'GAGCGCCAGC Au'GAu'CAAGCGGu'ACGACGAGCACCACCAGGACCu'GACCCu'GGu'GA AGGCCCu'GGu'GCGGCAGCAGCu'GCCCCGAGAAGu'ACAAGGAGAu'Cu'u' 'Cu'u'CGACCAGAGCAAGAACGGCu'ACGCCGGCu'ACu'CGACGGCGG CGCCAGCCAGGAGGAGu'u'Cu'ACAAGu'u'CAu'CAAGCCCAu'CCu'GGA GAAGAu'GGACGGCACCAGGAGCu'GGu'GAAGCu'GAACCGGA GGACCu'GGu'GCGGAAGCAGCGACCu'u'CGACAACGGCAGCAu'CCCC CACCAGAu'CCACCu'GGGCGAGCu'GCACGCCAu'CCu'GCGGCGGCAGG AGGACu'u'Cu'ACCCCu'u'CCu'GAAGGACAACCGGGAGAAGAu'CGAGA AGAu'CCu'GACCu'u'CCGGAu'CCCCu'ACu'ACGu'GGGCCCCCu'GGCCCG GGGCAACAGCCGGu'u'CGCCu'GGAu'GACCCGCAAGAGCGAGGAGACA Au'CACCCCu'GGAACu'u'CGAGGAGGu'GGu'GGACAAGGGCGCCAGCG CCCAGAGCu'u'CAu'CGAGCGGAu'GACCAACu'u'CGACAAGAACCu'GCC CAACGAGAAGGu'GGu'GCCCAAGCACAGCCu'GGu'Gu'ACGAGu'ACu'u' CACCGu'Gu'ACAACGAGCu'GACCAAGGu'GAAGu'ACGu'GACCGAGGG CAu'GCGGAAGCCCGCCu'u'CCu'GAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAu'C Gu'GGACCu'GGu'Gu'u'CAAGACCAACCGGAAGGu'GACCGu'GAAGCAG Cu'GAAGGAGGACu'ACu'u'CAAGAAGAu'CGAGu'GGu'u'CGACAGCGu'G GAGAu'CAGCGGCGu'GGAGGACCGGu'u'CAACGCCAGCCu'GGGCACCu' ACCACGACCu'GGu'GAAGAu'CAu'CAAGGACAAGGACu'u'CCu'GGACA ACGAGGAGAACGAGGACAu'CCu'GGAGGACAu'CGu'GGu'GACCCu'GA CCCu'Gu'u'CGAGGACCGGGAGAu'GAu'CGAGGAGCGGGu'GAAGACCu' ACGCCCACCu'Gu'u'CGACGACAAGGu'GAu'GAAGCAGCu'GAAGCGGGC GCGGu'ACACCGGGu'GGGGCCGGCu'GAGCCGGAAGCu'GAu'CAACGGC Au'CCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAu'CCu'GGACu'u'CCu'CAAGA GCGAGGCGu'u'CGCCAACCGGGCCu'u'CGCCGCCCu'GAu'CGCCGACG ACAGCCu'GACCu'u'CAAGGAGGACAu'CCAGAAGGCCAGGu'GAGCGG CCAGGGCGACGCCu'GCACGAGCACAu'CGCCAACCu'GGCCGGCAGC CCCGCCAu'CAAGAAGGGCAu'CCu'GCAGACCGu'GAAGGu'GGu'GGACG AGCu'GGu'GAAGGu'GAu'GGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAu'CGu'GAu' 'CGAGAu'GGCCCGGAGAAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAAC AGCCGGGAGCGGAu'GAAGCGGAu'CGAGGAGGGCAu'CAAGGAGCu'G GGCAGCCAGAu'CCu'GAAGGAGCACCCCGu'GGAGAACACCCAGCu'GC AGAACGAGAAGCu'Gu'ACCu'Gu'ACu'ACCu'GCAGAACGGCCGGGACAu' 'Gu'ACGu'GGACCAGGAGCu'GGACAu'CAACCGGGu'GAGCGACu'ACGA CGu'GGACCACAu'CGu'GCCCCAGAGCu'u'CCu'GAAGGACGACAGCu'C GACAACAAGGu'GGu'GACCCGGAGCGACAAGAACCGGGCAAGAGCG ACAACGu'GCCCAGCGAGGAGGu'GGu'GAAGAAGAu'GAAGAACu'ACu' GGCGGCAGCu'GGu'GAACGCCAAGCu'GAu'CACCCAGCGGAAGu'u'CGA CAACCu'GACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCu'GAGCGAGCu'GGACAAG GCCGGCu'u'CAu'CAAGCGGCAGCu'GGu'GGAGACACGGCAGAu'CACCA AGCACGu'GGCCAGAu'CCu'GGACAGCCGAu'GAACACCAAGu'ACGA	
		10
		20
		30
		40

【 0 4 7 1 】

【表 2 - 1 3】

	CGAGAACGACAAGCu'GAu'CCGGGAGGu'GAAGGu'GAu'CACCCu'CAA GAGCAAGCu'GGu'GAGCGACu'u'CCGGAAGGACu'u'CCAGu'u'Cu'ACAA GGu'GCGGGAGAu'CAACAACu'ACCACCACGCCCACGACGCCu'ACCu'G AACGCCGu'GGu'GGGCACCGCCCu'GAu'CAAGAAGu'ACCCCAAGCu'GG AGAGCGAu'u'CGu'Gu'ACGGCGACu'ACAAGGu'Gu'ACGACGu'GCGGA AGAu'GAu'CGCCAAGAGCGAGCAGGAGAu'CGGCAAGGCCACCGCCAA Gu'ACu'u'Cu'u'Cu'ACAGCAACAu'CAu'GAACu'u'Cu'u'CAAGACCGAGAu 'CACCCu'GGCCAACGGCGAGAu'CCGGAAGCGGCCCu'GAu'CGAGACA AACGGCGAGACAGGCGAGAu'CGu'Gu'GGGACAAGGGCCGGGACu'u'C GCCACCGu'GCGGAAGGu'GGu'GAGAu'GCCCCAGGu'GAACu'CGu'G AAGAAGACCGAGGu'GCAGACCGGCGGGu'u'CAGCAAGGAGAGAu'CC u'GCCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCu'GAu'CGCCCCGAAGAAGGACu'G GGACCCCAAGAAGu'ACGGCGGGu'u'CGACAGCCCCACCGu'GGCCu'AC AGCGu'GGu'GGu'GGu'GGCCAAGGu'GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAG Cu'CAAGAGCGu'GAAGGAGCu'GGu'GGGCAu'CACCAu'CAu'GGAGCGG AGCAGCu'u'CGAGAAGAACCCCAu'CGACu'u'CCu'GGAGGCCAAGGGCu 'ACAAGGAGGu'GAAGAAGGACCu'GAu'CAu'CAAGCu'GCCCAAGu'ACA GCCu'Gu'u'CGAGCu'GGAGAACGGCCGGAAGCGGAu'GGu'GGCCAGCGC CGGCGAGCu'GCAGAAGGGCAACGAGCu'GGCCCu'GCCAGCAAGu'AC Gu'GAACu'u'CCu'Gu'ACCu'GGCCAGCCACu'ACGAGAAGCu'GAAGGGC AGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCu'Gu'u'CGu'GGAGCAGCACA AGCACu'ACCu'GGACGAGAu'CAu'CGAGCAGAu'CAGCGAu'u'CAGCA AGCGGGu'GAu'CCu'GGCCGACGCCAACCu'GGACAAGGu'GGu'GAGCGC Cu'ACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAu'CCGGGAGCAGGCCGAGAAC Au'CAu'CCACCu'Gu'u'CACCCu'GACCAACCu'GGGCGCCCCCGCCGCCu' u'CAAGu'ACu'u'CGACACCACCAu'CGACCGGAAGCGGu'ACACCAGCAC CAAGGAGGu'GGu'GGACGCCACCCu'GAu'CCACCAGAGCAu'CACCGGC Cu'Gu'ACGAGACACGGAu'CGACCu'GAGCCAGCu'GGGCGGCGACGAGG GCGCCGACAAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGu'u'CGAGAGCCCCAA GAAGAAGCGGAAGGu'Gu'GA	
3'UTR	GCGGCCGGu'u'AAu'u'AAGCu'GCCu'u'Cu'GCGGGGGu'u'GCCu'u'Cu'GGC CAu'GCCCu'u'Cu'u'Cu'CCCu'u'GCACCu'Gu'ACCu'Cu'u'GGu'Cu'u'u'G AAu'AAAGCCu'GAGu'AGGAAGu'Cu'AGA	700
MA064 ア ミノ酸配 列	MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNLRVIGEGWNRAI GLHDPTAHAEIMALRQGLVMQNYRLIDATLYVTPEPCVMCAGAMIHSRI GRVVFGRVNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLCRF FRMPRRVFNAQKKAQSSTDSSGSSGSSGSETPGTSESATPESSGSSGGS DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLR YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIASLGLTPNFKSNFD LAEDAKLQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILR VNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGS IPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKS LLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV	724

10

20

30

40

【0 4 7 2】

50

【表 2 - 1 4】

	KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIKDKDFLDNEEN EDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRL SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRAFAALIADDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVDELVKVMGRHKPENIVIEMA RENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNR GKSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDK AGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVS DFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDY KVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPIET NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESILPKRN SDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELL GITIMERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLEFENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHY LDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNL GAPAAFKYFDDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGDEG ADKRTADGSEFESPKKKRKV	
MA065(K855A)mRNA 配列:		
領域	配列	
5'UTR	AGGAAAU'AAGAGAGAAAAGAAGAGU'AAGAAGAAAU'Au'AAGAGCCA CC	689
高忠実度 ABE CDS	Au'GAGCGAGGU'GGAGU'u'CAGCCACGAGU'ACU'GGAU'GCGGCACGCC CU'GACCCU'GGCCAAGCGGGCCCCGGACGAGCGGGAGGU'GCCCCU'GG GCGCCU'GCU'GGU'GCU'GAACAACCGGU'GAU'CGGCGAGGGCU'GGA ACCGGGCCAU'CGGCCU'GCACGACCCACCGCCACGCGGAGAU'CAU' GGCCU'GCGGCAGGGCGGCCU'GGU'GAU'GCAGAACU'ACCGGCU'GAU' CGACGCCACCCU'GU'ACGU'GACCU'u'CGAGCCCU'GCGU'GAU'GU'GCGC CGGCGCCAU'GAU'CCACAGCCGAU'CGGCCGGU'GGU'GU'u'CGGCGU' GCGGAACGCCAAGACCGGCGCCGCGGCAGCCU'GAU'GGACGU'GCU'G CACCACCCCGCAU'GAACCACCGGU'GGAGAU'CACCGAGGGCAU'CC u'GGCCGACGAGU'GCGCCGCCU'GCU'GU'GCCGU'u'CU'u'CCGGAU'GC CCCGGCGGU'GU'u'CAACGCCCAGAAGAAGGCCCAGAGCAGCACCAG CAGCGCGGCAGCAGCGCGGCAGCAGCGGCAGCGAGACACCCGGCA CCAGCGAGAGCGCCACCCCGAGAGCAGCGCGGCAGCAGCGGCGGC AGCGACAAGAAGU'ACAGCAU'CGGCCU'GGCCAU'CGGCACCAACAGCG u'GGGCU'GGGCCU'GAU'CACCGACGAGU'ACAAGGU'GCCCAGCAAGA AGU'u'CAAGGU'GCU'GGGCAACACCGACCGGCACAGCAU'CAAGAAGAA CCU'GAU'CGGCGCCCU'GCU'GU'u'CGACAGCGGCGAGACAGCCGAGGCC ACCCGGCU'GAAGCGGACCGCCCGCGGCGGU'ACACCCGGCGGAAGA ACCGGAU'CU'GCU'ACCU'GCAGGAGAU'CU'u'CAGCAACGAGAU'GGCCA AGGU'GGACGACAGCU'u'CU'u'CCACCGGU'GGAGGAGAGCU'u'CCU'GG u'GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCAU'CU'u'CGGCAACAU' CGU'GGACGAGGU'GGCCU'ACCACGAGAAGU'ACCCACCAU'CU'ACCAC CU'GCGGAAGAAGCU'GGU'GGACAGCACGACAAGGCCGACCU'GCGGC u'GAU'CU'ACCU'GGCCU'GGCCCACAU'GAU'CAAGU'u'CCGGGGCCACU' u'CCU'GAU'CGAGGGCGACCU'GAACCCCGACAACAGCGACGU'GGACAA GCU'GU'u'CAU'CCAGCU'GGU'GCAGACCU'ACAACGAGCU'GU'u'CGAGGA GAACCCCAU'CAACGCCAGCGGCU'GGACGCCAAGGCCAU'CCU'GAGC	725

10

20

30

40

【0 4 7 3】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 6】

	CGAGAACGACAAGCu'GAu'CCGGGAGGu'GAAGGu'GAu'CACCCu'CAA GAGCAAGCu'GGu'GAGCGACu'u'CCGGAAGGACu'u'CCAGu'u'Cu'ACAA GGu'GCGGGAGAu'CAACAACu'ACCACCACGCCACGACGCCu'ACCu'G AACGCCGu'GGu'GGGCACCGCCCu'GAu'CAAGAAGu'ACCCCAAGCu'GG AGAGCGAGu'u'CGu'Gu'ACGGCGACu'ACAAGGu'Gu'ACGACGu'GCGGA AGAu'GAu'CGCCAAGAGCGAGCAGGAGAu'CGGCAAGGCCACCGCCAA Gu'ACu'u'Cu'u'Cu'ACAGCAACAu'CAu'GAACu'u'Cu'u'CAAGACCGAGAu 'CACCCu'GGCCAACGGCGAGAu'CCGGAAGCGGCCCu'GAu'CGAGACA AACGGCGAGACAGGCGAGAu'CGu'Gu'GGGACAAGGGCCGGGACu'u'C GCCACCGu'GCGGAAGGu'GGu'GAGCAu'GCCCCAGGu'GAACu'CGu'G AAGAAGACCGAGGu'GCAGACCGGCGGGu'u'CAGCAAGGAGAGCAu'CC u'GCCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCu'GAu'CGCCCCGAAGAAGGACu'G GGACCCCAAGAAGu'ACGGCGGGu'u'CGACAGCCCCACCGu'GGCCu'AC AGCGu'GGu'GGu'GGu'GGCCAAGGu'GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAG Cu'CAAGAGCGu'GAAGGAGCu'GGu'GGCAu'CACCAu'CAu'GGAGCGG AGCAGCu'u'CGAGAAGAACCCCAu'CGACu'u'CCu'GGAGGCCAAGGGCu 'ACAAGGAGGu'GAAGAAGGACCu'GAu'CAu'CAAGCu'GCCCAAGu'ACA GCCu'Gu'u'CGAGCu'GGAGAACGGCCGGAAGCGGAu'GGu'GGCCAGCGC CGGCGAGCu'GCAGAAGGGCAACGAGCu'GGCCCu'GCCAGCAAGu'AC Gu'GAACu'u'CCu'Gu'ACCu'GGCCAGCCACu'ACGAGAAGCu'GAAGGGC AGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCu'Gu'u'CGu'GGAGCAGCACA AGCACu'ACCu'GGACGAGAu'CAu'CGAGCAGAu'CAGCGAGu'u'CAGCA AGCGGGu'GAu'CCu'GGCCGACGCCAACCu'GGACAAGGu'GGu'GAGCGC Cu'ACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAu'CCGGGAGCAGGCCGAGAAC Au'CAu'CCACCu'Gu'u'CACCCu'GACCAACCu'GGGCGCCCCCGCCGCCu' u'CAAGu'ACu'u'CGACACCACCAu'CGACCGGAAGCGGu'ACACCAGCAC CAAGGAGGu'GGu'GGACGCCACCCu'GAu'CCACCAGAGCAu'CACCGGC Cu'Gu'ACGAGACACGGAu'CGACCu'GAGCCAGCu'GGGCGGCGACGAGG GCGCCGACAAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGu'u'CGAGAGCCCCAA GAAGAAGCGGAAGGu'Gu'GA	
3'UTR	GCGGCCGGu'u'AAu'u'AAGCu'GCCu'u'Cu'GCGGGGGu'u'GCCu'u'Cu'GGC CAu'GCCCu'u'Cu'u'Cu'CCCu'u'GCACCu'Gu'ACCu'Cu'u'GGu'Cu'u'u'G AAu'AAAGCCu'GAGu'AGGAAGu'Cu'AGA	700
MA065 ア ミノ酸配 列	MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNLRVIGEGWNRAI GLHDPTAHAEIMALRQGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRI GRVVFVGRNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLCRF FRMPRRVFNAQKKAQSSTDSGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEE SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LI YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD LAEDAKLQLSKD TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILR VNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGS IPHQIHLGELHAILRRQEDFYFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKS LLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV	726

10

20

30

40

【 0 4 7 5 】

50

【表 2 - 1 7】

	KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN EDILEDIVLTTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRL SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKQILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIE ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYL YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVHIVPQSFLKDDSIDNAVLTRSDKN RGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGGLSELD KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLV SDFRKDFQFYKVRINNYYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGD YKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIE TNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESILPKR NSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKEL LGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFENGRKRMLA SAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKH YLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLN LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSTGLYETRIDLSQLGGDE GADKRTADGSEFESPKKKRKV	
MA066(eSpCas9(1.1))mRNA 配列:		
領域	配列	
5'UTR	AGGAAAu'AAGAGAGAAAAGAAGAGu'AAGAAGAAAu'Au'AAGAGCCA CC	689
高忠実度 ABE CDS	Au'GAGCGAGGu'GGAGu'u'CAGCCACGAGu'ACu'GGAu'GCGGCACGCC Cu'GACCCu'GGCCAAGCGGGCCCGGACGAGCGGGAGGu'GCCCGu'GG GCGCCGu'GGu'GGu'GGu'GAACAACCGGGu'GAu'CGGCGAGGGGu'GGA ACCGGGCCAu'CGGCCu'GCACGACCCCAACCGCCACGCGGAGAu'CAu' GGCCCu'GCGGCAGGGCGGCCu'GGu'GAu'GCAGAACu'ACCGGGu'GAu' CGACGCCACCCu'Gu'ACGu'GACCu'u'CGAGCCCu'GCGu'GAu'Gu'GCGC CGGCGCCAu'GAu'CCACAGCCGGAu'CGGCCGGGu'GGu'Gu'u'CGGCGu' GCGGAACGCCAAGACCGGCGCCGCGGCAGCCu'GAu'GGACGu'GGu'G CACCACCCCGGCAu'GAACCACCGGGu'GGAGAu'CACCGAGGGCAu'CC u'GGCCGACGAGu'GCGCCGCCCu'GGu'Gu'GCCGGu'u'Cu'u'CCGGAu'GC CCCGGCGGGu'Gu'u'CAACGCCCCAGAAGAAGGCCAGAGCAGCACCAGA CAGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCAGCAGCGGCAGCGAGACACCCGGCA CCAGCGAGAGCGCCACCCCGAGAGCAGCGGCGGCAGCAGCGGCGGC AGCGACAAGAAGu'ACAGCAu'CGGCCu'GGCAu'CGGCACCAACAGCG u'GGGGu'GGGCCGu'GAu'CACCGACGAGu'ACAAGGu'GCCAGCAAGA AGu'u'CAAGGu'GGu'GGGCAACACCGACCGGCACAGCAu'CAAGAAGAA CCu'GAu'CGGCGCCCu'GGu'Gu'u'CGACAGCGGCGAGACAGCCGAGGCC ACCGGGCu'GAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGu'ACACCCGGCGGAAGA ACCGGAu'Cu'GGu'ACCu'GCAGGAGAu'Cu'u'CAGCAACGAGAu'GGCCA AGGu'GGACGACAGCu'u'Cu'u'CCACCGGu'GGAGGAGAGCu'u'CCu'GG u'GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAu'Cu'u'CGGCAACAu' CGu'GGACGAGGu'GGCCu'ACCACGAGAAGu'ACCCACCAu'Cu'ACCAC Cu'GCGGAAGAAGCu'GGu'GGACAGCACGACAAGGCCGACCu'GCGGC u'GAu'Cu'ACCu'GGCCCu'GGCCACAu'GAu'CAAGu'u'CCGGGGCCACu' u'CCu'GAu'CGAGGGCGACCu'GAACCCGACAACAGCGACGu'GGACAA GGu'Gu'u'CAu'CCAGCu'GGu'GCAGACCu'ACAACAGCu'Gu'u'CGAGGA GAACCCCAu'CAACGCCAGCGGGu'GGACGCCAAGGCCAu'CCu'GAGC	727

【0 4 7 6】

10

20

30

40

50

GCCCCGGu'GAGCAAGAGCCGGCGGCGu'GGAGAACCu'GAu'CGCCCCG u'GCCCCGCGAGAAGAAGAACGGCCu'Gu'u'CGGCAACCu'GAu'CGCCCC' GAGCCu'GGGCGu'GACCCCCAACu'u'CAAGAGCAACu'u'CGACCu'GGCC GAGGACGCCAAGCu'GCAGCu'GAGCAAGGACACCu'ACGACGACGACC u'GGACAACCu'GCU'GGCCCAGAu'CGGCGACCAGu'ACGCCGACCu'Gu'u 'CCu'GGCCGCCAAGAACCu'GAGCGACGCCAu'CCu'GCU'GAGCGACu' CCu'GCGGGu'GAACACCGAGAu'CACCAAGGCCCCCCu'GAGCGCCAGC Au'GAu'CAAGCGGu'ACGACGAGCACCACCAGGACCu'GACCCu'GCU'GA AGGCCCu'GGu'GCGGCAGCAGCu'GCCCCGAGAAGu'ACAAGGAGAu'Cu'u 'Cu'u'CGACCAGAGCAAGAACGGCu'ACGCCGGCu'ACu'CGACGGCGG CGCCAGCCAGGAGGAGu'u'Cu'ACAAGu'u'CAu'CAAGCCCCu'CCu'GGA GAAGAu'GGACGGCACCGAGGAGCu'GCU'GGu'GAAGCu'GAACCGGGA GGACCu'GCU'GCGGAAGCAGCGGACCu'u'CGACAACGGCAGCAu'CCCC CACCAGAu'CCACCu'GGGCGAGCu'GCACGCCAu'CCu'GCGGCGGCAGG AGGACu'u'Cu'ACCCCu'u'CCu'GAAGGACAACCGGGAGAAGAu'CGAGA AGAu'CCu'GACCu'u'CCGGAu'CCCCu'ACu'ACGu'GGGCCCCCu'GGCCCC GGGCAACAGCCGGu'u'CGCCu'GGAu'GACCCGCAAGAGCGAGGAGACA Au'CACCCCCu'GGAACu'u'CGAGGAGGu'GGu'GGACAAGGGCGCCAGCG CCCAGAGCu'u'CAu'CGAGCGGAu'GACCAACu'u'CGACAAGAACCu'GCC CAACGAGAAGGu'GCU'GCCCCAAGCACAGCCu'GCU'Gu'ACGAGu'ACu'u' CACCGu'Gu'ACAACGAGCu'GACCAAGGu'GAAGu'ACGu'GACCGAGGG CAu'GCGGAAGCCCGCCu'u'CCu'GAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAu'C Gu'GGACCu'GCU'Gu'u'CAAGACCAACCGGAAGGu'GACCGu'GAAGCAG Cu'GAAGGAGGACu'ACu'u'CAAGAAGAu'CGAGu'GCU'u'CGACAGCGu'G GAGAu'CAGCGGCGu'GGAGGACCGGu'u'CAACGCCAGCCu'GGGCACCu' ACCACGACCu'GCU'GAAGAu'CAu'CAAGGACAAGGACu'u'CCu'GGACA ACGAGGAGAACGAGGACAu'CCu'GGAGGACAu'CGu'GCU'GACCCu'GA CCCu'Gu'u'CGAGGACCGGGAGAu'GAu'CGAGGAGCGGGu'GAAGACCu' ACGCCACCu'Gu'u'CGACGACAAGGu'GAu'GAAGCAGCu'GAAGCGGG GCGGu'ACACCGGGu'GGGGCCGGCu'GAGCCGGAAGCu'GAu'CAACGGC Au'CCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAu'CCu'GGACu'u'CCu'CAAGA GCGACGGCu'u'CGCCAACCGGAACu'u'CAu'GCAGCu'GAu'CCACGACGA CAGCCu'GACCu'u'CAAGGAGGACAu'CCAGAAGGCCAGGu'GAGCGGC CAGGGCGACAGCCu'GCACGAGCACAu'CGCCAACCu'GGCCGGCAGCC CCGCCAu'CAAGAAGGGCAu'CCu'GCAGACCGu'GAAGGu'GGu'GGACG AGCu'GGu'GAAGGu'GAu'GGGCCGGGACAAGCCCCGAGAACAu'CGu'GAu 'CGAGAu'GGCCCGGAGAGAACCAGACACCCAGAGGGCCAGGAAGAAC AGCCGGGAGCGGAu'GAAGCGGAu'CGAGGAGGGCAu'CAAGAGCu'G GGCAGCCAGAu'CCu'GAAGGAGCACCCCGu'GGAGAACACCCAGCu'GC AGAACGAGAAGCu'Gu'ACCu'Gu'ACu'ACCu'GCAGAACGGCCGGGACAu 'Gu'ACGu'GGACCAGGAGCu'GGACAu'CAACCGGGu'GAGCGACu'ACGA CGu'GGACCACAu'CGu'GCCCCAGAGCu'u'CCu'GGCCGACGACAGCAu' CGACAACAAGGu'GCU'GACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGC GACAACGu'GCCAGCGAGGAGGu'GGu'GAAGAAGAu'GAAGAACu'ACu 'GGCGGCAGCu'GCU'GAACGCCAAGCu'GAu'CACCCAGCGGAAGu'u'CG ACAACCu'GACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCu'GAGCGAGCu'GGACAA GGCCGGCu'u'CAu'CAAGCGGCAGCu'GGu'GGAGACACGGCAGAu'CACC

20

30

40

【 0 4 7 7 】

【表 2 - 1 9】

	AAGCACGu'GGCCAGAu'CCu'GGACAGCCGGAu'GAACACCAAGu'ACG ACGAGAACGACAAGCu'GAu'CCGGGAGGu'GAAGGu'GAu'CACCCu'CA AGAGCAAGCu'GGu'GAGCGACu'u'CCGGAAGGACu'u'CCAGu'u'Cu'ACA AGGu'GCCGGAGAu'CAACAAAu'ACCACCAGCCCCACGACGCCu'ACCu' GAACGCCGu'GGu'GGGCACCGCCCu'GAu'CAAGAAGu'ACCCCGCCCu'G GAGAGCGAGu'u'CGu'Gu'ACGGCGACu'ACAAGGu'Gu'ACGACGu'GCGG AAGAu'GAu'CGCCAAGAGCGAGCAGGAGAu'CGGCAAGGCCACCGCCA AGu'ACu'u'Cu'u'Cu'ACAGCAACAu'CAu'GAACu'u'Cu'u'CAAGACCGAGA u'CACCCu'GGCCAACGGCGAGAu'CCGGAAGGCCCCCu'GAu'CGAGAC AAACGGCGAGACAGGCGAGAu'CGu'Gu'GGGACAAGGGCCGGGACu'u' CGCCACCGu'GCGGAAGGu'GGu'GAGCAu'GCCCCAGGu'GAACu'CGu' GAAGAAGACCGAGGu'GCAGACCGGCGGGu'u'GAGCAAGGAGAGCAu'C Cu'GCCAAGCGGAACAGCGACAAGCu'GAu'CGCCCGGAAGAAGGACu' GGGACCCCAAGAAGu'ACGGCGGGu'u'CGACAGCCCCACCGu'GGCCu'A CAGCGu'GGu'GGu'GGCCAAGGu'GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAA GGu'CAAGAGCGu'GAAGGAGCu'GGu'GGGCAu'CACCAu'CAu'GGAGCG GAGCAGCu'u'CGAGAAGAACCCCAu'CGACu'u'CCu'GGAGGCCAAGGGC u'ACAAGGAGGu'GAAGAAGGACCu'GAu'CAu'CAAGCu'GCCAAGu'AC AGCCu'Gu'u'CGAGCu'GGAGAACGGCCGGAAGCGGAu'GGu'GGCCAGC GCCGCGAGCu'GCAGAAGGGCAACGAGCu'GGCCCu'GCCAGCAAGu' ACGu'GAACu'u'CCu'Gu'ACCu'GGCCAGCCACu'ACGAGAAGCu'GAAGG GCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCu'Gu'u'CGu'GGAGCAGCA CAAGCACu'ACCu'GGACGAGAu'CAu'CGAGCAGAu'CAGCGAGu'u'GAG CAAGCGGGu'GAu'CCu'GGCCGACGCCAACCu'GGACAAGGu'GGu'GAGC GCCu'ACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAu'CCGGGAGCAGGCCGAGA ACAu'CAu'CCACCu'Gu'u'CACCCu'GACCAACCu'GGGCGCCCCCGCCG Cu'u'CAAGu'ACu'u'CGACACCACCAu'CGACCGGAAGCGGu'ACACCAGC ACCAAGGAGGu'GGu'GGACGCCACCCu'GAu'CCACCAGAGCAu'CACCG GCCu'Gu'ACGAGACACGGAu'CGACCu'GAGCCAGCu'GGGCGGCGACGA GGGCGCCGACAAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGu'u'CGAGAGCCCC AAGAAGAAGCGGAAGGu'Gu'GA	
3'UTR	GCGGCCGGu'u'AAu'u'AGCu'GCCu'u'Cu'GCGGGGGu'u'GCCu'u'Cu'GGC CAu'GCCCu'u'Cu'u'Cu'CCCu'u'GCACCu'Gu'ACCu'Cu'u'GGu'Cu'u'G AAu'AAAGCCu'GAGu'AGGAAGu'Cu'AGA	700
MA066 ア ミノ酸配 列	MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAFLVLNLRVIGEGWNRAI GLHDPTAHAEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRI GRVVFGRVNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLCRF FRMPRRVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEE SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVLDSTDKADLRLLI YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFQILVQTYNQLEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD LAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILR VNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGS IPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKS	728

10

20

30

40

【 0 4 7 8 】

【表 2 - 2 0】

	LLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN EDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRL SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIE ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYL YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLADDSIDNKVLTRSDKN RGKSDNPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRQLVETROITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLV SDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPALESEFVYGD YKVYDVRKMIKSEQIEGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKAPLIE TNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTVEVQTGGFSKESILPKR NSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKEL LGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLENGRKRMLA SAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKH YLDEIEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTN LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDE GADKRTADGSEFESPKKKRKV	
MA067(eSpCas9(1.0))mRNA 配列:		
領域	配列	
5'UTR	AGGAAAU'AAGAGAGAAAAGAAGAGU'AAGAAGAAAU'Au'AAGAGCCA CC	689
高忠実度 ABE CDS	AU'GAGCGAGGU'GGAGU'u'CAGCCACGAGU'ACU'GGAU'GCGGCACGCC CU'GACCCU'GGCCAAGCGGGCCCCGGGACGAGCGGGAGGU'GCCCGU'GG GCGCCGU'GCU'GGU'GCU'GAACAACCGGGU'GAU'CGGCGAGGGCU'GGA ACCGGGGCCAU'CGGCCU'GCACGACCCCAACCGCCACGCCGAGAU'CAU' GGCCCU'GCGGCAGGGCGGCCU'GGU'GAU'GCAGAACU'ACCGGCU'GAU' CGACGCCACCCU'GU'ACGU'GACCU'u'CGAGCCCU'GCGU'GAU'GU'GCGC CGGCGCCAU'GAU'CCACAGCCGGAU'CGGCCGGGU'GGU'GU'u'CGGCGU' GCGGAACGCCAAGACCGGCGCCGCCGCGCAGCCU'GAU'GGACGU'GCU'G CACCACCCCGGCAU'GAACCACCGGGU'GGAGAU'CACCGAGGGCAU'CC U'GGCCGACGAGU'GCGCCGCCCU'GCU'GU'GCCGU'u'CU'u'CCGGAU'GC CCCGGCGGGU'GU'u'CAACGCCCAGAAGAAGGCCAGAGCAGCACC GA CAGCGGCGGCAGCAGCGGGCAGCAGCGGCAGCGAGACACCCGGCA CCAGCGAGAGCGCCACCCCGAGAGCAGCGGCGGCAGCAGCGGCGGC AGCGACAAGAAGU'ACAGCAU'CGGCCU'GGCCAU'CGGCACCAACACCG U'GGGCU'GGGCCU'GAU'CACCGACGAGU'ACAAGGU'GCCAGCAAGA AGU'u'CAAGGU'GCU'GGGCAACACCGACCGGCACAGCAU'CAAGAAGAA CCU'GAU'CGGCGCCCU'GCU'GU'u'CGACAGCGGCGAGACAGCCGAGGCC ACCCGGCU'GAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGU'ACACCCGGCGGAAGA ACCGGAU'CU'GCU'ACCU'GCAGGAGAU'CU'u'CAGCAACGAGAU'GGCCA AGGU'GGACGACAGCU'u'CU'u'CCACCGGU'GGAGGAGAGCU'u'CCU'GG U'GGAGGAGGACAAGAAGCAGAGCGGCACCCCAU'CU'u'CGGCAACAU' CGU'GGACGAGGU'GGCCU'ACCACGAGAAGU'ACCCACCAU'CU'ACCAC CU'GCGGAAGAAGCU'GGU'GGACAGCACCACAAAGGCCGACCU'GCGGC U'GAU'CU'ACCU'GGCCU'GGCCCACAU'GAU'CAAGU'u'CCGGGGCCACU' U'CCU'GAU'CGAGGGCGACCU'GAACCCGACAACAGCGACGU'GGACAA GCU'GU'u'CAU'CCAGCU'GGU'GCAGACCU'ACAACCGCU'GU'u'CGAGGA	729

【0 4 7 9】

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 2】

	AGCACGu'GGCCCAGAu'CCu'GGACAGCCGGAu'GAACACCAAGu'ACGA CGAGAACGACAAGCu'GAu'CCGGGAGGu'GAAGGu'GAu'CACCCu'CAA GAGCAAGCu'GGu'GAGCGACu'u'CCGGAAGGACu'u'CCAGu'u'Cu'ACAA GGu'GCGGGAGAu'CAACAACu'ACCACCACGCCCACGACGCCu'ACCu'G AACGCCGu'GGu'GGGCACCGCCCu'GAu'CAAGAAGu'ACCCCGCCCu'GG AGAGCGAGu'u'CGu'Gu'ACGGCGACu'ACAAGGu'Gu'ACGACGu'GCGGA AGAu'GAu'CGCCAAGAGCGAGCAGGAGAu'CGGCAAGGCCACCGCCAA Gu'ACu'u'Cu'u'Cu'ACAGCAACAu'CAu'GAACu'u'Cu'u'CAAGACCGAGAu 'CACCCu'GGCCAACGGCGAGAu'CCGGAAGGCCCCCCCu'GAu'CGAGAC AAACGGCGAGACAGGCGAGAu'CGu'Gu'GGGACAAGGGCCGGGACu'u' CGCCACCGu'GCGGAAGGu'GCu'GAGCAu'GCCCCAGGu'GAACAu'CGu' GAAGAAGACCGAGGu'GCAGACCGGCGGGu'u'CAGCAAGGAGAGCAu'C Cu'GCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCu'GAu'CGCCCGGAAGAAGGACu' GGGACCCCAAGAAGu'ACGGCGGGu'u'CGACAGCCCCACCGu'GGCCu'A CAGCGu'GCu'GGu'GGu'GGCCAAGGu'GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAA GCu'CAAGAGCGu'GAAGGAGCu'GCu'GGGCAu'CACCAu'CAu'GGAGCG GAGCAGCu'u'CGAGAAGAACCCCAu'CGACu'u'CCu'GGAGGCCAAGGGC u'ACAAGGAGGu'GAAGAAGGACCu'GAu'CAu'CAAGCu'GCCCAAGu'AC AGCCu'Gu'u'CGAGCu'GGAGAACGGCCGGAAGCGGAu'GCu'GGCCAGC GCCGCGAGCu'GCAGAAGGGCAACGAGCu'GGCCCu'GCCAGCAAGu' ACGu'GAACu'u'CCu'Gu'ACCu'GGCCAGCCACu'ACGAGAAGCu'GAAGG GCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCu'Gu'u'CGu'GGAGCAGCA CAAGCACu'ACCu'GGACGAGAu'CAu'CGAGCAGAu'CAGCGAGu'u'CAG CAAGCGGGu'GAu'CCu'GGCCGACGCCAACCu'GGACAAGGu'GCu'GAGC GCCu'ACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAu'CCGGGAGCAGGCCGAGA ACAu'CAu'CCACCu'Gu'u'CACCCu'GACCAACCu'GGGCGCCCCCGCCG Cu'u'CAAGu'ACu'u'CGACACCACCAu'CGACCGGAAGCGGu'ACACCAGC ACCAAGGAGGu'GCu'GGACGCCACCCu'GAu'CCACCAGAGCAu'CACCG GCCu'Gu'ACGAGACACGGAu'CGACCu'GAGCCAGCu'GGGCGGCGACGA GGGCGCCGACAAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGu'u'CGAGAGCCCC AAGAAGAAGCGGAAGGu'Gu'GA	
3'UTR	GCGGCCGGu'u'AAu'u'AAGCu'GCCu'u'Cu'GCGGGGGu'u'GCCu'u'Cu'GGC CAu'GCCCu'u'Cu'u'Cu'CCCu'u'GCACCu'Gu'ACCu'Cu'u'GGu'Cu'u'u'G AAu'AAAGCCu'GAGu'AGGAAGu'Cu'AGA	700
MA067 ア ミノ酸配 列	MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAI GLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRI GRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLCRF FRMPRRVFNAQKKAQSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEE SFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLLI YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDFLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD LAEDAKLQLSKD'TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILR VNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGS IPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPPYYVGPLARGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKS	730

【 0 4 8 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 3】

	LLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN EDILEDIVLTTLFEDREMIEERLKTYYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRL SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEM ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEALYL YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN RGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLV SDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPALESEFVYGD YKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKAPLIE TNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKR NSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEGKSKKLKSVKEL LGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLENGRKRMLA SAGELQKGNELALPSKYVNFYLYASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKH YLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHHRDKPIREQAENIHLFTLTN LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGDE GADKRTADGSEFESPKKKRKV	
化学及び改変は、MA040、MA041、MA045、MA064 MA065、MA066、及び MA067 mRNA を使用した。 - u ¹ =N ¹ -メチルシュードウリジン - 5'UTR 内の第 1 のヌクレオチドは、2'-O-メチル改変を有する - 5'UTR 内の第 1 のヌクレオチドは、5'-5'三リン酸架橋を介して 7-メチルグアノシンヌクレオチドに連結される - mRNA は、3'ポリ A 領域を有する		

10

20

【0482】

実施例 8. gRNA バリエント

[0517] 例示的な PCSK9 ガイド RNA バリエントを表 3 に示す。追加の例示的な PCSK9 ガイド RNA バリエントは、PCT 出願公開第 WO 2021 / 207712 号において見出すことができ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。それらの PCSK9 ガイドのオンターゲット編集効率を図 21 ~ 図 23 に示す。

30

【0483】

[0518] 例示的な ANGPTL3 ガイド RNA バリエントを表 3 及び表 8 に示す。追加の例示的な ANGPTL3 ガイド RNA バリエントは、PCT 出願公開第 WO 2021 / 207712 号において見出すことができ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。バリエント ANGPTL3 ガイドのオンターゲット編集効率を図 17 及び図 18 に示す。

40

【0484】

[0519] 編集された細胞 (HuH-7s) の増殖の評価:

[0520] 前述のように、例示的な gRNA 及び ABE mRNA のインビトロでの有効性を、細胞をトランスフェクトし、特定の濃度でトランスフェクトし、トランスフェクト後 (3 日目) に細胞を収集し、前述のように PCR 及び配列決定を使用して編集割合を分析することによって評価した。

【0485】

50

【表 3 - 1】

表 3. ネブラリン(E)及びイノシン(I/I)改変を有する GA347 プロトスペーサー

遺伝子 標的	gRNA ID	プロトスペー サー (5'-3')	配列 番号	配列(5'-3')	配列 番号
cANGP TL3	GA539	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasgsAUXCCUGAAUAACCCUCgUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	757
cANGP TL3	GA540	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasgsAUXCCUGXAUAACCCUCgUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	758
cANGP TL3	GA541	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasgsAUXCCUGAAUAACCCUCgUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	759
cANGP TL3	GA542	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasgsAUXCCUGXAUXACCCUCgUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	760
cANGP TL3	GA543	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasgsXUXCCUGAAUAACCCUCgUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	761
cANGP TL3	GA544	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasgsXUXCCUGAAUAACCCUCgUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	762
cANGP TL3	GA545	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasgsXUACCUGAAUAACCCUCgUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	763
cANGP TL3	GA546	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasgsAUACCUGXAUAACCCUCgUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	764
cANGP TL3	GA548	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasgsAUACCUGEAUAXCCUCgUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	765
cANGP TL3	GA549	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasgsAUXCCUGAAUAACCCUCgUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	759
cANGP TL3	GA613	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasisAUACCUGAAUAACUCUCgUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	766

【 0 4 8 6 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

cANGP TL3	GA614	AAGATACC TGAATAAC TCTC	177	asasisAUACCUIAAUAAACUCUCgUUUUAGa gcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu su	767

大文字のヌクレオチド(A、G、C、I、及びT)は、それぞれ、2'-デオキシリボヌクレオチドであるアデニン、グアニン、シトシン、イノシン、及びチミンを示し、ガイド RNA 配列では、大文字のヌクレオチド(A、C、G、I、及びU)は、それぞれ、リボヌクレオチドであるアデニン、グアニン、シトシン、イノシン、及びウラシルを示し、小文字のヌクレオチド(a、g、c、i、及びu)は、別途指定されない限り、2'-O-メチルリボヌクレオチド(2'-OMe)を示す。X は、ネブラリンである。DNA プロトスペーサーは、ガイド RNA:ホスホロチオエート(PS)において RNA 又は RNA 等価物に変換されることを理解されたい。

【0487】

実施例 9. ヒト投薬 (ABE MA004、GA346、イオン化可能なアミノ脂質及びPEG脂質を含むLNP中に封入された1:1のmRNA:RNA重量比)

[0521]イオン化可能なアミノ脂質、PEG脂質、及びMA-004のヒト薬物動態(PK)パラメータ(すなわち、定常状態におけるクリアランス[CL]及び分布体積[Vss])を、カニクイザルにおけるPKパラメータに基づいて、それぞれCL及びVssの指数として0.75及び1のアロメトリックスケーリングを使用して予測した。カニクイザルに、0.5~2.5mg/kgの範囲の全RNA用量を投与した。この用量範囲内では、PKパラメータは、比較的一定であった。段階的注入を使用した異なる全RNA用量後のヒトにおける濃度対時間プロファイル、1コンパートメントモデルを使用してシミュレートし、Berkeley Madonna(登録商標)バージョン8.3.18をシミュレーションに使用した。ヒトにおける予測血漿最大濃度(Cmax)を、濃度対時間プロファイルに基づいて得た。ヒトにおいて予測された時間0から無限大までの血漿濃度-時間曲線下の面積(AUCinf)を、予測CL値に対する分析物用量の比として計算した。

【0488】

[0522]カニクイザルにおける定常状態でのイオン化可能なアミノ脂質AUCinf(単回投与後)とPCSK9減少%との関係を、阻害性Imax関数を使用して分析し、R Software Version 3.6.1及びRStudio Version 1.2.5001を、フィッティング及びプロットングに使用した。阻害性Imax関数に基づいて、カニクイザルにおける最大阻害の50%(AUC50)に関連するイオン化可能なアミノ脂質AUCinf値を推定した。このAUC50値を使用して、ABE mRNA MA004及びガイドRNA GA346がカニクイザルとヒトとの間で等しい効力であると仮定して、ヒトPCSK9の減少を予測した。あるいは、ABE mRNA MA004及びガイドRNA GA346がヒトにおいてカニクイザルよりも3倍大きな効力であると仮定して、このAUC50値を3で割った後、初代カニクイザル肝細胞(PCH)及び初代ヒト肝細胞(PHH)におけるABE mRNA MA004及びガイドRNA GA346のインビトロ試験結果に基づいて、ヒトPCSK9の減少を予測した。いずれかのシナリオ(等しい効力又は効力の3倍の差)を用い、ヒトにおいて予測されたイオン化可能なアミノ脂質AUCinf値を使用して、異なる全RNA用量後の定常状態でのPCSK9減少%を予測した。

【0489】

[0523]血漿中のイオン化可能なアミノ脂質AUCを、血漿中のABE mRNA MA004及びガイドRNA GA346曝露により構築されたLNP、究極的には、編集が行われる肝臓中のABE mRNA MA004及びガイドRNA GA346曝露により構築されたLNPの代理物として使用した。

【0490】

【0524】イオン化可能なアミノ脂質曝露（血漿濃度－時間曲線下の面積〔AUC〕）とPCSK9減少割合との間の関係を、NHPにおいて特性決定した。様々な用量レベルでのヒトにおける薬理学的活性を推定するために、ヒトにおけるイオン化可能なアミノ脂質曝露（AUC）を、アロメトリックスケーリングを使用して予測し、続いてPCSK9減少の割合を推定した。図24及び25の表は、様々な用量でヒトについて予測されるCmax、AUC、及び効力を示す。ここに示されるように、0.1mg/kgの全RNA用量は、75kgの体重の参加者において、（1倍～3倍の効力係数を考慮して）およそ54.4%～75.8%のPCSK9減少を示すと推定される。PCSK9に対する体重の効果（45kg～100kgの範囲にわたる）は、所与のmg/kgの全RNA用量に対して最小限であると予測された（75kgに対して絶対差≤3%）。図25の表に示されるように、0.8mg/kgの全RNA用量は、75kgの体重の参加者において、（1倍～3倍の効力係数を考慮して）およそ86.5%～91.8%のPCSK9減少を示すと推定される。2mg/kgで投与されたNHPモデルで観察されたものと比較した予測Cmax及びAUCレベルを図24の表に示す。

10

【0491】

実施例10. 初代ヒト肝細胞（PHH）におけるオンターゲット及びオフターゲット編集率

【0525】この実施例は、PHH細胞におけるANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー領域の位置6又は位置1～10のいずれかでのANGPTL3遺伝子のオンターゲット編集割合を評価するためのスペーサー配列（sgRNA）を含むガイド核酸の使用を示す（図29～図30）。

20

【0492】

【0526】最小限の改変tracrRNAを有する20個のsgRNAスペーサー配列バリエーション（GA675～GA694、配列番号72、75、79、83、86、89、93、96、98、100、102、106、110、114、116、120、124、128、132、136、表7）を、プロトコルMessengerMax（商標）に従って、mRNA MA079とともにPHH細胞（ロットSTL）にトランスフェクトした。「最小限の改変tracrRNA」という用語は、配列GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu（配列番号3）のtracrRNAを指す。対照群は、（a）mRNA MA004でトランスフェクトされたgRNA GA441（2'-OMe濃縮されたtracrRNA）、及び（b）mRNA MA079でトランスフェクトされたgRNA GA441（2'-OMe濃縮されたtracrRNA）であった。「2'-OMe濃縮されたtracrRNA」という用語は、gUUUUAGagcuaGaaauagcaagUUaAaAuAaggcuagUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcusususu（配列番号4）の配列のtracrを指す。全RNAの用量は、5,000ng/mL、2,500ng/mL、1,250ng/mL、及び625ng/mLであった。オンターゲットプライマー（GA0100_OT_B1）を使用して、標的化アンプリコン配列決定によって、ANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー領域の位置1～10における編集割合（A>G）を測定した。技術的複製を行った。Nは、配列決定データ内のこの位置で検出された任意の非Aヌクレオチドを指す。

30

40

【0493】

【0527】20個のsgRNAスペーサー配列バリエーションのうちの1つでトランスフェクトされたPHH細胞由来のゲノムDNAを、標的化アンプリコン配列決定によってオフターゲット編集割合についても試験した（図31～図32）。評価したゲノムDNA試料は、5,000ng/mL及び2,500ng/mLの全RNAの用量を受けた細胞由来のものであった。OT1プライマー（GA0100_OT_B2）を使用して、OT1部位の位置1～10における編集割合（A>G）を測定した（表4）。技術的複製を行った

50

。結果は、s g R D N A スペーサー配列の大部分が O T 1 に結合しておらず、及び／又は O T 1 で編集していないことを示唆している。O T 1 で実際に編集されたスペーサー配列を含む s g R D N A の残り（G A 6 8 0、G A 6 8 9、G A 6 9 0、G A 6 8 7）について、それらの約 7 5 % は、2 ～ 3 個の D N A 塩基のみを有する。

【 0 4 9 4 】

【 表 4 】

表 4 オフターゲット部位（O T 1）に関する情報

部位 ID	アラインメント	VEP 遺伝子	VEP 結果	CADD スコア	COSMIC
Chr8_66947473_(+)	RNA21	TCF24	3'UTR、下流遺伝子	6.92	なし

10

【 0 4 9 5 】

【 0 5 2 9 】表 4 は、実験で評価されたオフターゲット部位（O T 1）に関する情報を示す。アラインメントは、O T 1 が、オンターゲットプロトスペーサー配列とはどのように異なっているかを示し、2 つのミスマッチ及び 1 つの R N A バルジが存在し、これは、ゲノム配列が g R N A の c r R N A 配列に関して欠失を含有するときに生じる（すなわち、ゲノム配列において対合ヌクレオチドの欠損が存在する）。V E P 遺伝子及び V E P 結果は、E n s e m b l V a r i a n t E f f e c t P r e d i c t o r（V E P）ツール v 9 8 . 3 によって決定される場合の O T 1 のゲノム位置及び機能的役割を指す。E n s e m b l V E P は、ヒトゲノムについて、転写モデル、調節特徴、及びバリエーションを含むゲノムアノテーションの広範な集合を使用して、ゲノムバリエーションの分析、アノテーション及び解釈、又はこの場合には、ゲノムのタンパク質コード領域及び非タンパク質コード領域の両方における仮説的編集を可能にする。C A D D スコアは、多様なアノテーションを単一の尺度に統合することによってヒトの遺伝的差異をアノテーションし、解釈することを目的とした C o m b i n e d A n n o t a t i o n - D e p e n d e n t D e p l e t i o n v 1 . 6（C A D D）フレームワークを使用して決定された。C A D D スコアを使用して、細胞機能に対するオフターゲット部位での編集の機能的影響を評価することができ、1 0 以上の P h r e d スケール C A D D スコアは、その部位での編集が機能的効果を有する可能性の上位 1 0 % 内にあることを示す。したがって、6 . 9 2 の C A D D スコアは、O T 1 での編集が機能的な結果を有する可能性が高くはないことを示唆している。オフターゲット部位での編集に起因するがん発生の可能性をバイオインフォマティクスのために、O T 1 が、C a n c e r G e n e C e n s u s o f t h e C a t a l o g u e o f S o m a t i c M u t a t i o n s i n C a n c e r（C O S M I C）v 9 2 の遺伝子内に位置しているかどうかを評価した。その遺伝子内に位置していない。

20

30

【 0 4 9 6 】

【 0 5 3 0 】最小限の改変 t r a c r R N A を有する追加の 2 1 個の s g R D N A スペーサー配列バリエーション（G A 6 9 5 ～ G A 7 1 5、表 7）を、M e s s e n g e r M a x（商標）のプロトコルに従って、m R N A M A 0 7 9 とともに P H H 細胞（ロット S T L）にトランスフェクトした。対照群は、（a）m R N A M A 0 0 4 でトランスフェクトされた g R N A G A 4 4 1（2' - O M e 濃縮された t r a c r R N A）、及び（b）m R N A M A 0 7 9 でトランスフェクトされた g R N A G A 4 4 1（2' - O M e 濃縮された t r a c r R N A）であった。全 R N A の用量は、5, 0 0 0 n g / m L 及び 2, 5 0 0 n g / m L であった。オンターゲットプライマー（G A 0 1 0 0 _ O T _ B 1）を使用して、標的化アンプリコン配列決定によって、A N G P T L 3 遺伝子のプロトスペーサー領域の位置 6 における編集割合（A > N）を測定した。技術的複製を行った（図 3 3 は、この試験のデータを示す）。

40

【 0 4 9 7 】

【 0 5 3 1 】最小限の改変 t r a c r R N A を有する 1 6 個の s g R D N A スペーサー配列

50

バリエーション (GA675、GA677、GA678、GA680、GA682、GA683、GA685、GA686、GA687、GA688、GA689、GA690、GA691、GA692、GA693、GA694) を選択し、MessengerMax (商標) のプロトコルに従って、mRNA MA079とともにPHH細胞 (ロットIRZ) にトランスフェクトした。対照群は、mRNA MA079でトランスフェクトされたgRNA GA441 (2'-OMe濃縮されたtracrRNA) であった。全RNAの用量は、5,000 ng/mLであった。オンターゲットプライマー (GA0100_OT_B1) を使用して、ANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー領域の位置1~10における編集割合 (A>G) を測定した。OT1プライマー (GA0100_OT_B2) 及びOT3プライマー (GA0100_OT_B6) を使用して、オフターゲット部位の位置1~10におけるオフターゲット編集割合 (A>G) を測定した。技術的複製を行った (図34は、この試験からのデータを示す) 。

10

【0498】

[0532] 16個のsgRNAスペーサー配列バリエーションでトランスフェクトされたPHH細胞由来のゲノムDNAを、SureSelectのプロトコルに従って、オフターゲット編集について更に試験した (図35A~図35B)。図35Aについて、SureSelectアッセイのためのインプットDNAは、50 ngであり、GA441を用いてONE-seqに由来する611個の候補オフターゲット部位を標的とするRNAプローブのパネルを使用した。図35Bについて、標的化アンプリコンを独立して評価に使用しなかった。別の実験では、最小限の改変tracrRNAを有する10個の上位sgRNAスペーサー配列バリエーションを選択し、MessengerMax (商標) のプロトコルに従って、PHH細胞 (ロットIRZ) においてMA079でトランスフェクトした。対照群は、MA079でトランスフェクトされたgRNA GA441 (2'-OMe濃縮されたtracrRNA) であった。SureSelectアッセイのためのインプットDNAは、150 ngであり、GA441を用いてONE-seqに由来する611個の候補オフターゲット部位を標的とするRNAプローブのパネルを使用した。プロットは、有意な部位の正味の編集割合 (非調整 $p_{val} < 0.05$) を示し、オンターゲット効力の順に並べられている。

20

【0499】

[0533] 最小限の改変tracrRNAを有するスペーサー配列バリエーションを含む16個のsgRNAを選択し、2つの別個の実験におけるLNPトランスフェクションによって、PHH細胞 (ロットIRZ) においてGalNAc LNPによってトランスフェクトした。対照群は、gRNA GA441 (2'-OMe濃縮されたtracrRNA) 及びMA079を含有する2つの異なるGalNAc LNPであった。用量は、1つの実験で5,000 ng/TA/mL、他の実験で10,000 ng/TA/mLであった。オンターゲットプライマー (GA0100_OT_B1) を使用して、標的化アンプリコン配列決定によって、ANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー領域の位置1~10における編集割合 (A>G) を測定した。技術的複製を行った (図36Aは、この試験からのデータを示す) 。

30

【0500】

[0534] 表5は、図36A、図36B、図37、図39A、図39B、図40、図41A及び図41Bに記載されるLNPトランスフェクションインビトロデータを生成するために使用されたLNP製剤を示す。

40

【0501】

50

【表 5】

表 5. LNP 製剤

重量による全 RNA ペイロード 1:1		LNP 組成:アミノ脂質(502)/コレステロール/DSPC/PEG-脂質 (507)/GalNAc-脂質(1004)(参考:US11207416B2、その全体 が参照により本明細書に組み込まれる)				
gRNA	mRNA	製剤 ID	サイズ	封入%	PDI(多分散指数)	
GA441	MA079	VF1155	62.25	99.4	0.0280	2'-OMe 濃縮 された tracr
GA441	MA079	VF1272	66.68	99.2	0.0073	
GA441	MA079	VF1313	71.55	99.5	0.0441	
GA091	MA079	VF1321	72.43	99.5	0.0573	最小限の改変 tracr
GA675	MA079	VF1273	66.51	99.2	0.0555	
GA677	MA079	VF1274	67.7	99.3	0.0353	
GA677	MA079	VF1312	72.06	99.5	0.0278	
GA678	MA079	VF1275	66.32	99.1	0.0347	
GA680	MA079	VF1280	66.3	99.4	0.0335	
GA682	MA079	VF1276	67.67	99.2	0.0251	
GA682	MA079	VF1314	71.8	99.5	0.0534	
GA683	MA079	VF1281	66.08	99.4	0.0423	
GA685	MA079	VF1282	64.63	99.5	0.0206	
GA686	MA079	VF1283	64.3	99.5	0.0183	
GA686	MA079	VF1315	71.79	99.4	0.0310	
GA687	MA079	VF1286	66.52	99	0.0028	
GA688	MA079	VF1284	65.15	99.5	0.0201	
GA689	MA079	VF1288	65.11	99.5	0.0433	
GA690	MA079	VF1287	65.76	99.5	0.0064	
GA690	MA079	VF1316	73.57	99.4	0.0255	
GA691	MA079	VF1277	68.04	99.2	0.0385	
GA691	MA079	VF1317	76.99	98.1	0.0658	
GA692	MA079	VF1278	66.03	99.4	0.0306	
GA692	MA079	VF1318	76.44	99.1	0.0330	
GA693	MA079	VF1285	66.07	99.5	0.0250	
GA693	MA079	VF1319	72	99.5	0.0334	
GA694	MA079	VF1279	67.42	99.2	0.0209	
GA694	MA079	VF1320	71.88	99.6	0.0496	
GA837	MA079	VF1542	64.15	99.05	0.06335	

【0502】

【0536】16個のsgRNAスペーサー配列バリエントのうちの1つを含有するLNPでトランスフェクトされたPHH細胞由来のゲノムDNAを、オフターゲット編集について更に試験した(図36B)。10,000ng/TA/mLを投与された試料を、5,000ng/TA/mLを投与された対照群の1つに加えて、評価した。OT1プライマー(GA0100_OT_B2)を使用して、標的化アンプリコン配列決定によって、OT1部位の位置1~10における編集割合(A>G)を測定した。技術的複製を行った。

【0503】

10

20

30

40

50

[0537] 16個のsgRNAスペーサー配列バリエーションを有するLNPによってトランスフェクトされたPHH細胞由来のゲノムDNAを、SureSelectのプロトコルに従って、オフターゲット編集について更に試験した（図37は、この試験からのデータを示す）。同じゲノムDNA試料を標的化アンプリコンに使用した。インプットDNAは、100ngであり、611個の候補オフターゲット部位のRNAプローブのパネルは、GA441を用いたONE-seqに由来していた。プロットは、有意な部位の正味の編集割合（非調整 $p_{val} < 0.05$ ）を示し、オンターゲット効力の順に並べられている。

【0504】

[0538] 図38A及び図39Aは、上位のsgRNAスペーサー配列バリエーションのSureSelectデータのサブセットを提供し、対応する標的化アンプリコンデータは、図38B及び図39Bの中にある。図38A～図38BのPHH細胞をLNPによってトランスフェクトし、図39A～図39BのPHH細胞をMessengerMax（商標）によってトランスフェクトした。これらの結果は、選択されたスペーサー配列が、高いオンターゲット編集を達成することができるが、低いオフターゲット編集を達成することができることを一貫して示している。

【0505】

実施例11. PHHにおけるオンターゲット編集及びオフターゲット編集のためのLNP用量応答曲線

[0539] LNPは、（1）個々のペイロードのためにある程度最適化された、製造業者のプロトコルに従うPrecision Nanosystems NanoAssemblerシステムを使用したマイクロ流体混合によって、又は（2）有機溶媒中の脂質賦形剤の溶液及びgRNA及びmRNAの水溶液の急速なインライン混合のいずれかによって、生成された。脂質溶液は、一般に、4つの製剤賦形剤、すなわち、エタノール中、所定のモル比で混合された、アミノ脂質、PEG-脂質と呼ばれる脂質にコンジュゲートされた平均分子量2000Daのポリエチレングリコール、コレステロール、及び1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）、及びGalNAc-脂質1004（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるUS11207416 B2に記載される）の混合物から構成される。LNP組成物は、40～65%のアミノ脂質、2～20%のDSPC、1～5%のPEG-脂質、及び0.01～1%のGalNAc-脂質を含み、残りはコレステロール（全てモル%）であった。別途指定されない限り、RNA水溶液は、所望のmRNAとガイドRNA（gRNA）との1：1重量比の混合物を含有する。次いで、所望のmRNAからgRNAへの水溶液を、マイクロ流体又は急速インライン混合によって、エタノール中の脂質賦形剤と混合した。報告されたNHP試験のための全てのLNPは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるWO2022/060871A1及びUS11207416B2に記載されるインライン混合プロトコルに従うことによって調製された。

【0506】

[0540] 最小限の改変tracrRNAを有するスペーサー配列を含む16個の異なるgRNAを異なるLNP中で製剤化し（表5）、異なる用量でPHH細胞（ロットIRZ）にトランスフェクションして、LNP用量応答を評価した。用量には、10,000ng/TA/mL、5,000ng/TA/mL、2,500ng/TA/mL、1,250ng/TA/mL、625ng/TA/mL、及び312.5ng/TA/mLが含まれていた。

【0507】

[0541] 最小限の改変tracrRNAを有する8個のgRNAスペーサー配列バリエーション、又は対照、（a）最小限の改変tracrRNAを有するGA091及び（b）2'-OMe濃縮されたtracrRNAを有するGA441、及びmRNA MA079のいずれかを含有する、GalNAc-LNPの2つの異なるバッチを製剤化し、PHH細胞（ロットIRZ）にトランスフェクトした。用量には、10,000ng/TA/

mL、5,000 ng/mL TA/mL、2,500 ng/mL TA/mL、1,250 ng/mL TA/mL、625 ng/mL TA/mL、及び312.5 ng/mL TA/mLであった。オンターゲットプライマー（GA0100_OT_B1）を使用して、標的化アンプリコン配列決定によって、ANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー領域の位置6における編集割合（A>N）を測定した（図40）。OT1プライマー（GA0100_OT_B2）及びOT3プライマー（GA0100_OT_B6）を使用して、オフターゲット部位の位置1～10におけるオフターゲット編集割合（A>G）を測定した（図41A～図41B）。

【0508】

[0542] スペーサー配列及び2'-OMe濃縮されたtracrRNAをmRNA MA 10
079とともに含むgRDNAである、ガイドGA837を含有するGalNAc-LNPを製剤化し、4名の異なるドナー由来のPHH細胞（GNA、IRZ、LFQ、NFX）にトランスフェクトした。用量は、45,000 ng/mL TA/mL、30,000 ng/mL TA/mL、20,000 ng/mL TA/mL、13,333 ng/mL TA/mL、8,889 ng/mL TA/mL、4,444 ng/mL TA/mL、2,222 ng/mL TA/mL、1,111 ng/mL TA/mL、556 ng/mL TA/mL、278 ng/mL TA/mL、139 ng/mL TA/mL及び69 ng/mL TA/mLであった。オンターゲットプライマー（GA0100_OT_B1）を使用して、標的化アンプリコン配列決定によって、ANGPTL3遺伝子のプロトスペーサー領域の位置6における編集割合（A>N）を測定した（図42）。 20

【0509】

[0543] gRDNAが構造バリエーション（SV）を導入する可能性の評価は、オフターゲット編集リスクと遺伝毒性との間のつながりにある。核型決定を使用して、SVの存在及び染色体異常誘発能を評価することができるが、それは、解像度が低い低スループットの視覚的アッセイである。Xによる変異誘発及び染色体異常誘発能の欠如を確認するために、Bionano Saphyr optical genome mapping (OGM) 方法（Bionano Genomics, 2020、Cao et al., 2014; Mak et al., 2016）を使用して、ゲノム全体に基づいてSVの何らかの証拠について評価した。OGMは、核型決定に類似した新しいイメージングベースのアプローチであるが、全ゲノムカバレッジ>1200倍に基づいて、より高い感度とは 30
るかに高い解像度で行われた。責任者は、1200倍を超える有効ゲノムカバレッジを有する画像データを使用して、5% VAFでの欠失及び1% VAFでの挿入のおよそ90%の検出率を示した。

【0510】

[0544] 20,000 ng/mL TA/mLの用量でLNP VF1542でトランスフェクトされたPHH細胞（ロットIRZ）からのゲノムDNAを、プライマーGA0100_OT_B1を使用して、オンターゲット編集について評価した（図43A）。次いで、このゲノムDNAをOGMによって分析した。未治療試料及び治療試料からの全てのSVカテゴリーにわたる全事象（挿入、重複、欠失、反転、及び転座）を合計し、Circosプロットとしてプロットした。未治療対照試料中に存在する治療試料からのSVの減算 40
は、残存SVをもたらさなかった（すなわち、VF1542による治療後にSVが生成されなかった）（図43B）。

【0511】

実施例12. 初代カニクイザル肝細胞（PCH）におけるオンターゲット及びオフターゲット編集率

[0545] 次に、sgRDNAスペーサー配列による肝臓ANGPTL3編集を、初代カニクイザル肝細胞（PCH）において測定した。結果は、LNP治療されたNHPにおける肝臓ANGPTL3編集が、PCHにおける編集と相関することを示唆している（図44～図45）。

【0512】

10

20

30

40

50

実施例 13. 非ヒト霊長類（NHP）における治療

【0546】2つのNHP試験は、同じスパーサー配列及びmRNA MA004又はMA079を含むスパーサー改変ガイド核酸の2つの選択されたセットで構成されるLNPを使用して実施した。LNPを実施例2に記載のように製剤化した。表6は、NHPにおける投薬（図44、図46及び図47に記載）及びPCH細胞株のトランスフェクション（図45に記載）に使用されるLNP製剤を示す。製剤、gRNA及びmRNA IDの後に続く小数点の後ろの3桁は、それぞれの製剤、gRNA及びmRNAのロット又はバッチ番号を示す。

【0513】

【表6-1】

10

表6. LNP製剤化

LNP 試験 物品	重量による全 RNA ペイロード 1:1		LNP 組成:アミノ脂質(502)/コレステロール /DSPC/PEG-脂質(507)/GalNAc-脂質(1004)(参 考:US11207416B2、その全体が参照により本明細 書に組み込まれる)				試験
	カニク イザル gRNA	mRNA	製剤	サイズ	封入%	PDI	
	GA347	MA079	VF1355	67.92	98.4	0.08996	PCH インビトロ トランスフェク ション
LNP 1	GA347	MA004	VF1185	64.42	98.9	0.05933	PCH インビトロ トランスフェク ション、NHP 試験 1
	GA347	MA079	VF1365	70.87	99.0	0.01249	PCH インビトロ トランスフェク ション
LNP 1	GA347	MA079	VF1371	64.76	98.9	0.05064	NHP 試験 2
	GA748	MA079	VF1366	82.78	97.5	0.01597	PCH インビトロ トランスフェク ション
LNP 7	GA748	MA079	VF1372	64.09	99.0	0.04973	NHP 試験 2
	GA749	MA079	VF1367	68.27	99.2	0.02219	PCH インビトロ トランスフェク ション
LNP 8	GA749	MA079	VF1373	66.40	99.2	0.04976	NHP 試験 2
LNP 2	GA663	MA004	VF1215	65.40	99.1	0.0075	PCH インビトロ トランスフェク ション、NHP 試験 1
	GA663	MA079	VF1368	73.19	99.3	0.04705	PCH インビトロ トランスフェク ション
	GA663	MA079	VF1374	65.54	99.1	0.002	PCH インビトロ トランスフェク ション

20

30

40

50

【0514】

【表6-2】

LNP 4	GA668	MA004	VF1230	61.18	99.0	0.072	PCH インビトロ トランスフェク ション、NHP 試験 1
	GA668	MA079	VF1369	69.01	98.9	0.006209	PCH インビトロ トランスフェク ション
LNP 4	GA668	MA079	VF1375	63.67	99.4	0.009886	NHP 試験 2
	GA747	MA079	VF1370	67.61	99.2	0.0408	PCH インビトロ トランスフェク ション
	GA747	MA079	VF1376	68.69	99.1	0.01766	PCH インビトロ トランスフェク ション
LNP 3	GA666	MA004	VF1219	63.99	99.1	0.06683	PCH インビトロ トランスフェク ション、NHP 試験 1
LNP 5	GA665	MA004	VF1237	60.11	99.2	0.02243	PCH インビトロ トランスフェク ション、NHP 試験 1
LNP 6	GA720	MA004	VF1240	61.03	99.3	0.01343	PCH インビトロ トランスフェク ション、NHP 試験 1

【0515】

【0548】第1の試験では、カンボジア由来の雌カニクイザルを試験動物として使用した。3匹のサルにLNP1（GA347）を投与し、3匹のサルにLNP2（GA663）を投与し、3匹のサルにLNP3（GA666）を投与し、3匹のサルにLNP4（GA668）を投与し、3匹のサルにLNP5（GA665）を投与し、3匹のサルにLNP6（GA720）を、試験1日目に、動物の体重1kg当たりsgRNA及びmRNAを組み合わせた2mgの用量レベルで、6mL/kg（n=3/群）の用量体積での単回IV注入によって投与した。ベースライン測定のために投与前に全ての動物から血液試料を予め収集し、1日目～15日目の様々な時点で投与後に集め、バイオマーカー及び血清安全性パラメータを評価した。16日目に、全ての動物で剖検を行った。肝臓生検試料を収集し、ANGPTL3遺伝子編集を評価した。

【0516】

【0549】第2の試験では、カンボジア由来の雌カニクイザルを試験動物として使用した。3匹のサルに、2mg/kgの用量レベルでLNP1（GA347）を投与し、2つ群のサル（n=3/群）に、2mg/kgの用量レベル又は4mg/kgの用量レベルでLNP7（GA748）を投与し、3匹のサルに、LNP4（GA668）を投与し、3つ

の群のサルに、それぞれ、2、3、及び4 mg / kg の用量レベルで L N P 8 (G A 7 4 9) を投与した。全ての L N P を、試験の1日目に、動物体重1 kg 当たりの s g R N A 及び m R N A の組み合わせの示される用量レベルで、6 mL / kg の用量体積で、単回 I V 注入によって投与した。ベースライン測定のために投与前に全ての動物から血液試料を予め収集し、1日目～15日目の様々な時点で投与後に集め、バイオマーカー及び血清安全性パラメータを評価した。16日目に、全ての動物で剖検を行った。肝臓生検試料を収集し、A N G P T L 3 遺伝子編集を評価した。

【0517】

[0550] 肝臓における遺伝子編集の程度は、以前に記載された方法 (M u s u n u r u e t a l , N a t u r e 5 9 3 , n o . 7 8 5 9 (M a y 2 0 2 1) : 4 2 9 - 3 4 . <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03534-y>) を使用して、動物の肝臓から抽出されたゲノム DNA に由来する種特異的プライマー c A N _ E x 6 _ 3 _ N E X T _ F 1 を使用して、A N G P T L 3 標的部位において標的カポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) アンプリコンの次世代配列決定 (N G S) (標的化アンプリコン配列決定) によって評価した。編集率は、標的アデニンにおいて非参照対立遺伝子を含む全てのリードの率として報告された。

10

【0518】

[0551] A N G P T L 3 タンパク質分析のために、L N P 注入前の - 1 0 日目、- 7 日目、- 5 日目、及び L N P 注入後の 8 日目及び 1 5 日目に、全ての動物から血清を収集した。図 4 7 に示される 1 5 日目の試料の分析から得られたデータを用いて、A N G P T L 3 サンドイッチ E L I S A を使用して、A N G P T L 3 タンパク質レベルを定量化した。- 1 0 日目、- 7 日目、及び - 5 日目の値を平均して、ベースライン値を得た。

20

【0519】

[0552] N H P カニクイザルの結果は、本明細書に開示されるスパーサー配列を含むガイド核酸配列が、注射後 1 5 日目の肝臓における標的アンプリコン配列決定によって、A N G P L 3 遺伝子のプロトスパーサー領域の位置 6 で 5 4 % 以上の編集 (A > N) を達成することができたことを示している (図 4 6) 。注射後 1 5 日目に、ベースラインと比較して血漿 A N G P T L 3 タンパク質の 9 0 % を超える減少が存在した (図 4 7) 。

【0520】

[0553] ヒト A N G P T L 3 遺伝子を標的とするスパーサー配列、並びにカニクイザル A N G P T L 3 遺伝子を標的とする対応する配列を含むスパーサー配列及びガイド核酸配列が、表 7 に提供される。

30

【0521】

40

50

【表 7 - 1】

表 7 : ANGPTL3 遺伝子を標的とするガイド RNA (gRNA) 及びスパーサー配列対

種	gRDNA ID	スパーサー配列	配列番号	gRDNA 配列	配列番号
ヒト(1)	GA091	asasgsAUAC CUGAAUA ACCCUC	5	asasgsAUACCUGAAUAACCCUCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUUUAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCUsususu	69
	GA441			asasgsAUACCUGAAUAACCCUCgUUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu	70
サル(1)	なし	asasgsAUAC CUGAAUA ACUCUC	6	N/A	
	GA347			asasgsAUACCUGAAUAACUCUCgUUUUUAG agcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGU UAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcususu	71
ヒト(2)	GA680	asasgsAUAd CCdUGAAd UAACCCU C	7	asasgsAUAdCCdUGAAdUAACCCUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUUUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	72
サル(2)	GA765	asasgsAUAd CCdUGAAd UAACUCU C	8	asasgsAUAdCCdUGAAdUAACUCUCGUUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUUUAA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	73
	GA668			asasgsAUAdCCdUGAAdUAACUCUCgUUUUU AGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUcc GUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcusususu	74
ヒト(3)	GA675	asdAsgsadU dAdCdCdUd GdAAUdAA dCdCdCUC	9	asdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdCdC UCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsusu	75
	GA722			asdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdCdC UCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAa ggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcususususu	76

【 0 5 2 2 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

サル(3)	GA762	asdAsgsadU dAdCdCdUd GdAAUdAA dCdUdCUC	10	asdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdUdC UCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	77
	GA663			asdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdUdC UCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAa ggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	78
ヒト(4)	GA682	asasdGsdAd UdAdCCUG AAUAACC CUC	11	asasdGsdAdUdAdCCUGAAUAACCCUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	79
	GA723			asasdGsdAdUdAdCCUGAAUAACCCUCgUU UUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggu gcususu	80
サル(4)	GA755	asasdGsdAd UdAdCCUG AAUAACU CUC	12	asasdGsdAdUdAdCCUGAAUAACUCUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	81
	GA746			asasdGsdAdUdAdCCUGAAUAACUCUCgUU UUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggu gcususu	82
ヒト(5)	GA683	dAsdAsgsad UdAdCdCd UdGdAAUd AAAdCdCdC UC	13	dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdCd CUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	83
	GA635			dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdCd CUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAu AaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcacc gagucggugcusususu	84
サル(5)	GA766	dAsdAsgsad UdAdCdCd UdGdAAUd AAAdCdUdC	14	dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdUd CUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	85
ヒト(6)	GA678	asdAsdGsdA dUdAdCdCd UdGAAUA ACCCUC	15	asdAsdGsdAdTdAdCdCdTdGAAUAACCCUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	86

【 0 5 2 3 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

サル(6)	GA764	asdAsdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACUCUC	16	asdAsdGsdAdTdAdCdCdTdGAAUAACUCUC GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	87
	GA666			asdAsdGsdAdTdAdCdCdTdGAAUAACUCUC gUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgaguc ggugcusususu	88
ヒト(7)	GA677	asasdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAAdCCdCUd	17	asasdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAAdCCdCUd CGUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	89
	GA629			asasdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAAdCCdCUd CgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUAaAuAag gcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	90
サル(7)	GA763	asasdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAAdCUdCUd	18	asasdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAAdCUdCUd CGUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	91
	GA665			asasdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAAdCUdCUd CgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUAaAuAag gcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	92
ヒト(8)	GA676	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAAdCCdC	19	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAAdCCdC UdCGUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsu susu	93
	GA630			asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAAdCCdC UdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccg agucggugcusususu	94
サル(8)	GA664	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAAdCUdCUd	20	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAAdCUdCUd UdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccg agucggugcusususu	95
ヒト(9)	GA679	dAsdAsdGsdAdUdACdCdUdGdAAUAACCCU	21	dAsdAsdGsdAdUdACdCdUdGdAAUAACCCU CGUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	96

【 0 5 2 4 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

サル(9)	GA667	dAsdAsdGsd AdUdACdC dUdGdAAU AACUCUC	22	dAsdAsdGsdAdUdACdCdUdGdAAUAAACUC UCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAa aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	97
ヒト (10)	GA681	asdAsdGsdA dUdAdCdCd UdGAdAUd AAAdCCdCU dC	23	asdAsdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAAdCCd CUdCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG UUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU usususu	98
	GA669	asdAsdGsdA dUdAdCdCd UdGAdAUd AAAdCUdCU dC	24	asdAsdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAAdCUd CUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAu AaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcacc gagucggugcusususu	99
ヒト (11)	GA684	asasdGsdAd UdAdCdCU GAAUAAC CCUC	25	asasdGsdAdUdAdCdCUGAAUAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCU usususu	100
	GA636			asasdGsdAdUdAdCdCUGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	101
ヒト (12)	GA691	asasgsdAdU dAdCCdUd GAAdUdAA CCCUC	26	asasgsdAdUdAdCCdUdGAAdUdAACCCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU usususu	102
	GA724			asasgsdAdUdAdCCdUdGAAdUdAACCCUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu aGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucg gugcusususu	103
サル (12)	GA757	asasgsdAdU dAdCCdUd GAAdUdAA CUCUC	27	asasgsdAdUdAdCCdUdGAAdUdAACUCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU usususu	104
	GA747			asasgsdAdUdAdCCdUdGAAdUdAACUCUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu aGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucg gugcusususu	105

【 0 5 2 5 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

ヒト (13)	GA692	asasdGsdAU dAdCCUGA AUAACCC UC	28	asasdGsdAUdAdCCUGAAUAACCCUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	106
	GA745			asasdGsdAUdAdCCUGAAUAACCCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGU ccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugc usususu	107
サル (13)	GA758	asasdGsdAU dAdCCUGA AUAACUC UC	29	asasdGsdAUdAdCCUGAAUAACUCUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	108
	GA748			asasdGsdAUdAdCCUGAAUAACUCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGU ccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugc usususu	109
ヒト (14)	GA693	asasdGsdAU dAdCdCUG AAUAACC CUC	30	asasdGsdAUdAdCdCUGAAUAACCCUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	110
	GA837			asasdGsdAUdAdCdCUGAAUAACCCUCgUU UUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggu gcusususu	111
サル (14)	GA759	asasdGsdAU dAdCdCUG AAUAACU CUC	31	asasdGsdAUdAdCdCUGAAUAACUCUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	112
	GA749			asasdGsdAUdAdCdCUGAAUAACUCUCgUU UUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggu gcusususu	113
ヒト (15)	GA690	asasgsAUAC CUdGAAdU AACCdCUC	32	asasgsAUACCUdGAAdUAACCdCUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUUA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	114
	GA642			asasgsAUACCUdGAAdUAACCdCUCgUUUU AGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUcc GUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugc usususu	115

【 0 5 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

ヒト (16)	GA689	asasgsAUdA CCUGAAU AAdCCCUC	33	asasgsAUdACCUGAAUAAdCCCUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	116
	GA641			asasgsAUdACCUGAAUAAdCCCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccG UUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcusu usu	117
サル (16)	GA770	asasgsAUdA CCUGAAU AAdCUCUC	34	asasgsAUdACCUGAAUAAdCUCUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	118
	GA0746			asasgsAUdACCUGAAUAAdCUCUCgUUUU AGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUcc GUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcus ususu	119
ヒト (17)	GA685	asasgsAdUA dCCdUGdA AdUAdAcD CCdUC	35	asasgsAdUAdCCdUGdAAdUAdAcDCCdUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	120
	GA627			asasgsAdUAdCCdUGdAAdUAdAcDCCdUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu aGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucg gugcusususu	121
サル (17)	GA767	asasgsAdUA dCCdUGdA AdUAdAcD UCdUC	36	asasgsAdUAdCCdUGdAAdUAdAcDUCdUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	122
	GA0709			asasgsAdUAdCCdUGdAAdUAdAcDUCdUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu aGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucg gugcusususu	123
ヒト (18)	GA687	asasgsdAdU dAdCdCdUd GAAUAAC CCUC	37	asasgsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	124
	GA639			asasgsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucg ugcusususu	125
サル (18)	GA768	asasgsdAdU dAdCdCdUd GAAUAAC UCUC	38	asasgsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACUCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	126

【 0 5 2 7 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

	GA0664			asasgsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACUCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	127
ヒト (19)	GA686	asasdGsdAd UdAdCdCd UGAAUAA CCCUC	39	asasdGsdAdUdAdCdCdUGAAUAACCCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	128
	GA638			asasdGsdAdUdAdCdCdUGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	129
サル (19)	GA760	asasdGsdAd UdAdCdCd UGAAUAA CUCUC	40	asasdGsdAdUdAdCdCdUGAAUAACUCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	130
	GA750			asasdGsdAdUdAdCdCdUGAAUAACUCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	131
ヒト (20)	GA694	asasdGsdAU dAdCdCdU GAAUAAC CCUC	41	asasdGsdAUdAdCdCdUGAAUAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	132
	GA646			asasdGsdAUdAdCdCdUGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	133
サル (20)	GA761	asasdGsdAU dAdCdCdU GAAUAAC UCUC	42	asasdGsdAUdAdCdCdUGAAUAACUCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	134
	GA751			asasdGsdAUdAdCdCdUGAAUAACUCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	135
ヒト (21)	GA688	asasdGsdAd UdAdCdCd UdGAAUA ACCCUC	43	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACCCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	136
	GA640			asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACCCUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu aGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucg gugcusususu	137

【 0 5 2 8 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 8】

サル (21)	GA769	asasdGsdAd UdAdCdCd UdGAAUA ACUCUC	44	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACUCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	138
	GA0665			asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACUCUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu aGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucg gugcusususu	139
ヒト (22)	GA695	asasdGsdAU dAdCdCdUd GAAUAAC CCUC	45	asasdGsdAUdAdCdCdUdGAAUAACCCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	140
	GA647			asasdGsdAUdAdCdCdUdGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	141
ヒト (23)	GA696	asasdGsdAU AdCdCdUG AAUAACC CUC	46	asasdGsdAUAdCdCdUGAAUAACCCUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	142
	GA648			asasdGsdAUAdCdCdUGAAUAACCCUCgUU UUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggu gcususu	143
ヒト (24)	GA697	asasdGsdAU AdCdCdUd GAAUAAC CCUC	47	asasdGsdAUAdCdCdUdGAAUAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	144
	GA649			asasdGsdAUAdCdCdUdGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcususu	145
ヒト (25)	GA698	asasdGsAdU AdCCdUGA AUAACCC UC	48	asasdGsAdUAdCCdUGAAUAACCCUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	146
	GA650			asasdGsAdUAdCCdUGAAUAACCCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugc ususu	147

10

20

30

40

【 0 5 2 9 】

50

【表 7 - 9】

ヒト (26)	GA699	asasgsdAUd ACdCUdGA AUAACCC UC	49	asasgsdAUdACdCUdGAAUAACCCUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCU _{sususu}	148
	GA651			asasgsdAUdACdCUdGAAUAACCCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGU ccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugc us _{susu}	149
ヒト (27)	GA700	asasgsAUAC CdUGAAdU AACCCUC	50	asasgsAUACdUGAAdUAACCCUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGUGCU _{sususu}	150
	GA652			asasgsAUACdUGAAdUAACCCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccG UUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcusu usu	151
ヒト (28)	GA701	asasgsdAUd ACdCUdGA dAUdAAdC CdCUdC	51	asasgsdAUdACdCUdGAdAUdAAdCCdCUdC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU _{sususu}	152
	GA628			asasgsdAUdACdCUdGAdAUdAAdCCdCUdCg UUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu aGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucg gugcus _{susu}	153
サル (28)	GA0710	asasgsdAUd ACdCUdGA dAUdAAdC UdCUdC	52	asasgsdAUdACdCUdGAdAUdAAdCUdCUdCg UUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu aGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucg gugcus _{susu}	154
ヒト (28)	GA702	asasgsAUAC CUGAdAUd AACCCUC	53	asasgsAUACCUGAdAUdAACCCUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCGGUGCU _{sususu}	155
	GA654			asasgsAUACCUGAdAUdAACCCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccG UUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcusu usu	156
ヒト (29)	GA703	sasdGsAUA dCCUGAdA UdAACCCU C	54	asasdGsAUAdCCUGAdAUdAACCCUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCU _{sususu}	157
	GA655			asasdGsAUAdCCUGAdAUdAACCCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGU ccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugc us _{susu}	158

【 0 5 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 0】

ヒト (29)	GA704	dAsdAsdGsd AdUdAdCd CdUdGAAU AACCCUC	55	dAsdAsdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACCCU CGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsusus u	159
ヒト (30)	GA705	asasgsdAdU dACdCdUd GdAAUAA CCCUC	56	asasgsdAdUdACdCdUdGdAAUAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	160
ヒト (31)	GA706	asdAsgsdAd UdAdCdCU GdAdAUAA CCCUC	57	asdAsgsdAdUdAdCdCUGdAdAUAAACCCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	161
	GA631			asdAsgsdAdUdAdCdCUGdAdAUAAACCCUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcu aGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucg gugcusususu	162
ヒト (32)	GA707	asasdGsdAd UdACdCdU dGdAAUAA CCCUC	58	asasdGsdAdUdACdCdUdGdAAUAACCCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	163
ヒト (33)	GA708	asasgsdAdU dAdCCUGA dAdUAACC CUdC	59	asasgsdAdUdAdCCUGAdAdUAACCCUdCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	164
ヒト (34)	GA709	AsasgsdAdU dAdCCUGA dAdUAACC CUdC	60	dAsasgsdAdUdAdCCUGAdAdUAACCCUdCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	165
ヒト (35)	GA710	dAsasgsdAd UAdCdCdU dGdAAAdUA ACdCCUC	61	dAsasgsdAdUAdCdCdUdGdAAAdUAACdCCU CGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsusus u	166
ヒト (36)	GA711	asasgsdAdU AdCdCdUd GdAAAdUA CdCCUC	62	asasgsdAdUAdCdCdUdGdAAAdUAACdCCUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	167

【 0 5 3 1 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 1】

ヒト (37)	GA712	asasdGsdAd UdACCUGA AUAACCC UC	63	asasdGsdAdUdACCUGAAUAACCCUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUU AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCUususu	168
	GA632			asasdGsdAdUdACCUGAAUAACCCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGU ccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugc ususu	169
サル (37)	GA0749	asasdGsdAd UdACCUGA AUAACUC UC	64	asasdGsdAdUdACCUGAAUAACUCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGU ccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugc ususu	170
ヒト (38)	GA713	asdAsdGsdA dUdACdCU dGAdAUdA AdCCdCUd C	65	asdAsdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAdCCdC UdCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsu susu	171
	GA0666			asdAsdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAdCCdC UdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccg agucggugcusususu	172
サル (38)	GA0711	asdAsdGsdA dUdACdCU dGAdAUdA AdCUdCUd C	66	asdAsdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAdCUdC UdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccg agucggugcusususu	173
ヒト (39)	GA714	dAsdAsgsad UdAdCdCd UdGdAAUd AAdCCdCU C	67	dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAdCCdC UCGUUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUususu su	174
ヒト (39)	GA715	dAsdAsgsad UdAdCdCd UdGdAAUd AACdCCUC	68	dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAACdCCU CGUUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu u	175
	GA633			dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAACdCCU CgUUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAag gcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	176
サル (40)	なし	サルの配列 は設計さ れ、評価さ れていない		なし	

【0532】

【0554】大文字のヌクレオチド（A、C、G、I、及びU）は、それぞれ、リボヌクレオチドであるアデニン、グアニン、シトシン、イノシン、及びウラシルを示し、小文字のヌクレオチド（a、g、c、i、及びu）は、別途指定されない限り、2'-O-メチルリボヌクレオチド（2'-OMe）を示す。dA、dC、及びdGは、2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシシチジン、及び2'-デオキシグアノシンを示し、dUは、チミジン及び／又は2'-デオキシウリジンを示す。gRNA配列の下線は、スパーサー配列を示す。s：ホスホロチオエート（PS）。

【0533】

10

20

30

40

50

【0555】スペーサー配列及びガイド核酸の概要を表8に提供する。

【0534】

【表8-1】

表8. ガイド核酸配列

遺伝子 標的	ガイド 核酸 ID	プロトスペー サー (5'-3')	配列 番号	配列(5'-3')	配列 番号
cANGP TL3	GA547	AAGATACC TGAATAACT CTC	177	asasgsAUACCUGAAUAACUCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususUUu	432
hANGP TL3	GA627	AAGATACC TGAATAAC CCTC	178	asasgsAdUAdCCdUGdAAdUAdACdCCdUC gUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAag gcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccg agucggugcusususu	433
hANGP TL3	GA628	AAGATACC TGAATAAC CCTC	179	asasgsdAUdACdCUdGAdAUdAAdCCdCUd CgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcac cgagucggugcusususu	434
hANGP TL3	GA629	AAGATACC TGAATAAC CCTC	180	asasdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAdCCdC UdCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu	435
hANGP TL3	GA630	AAGATACC TGAATAAC CCTC	181	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAdCCd CUdCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	436
hANGP TL3	GA0631	AAGATACC TGAATAAC CCTC	182	asasgsdAdUdACCUGAAUAACCCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	437
hANGP TL3	GA632	AAGATACC TGAATAAC CCTC	183	asasdGsdAdUdACCUGAAUAACCCUCgUU UUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgaguc ggugcusususu	438
hANGP TL3	GA0633	AAGATACC TGAATAAC CCTC	184	asasgsdAdUdAdCCUGAAUAACCCUCgUU UUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgaguc ggugcusususu	439

【0535】

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

hANGP TL3	GA723	AAGATACC TGAATAAC CCTC	185	asasdGsdAdUdAdCCUGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	440
hANGP TL3	GA0635	AAGATACC TGAATAAC CCTC	186	asasgsdAdUdAdCdCUGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	441
hANGP TL3	GA636	AAGATACC TGAATAAC CCTC	187	asasdGsdAdUdAdCdCUGAAUAACCCUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAagg cuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	442
hANGP TL3	GA0637	AAGATACC TGAATAAC CCTC	188	asasgsdAdUdAdCdCdUGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	443
hANGP TL3	GA638	AAGATACC TGAATAAC CCTC	189	asasdGsdAdUdAdCdCdUGAAUAACCCUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAagg cuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	444
hANGP TL3	GA639	AAGATACC TGAATAAC CCTC	190	asasgsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACCCUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAagg cuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	445
hANGP TL3	GA640	AAGATACC TGAATAAC CCTC	191	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACCCUC gUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAag gcuuGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccg agucggugcusususu	446
hANGP TL3	GA641	AAGATACC TGAATAAC CCTC	192	asasgsAUdACCUGAAUAAdCCCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	447
hANGP TL3	GA642	AAGATACC TGAATAAC CCTC	193	asasgsAUACCUDGAAdUAACCCdCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	448
hANGP TL3	GA643	AAGATACC TGAATAAC CCTC	194	asasgsdAdUdAdCCdUdGAAdUdAACCCUC guuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuagu ccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc usususu	449
hANGP TL3	GA745	AAGATACC TGAATAAC CCTC	195	asasdGsdAUdAdCCUGAAUAACCCUCgUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgaguc ggugcusususu	450
hANGP TL3	GA837	AAGATACC TGAATAAC CCTC	196	asasdGsdAUdAdCdCUGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	451

【 0 5 3 6 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

hANGP TL3	GA646	AAGATACC TGAATAAC CCTC	197	asasdGsdAUdAdCdCdUGAAUAACCCUCg UUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAagg cuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	452
hANGP TL3	GA647	AAGATACC TGAATAAC CCTC	198	asasdGsdAUdAdCdCdUdGAAUAACCCUCg UUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAagg cuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	453
hANGP TL3	GA648	AAGATACC TGAATAAC CCTC	199	asasdGsdAUdAdCdCdUGAAUAACCCUCgU UUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	454
hANGP TL3	GA649	AAGATACC TGAATAAC CCTC	200	asasdGsdAUdAdCdCdUdGAAUAACCCUCg UUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAagg cuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	455
hANGP TL3	GA650	AAGATACC TGAATAAC CCTC	201	asasdGsAdUAdCCdUGAAUAACCCUCgUU UUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgaguc ggugcusususu	456
hANGP TL3	GA651	AAGATACC TGAATAAC CCTC	202	asasgsdAUdACdCUdGAAUAACCCUCgUU UUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgaguc ggugcusususu	457
hANGP TL3	GA652	AAGATACC TGAATAAC CCTC	203	asasgsAUACcdUGAAdUAACCCUCgUUU UAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	458
hANGP TL3	GA653	AAGATACC TGAATAAC CCTC	204	asasdGsAUAdCCdUGAAdUAACCCUCgUU UUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgaguc ggugcusususu	459
hANGP TL3	GA654	AAGATACC TGAATAAC CCTC	205	asasgsAUACcUGAdAUdAACCCUCgUUU UAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	460
hANGP TL3	GA655	AAGATACC TGAATAAC CCTC	206	asasdGsAUAdCCUGAdAUdAACCCUCgUU UUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgaguc ggugcusususu	461
hANGP TL3	GA718	AAGATACC TGAATAAC CCTC	207	asasgsAUA+CCUGAAUAACCCUCgUUUUag agcuagaaaagcaaguuaaaauaaggcuaguccguua caacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	462
hANGP TL3	GA719	AAGATACC TGAATAAC CCTC	208	asasgsAUA+C+CUGAAUAACCCUCgUUUua gagcuagaaaagcaaguuaaaauaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	463

【 0 5 3 7 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 4】

hANGP TL3/cA NGPTL 3	GA670	AAGATACC TGAATAAC CCTC/AAGA TACCTGAAT AACTCTC	209	asasgsAUACCUGAAUAACZCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	464
hANGP TL3	GA671	AAGATACC TGAATAAC CCTC/AAGA TACCTGAAT AACTCTC	210	asasgsAZACCZGAAUAACCCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	465
hANGP TL3/cA NGPTL 3	GA0660	TCGGAAGA TACCTGAAT AACCTCTC/T CGGAAGAT ACCTGAAT AACTCTC	211	ucggasasgsAUACCUGAAZAACZCUCgUU UUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagug cusususu	466
hANGP TL3/cA NGPTL 3	GA673	AAGATACC TGAATAAC CCTC/AAGA TACCTGAAT AACTCTC	212	asasgsAZACCUGAAZAACZCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	467
hANGP TL3/cA NGPTL 3	GA674	AAGATACC TGAATAAC CCTC/AAGA TACCTGAAT AACTCTC	213	asasgsAZACCZGAAUAACZCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	468
cANGP TL3	GA664	AAGATACC TGAATAACT CTC	214	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAAdCUd CUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	469
cANGP TL3	GA0664	AAGATACC TGAATAACT CTC	215	asasgsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACUCUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAagg cuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	470
cANGP TL3	GA0665	AAGATACC TGAATAACT CTC	216	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACUCU CgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcac cgagucggugcusususu	471
cANGP TL3	GA0666	AAGATACC TGAATAACT CTC	217	asdAsdGsdAdUdAdCdCUdGAdAUdAAAdCCd CUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	472
cANGP TL3	GA0667	AAGATACC TGAATAACT CTC	218	asasdGsdAdUdAdCdCUdGAdAUdAAAdCCd CUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	473

【 0 5 3 8 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 5】

hANGP TL3	GA0668	AAGATACC TGAATAAC CCTC	219	asasgsdAdUdACdCUdGAdAUdAAdCCdCU dCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAu AaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGca ccgagucggugcucususu	474
hANGP TL3	GA0669	AAGATACC TGAATAAC CCTC	220	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAUdAAdCC dCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaA aAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcucususu	475
hANGP TL3	GA0670	AAGATACC TGAATAAC CCTC	221	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAAdC CdCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUa AaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaag ugGcaccgagucggugcucususu	476
hANGP TL3	GA0671	AAGATACC TGAATAAC CCTC	222	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAd CCdCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUU aAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa gugGcaccgagucggugcucususu	477
hANGP TL3	GA0672	AAGATACC TGAATAAC CCTC	223	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAd CdCdCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGU UaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa agugGcaccgagucggugcucususu	478
hANGP TL3	GA0673	AAGATACC TGAATAAC CCTC	224	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAd CdCdCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaG UUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaa aaagugGcaccgagucggugcucususu	479
hANGP TL3	GA0674	AAGATACC TGAATAAC CCTC	225	asdAsdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdA dCdCdCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaG UUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaa aaagugGcaccgagucggugcucususu	480
hANGP TL3	GA0675	AAGATACC TGAATAAC CCTC	226	asasgsdAdUAdCCdUGdAAdUAdACdCCdU CgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcac cgagucggugcucususu	481
hANGP TL3	GA0676	AAGATACC TGAATAAC CCTC	227	asasdGsAdUAdCCdUGdAAdUAdACdCCdU CgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcac cgagucggugcucususu	482
hANGP TL3	GA0677	AAGATACC TGAATAAC CCTC	228	asasdGsdAdUAdCCdUGdAAdUAdACdCCd UCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAu AaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGca ccgagucggugcucususu	483
hANGP TL3	GA0678	AAGATACC TGAATAAC CCTC	229	asasdGsdAdUdAdCCdUGdAAdUAdACdCC dUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcucususu	484
hANGP TL3	GA0679	AAGATACC TGAATAAC CCTC	230	asasdGsdAdUdAdCdCdUGdAAdUAdACdC CdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcucususu	485

【 0 5 3 9 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 6】

hANGP TL3	GA0680	AAGATACC TGAATAAC CCTC	231	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAAdUAdACdC CdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcucususu	486
hANGP TL3	GA0681	AAGATACC TGAATAAC CCTC	232	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUAdACd CCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaA aAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcucususu	487
hANGP TL3	GA0682	AAGATACC TGAATAAC CCTC	233	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAC dCCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUa AaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaag ugGcaccgagucggugcucususu	488
hANGP TL3	GA0683	AAGATACC TGAATAAC CCTC	234	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAd CdCCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUU aAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa gugGcaccgagucggugcucususu	489
hANGP TL3	GA0684	AAGATACC TGAATAAC CCTC	235	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAd CdCdCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGU UaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa agugGcaccgagucggugcucususu	490
hANGP TL3	GA0685	AAGATACC TGAATAAC CCTC	236	asasgsdAdUdAdCdCUdGAdAUdAAdCCdC UdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcucususu	491
hANGP TL3	GA0686	AAGATACC TGAATAAC CCTC	237	asasgsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAdCCdC UdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcucususu	492
hANGP TL3	GA0687	AAGATACC TGAATAAC CCTC	238	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAUdAAdCCd CUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcucususu	493
hANGP TL3	GA0688	AAGATACC TGAATAAC CCTC	239	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAAdCC dCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaA aAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcucususu	494
hANGP TL3	GA0689	AAGATACC TGAATAAC CCTC	240	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAdC CdCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUa AaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaag ugGcaccgagucggugcucususu	495
hANGP TL3	GA0690	AAGATACC TGAATAAC CCTC	241	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAdC dCdCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUU aAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa gugGcaccgagucggugcucususu	496
hANGP TL3	GA0691	AAGATACC TGAATAAC CCTC	242	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAdC dCdCdUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGU UaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa agugGcaccgagucggugcucususu	497

【 0 5 4 0 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 7】

hANGP TL3	GA0692	AAGATACC TGAATAAC CCTC	243	asasgsdAdUdAdCCdUGdAAAdUAdACdCCd UCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAu AaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGca ccgagucggugcusususu	498
hANGP TL3	GA0693	AAGATACC TGAATAAC CCTC	244	asasgsdAdUdAdCdCdUGdAAAdUAdACdCCd UCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAu AaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGca ccgagucggugcusususu	499
hANGP TL3	GA0694	AAGATACC TGAATAAC CCTC	245	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAAAdUAdACdCC dUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu	500
hANGP TL3	GA0695	AAGATACC TGAATAAC CCTC	246	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUAdACdC CdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	501
hANGP TL3	GA0696	AAGATACC TGAATAAC CCTC	247	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAdC CCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaA aAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	502
hANGP TL3	GA0697	AAGATACC TGAATAAC CCTC	248	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAdC dCCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUa AaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaag ugGcaccgagucggugcusususu	503
hANGP TL3	GA0698	AAGATACC TGAATAAC CCTC	249	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAdC dCdCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUU aAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa gugGcaccgagucggugcusususu	504
hANGP TL3	GA0699	AAGATACC TGAATAAC CCTC	250	asasgsAdUACCUGAAUAdACCCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	505
hANGP TL3	GA0700	AAGATACC TGAATAAC CCTC	251	asasgsAUACCUGdAAUdAACCCdUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	506
hANGP TL3	GA441	AAGATACC TGAATAAC CCTC	252	asasgsAUACCUGAAUAACCCUCgUUUU AGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	507
hANGP TL3	GA0702	AAGATACC TGAATAAC CCTC	253	asasgsAZACCUGAAUAACCCUCgUUUU AGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	508
hANGP TL3	GA665	AAGATACC TGAATAAC CCTC	254	asasdGsdAdUdAdCdCUdGAdAdAdCUdC UdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu	509

【 0 5 4 1 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 8】

hANGP TL3	GA0704	AAGATACC TGAATAAC CCTC	255	asasgsAUACZUGAAUAACCCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	510
hANGP TL3	GA0705	AAGATACC TGAATAAC CCTC	256	asasgsAZACZUGAAUAACCCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	511
hANGP TL3/cA NGPTL 3	GA0706	AAGATACC TGAATAAC CCTC/AAGA TACCTGAAT AACTCTC	257	asasgsAUACZUGAAUAACZCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	512
hANGP TL3/cA NGPTL 3	GA0707	AAGATACC TGAATAAC CCTC/AAGA TACCTGAAT AACTCTC	258	asasgsAUACZUGAAZAACZCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	513
hANGP TL3/cA NGPTL 3	GA0708	AAGATACC TGAATAAC CCTC/AAGA TACCTGAAT AACTCTC	259	asasgsAZACCUGAAUAACZCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	514
cANGP TL3	GA0709	AAGATACC TGAATAACT CTC	260	asasgsAdUAdCCdUGdAAdUAdACdUCdUC gUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAag gcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccg agucggugcusususu	515
cANGP TL3	GA0710	AAGATACC TGAATAACT CTC	261	asasgsdAUdACdCUdGAdAUdAAdCUdCUd CgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcac cgagucggugcusususu	516
cANGP TL3	GA0711	AAGATACC TGAATAACT CTC	262	asdasdGsdAdUdAdCdCUdGAdAUdAAdCUd CUdCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	517
cANGP TL3	GA0712	AAGATACC TGAATAACT CTC	263	asdasdGsdAdUdAdCdCUdGAdAUdAAdCUd CUdCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	518
cANGP TL3	GA0713	AAGATACC TGAATAACT CTC	264	asasgsdAdUdAdCdCUdGAdAUdAAdCUdCU dCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAu AaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGca ccgagucggugcusususu	519
cANGP TL3	GA0714	AAGATACC TGAATAACT CTC	265	asdasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAUdAAdCU dCUdCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaA aAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	520

【 0 5 4 2 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 9】

cANGP TL3	GA0715	AAGATACC TGAATAACT CTC	266	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAAdC UdCUdCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUa AaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaag ugGcaccgagucggugcusususu	521
cANGP TL3	GA0716	AAGATACC TGAATAACT CTC	267	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAd CUdCUdCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUU aAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa gugGcaccgagucggugcusususu	522
cANGP TL3	GA0716	AAGATACC TGAATAACT CTC	268	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAd CdUdCUdCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGU UaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa agugGcaccgagucggugcusususu	523
cANGP TL3	GA0718	AAGATACC TGAATAACT CTC	269	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAd CdUdCdUdCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaG UUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaa aaagugGcaccgagucggugcusususu	524
cANGP TL3	GA0719	AAGATACC TGAATAACT CTC	270	asdAsdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdA dCdUdCdUdCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaG UUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaa aaagugGcaccgagucggugcusususu	525
cANGP TL3	GA0720	AAGATACC TGAATAACT CTC	271	asasgsdAdUAdCCdUGdAAAdUAdACdUCdU CgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcac cgagucggugcusususu	526
cANGP TL3	GA0721	AAGATACC TGAATAACT CTC	272	asasdGsAdUAdCCdUGdAAAdUAdACdUCdU CgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcac cgagucggugcusususu	527
cANGP TL3	GA0722	AAGATACC TGAATAACT CTC	273	asasdGsdAdUAdCCdUGdAAAdUAdACdUCd UCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAu AaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGca ccgagucggugcusususu	528
cANGP TL3	GA0723	AAGATACC TGAATAACT CTC	274	asasdGsdAdUdAdCdCdUGdAAAdUAdACdU CdUCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	529
cANGP TL3	GA0724	AAGATACC TGAATAACT CTC	275	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAAAdUAdACdU CdUCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	530
cANGP TL3	GA0725	AAGATACC TGAATAACT CTC	276	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUAdACd UCdUCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUaA aAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	531
cANGP TL3	GA0726	AAGATACC TGAATAACT CTC	277	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAC dUCdUCgUUUUAAGagcuaGaaauagcaaGUUa AaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaag ugGcaccgagucggugcusususu	532

【 0 5 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 0】

cANGP TL3	GA0727	AAGATACC TGAATAACT CTC	278	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAd CdUCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUU aAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa gugGcaccgagucggugcusususu	533
cANGP TL3	GA0728	AAGATACC TGAATAACT CTC	279	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAd CdUdCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGU UaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa agugGcaccgagucggugcusususu	534
cANGP TL3	GA0729	AAGATACC TGAATAACT CTC	280	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdUdAAAdCUdC UdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu	535
cANGP TL3	GA0730	AAGATACC TGAATAACT CTC	281	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdUdAAAdCUdC UdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu	536
cANGP TL3	GA0731	AAGATACC TGAATAACT CTC	282	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdUdAAAdCUd CUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	537
cANGP TL3	GA0732	AAGATACC TGAATAACT CTC	283	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAAAdCU dCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaA aAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	538
cANGP TL3	GA0733	AAGATACC TGAATAACT CTC	284	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAdC UdCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUa AaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaag ugGcaccgagucggugcusususu	539
cANGP TL3	GA0734	AAGATACC TGAATAACT CTC	285	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAdC dUdCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUU aAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa gugGcaccgagucggugcusususu	540
cANGP TL3	GA0735	AAGATACC TGAATAACT CTC	286	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAdC dUdCdUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGU UaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa agugGcaccgagucggugcusususu	541
cANGP TL3	GA0736	AAGATACC TGAATAACT CTC	287	asasgsdAdUdAdCCdUGdAAAdUAdACdUCd UCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAu AaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGca ccgagucggugcusususu	542
cANGP TL3	GA0737	AAGATACC TGAATAACT CTC	288	asasgsdAdUdAdCdCdUGdAAAdUAdACdUCd UCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAu AaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGca ccgagucggugcusususu	543
cANGP TL3	GA0738	AAGATACC TGAATAACT CTC	289	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAAAdUAdACdUC dUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu	544

【 0 5 4 4 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 1】

cANGP TL3	GA0739	AAGATACC TGAATAACT CTC	290	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdCdU CdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	545
cANGP TL3	GA0742	AAGATACC TGAATAACT CTC	291	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdCd UCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaA aAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	546
cANGP TL3	GA0743	AAGATACC TGAATAACT CTC	292	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAdC dUCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUa AaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaag ugGcaccgagucggugcusususu	547
cANGP TL3	GA0744	AAGATACC TGAATAACT CTC	293	asasgsdAdUdAdCdCdUdGdAdAdUdAdAdC dUdCdUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUU aAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaa gugGcaccgagucggugcusususu	548
cANGP TL3	GA0745	AAGATACC TGAATAACT CTC	294	asasgsAdUACCUGAAUAdACUCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	549
cANGP TL3	GA0746	AAGATACC TGAATAACT CTC	295	asasgsAUdACCUGAAUAdCUCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	550
cANGP TL3	GA753	AAGATACC TGAATAACT CTC	296	asasgsAUACCUGAAUAdCUCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	551
cANGP TL3	GA0748	AAGATACC TGAATAACT CTC	297	asasgsdAdUdACCUGAAUAdCUCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	552
cANGP TL3	GA0749	AAGATACC TGAATAACT CTC	298	asasdGsdAdUdACCUGAAUAdCUCUCgUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgaguc ggugcusususu	553
cANGP TL3	GA0750	AAGATACC TGAATAACT CTC	299	asasgsdAdUdAdCCUGAAUAdCUCUCgUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgaguc ggugcusususu	554
cANGP TL3	GA746	AAGATACC TGAATAACT CTC	300	asasdGsdAdUdAdCCUGAAUAdCUCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	555
cANGP TL3	GA0752	AAGATACC TGAATAACT CTC	301	asasgsdAdUdAdCdCUGAAUAdCUCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	556

【 0 5 4 5 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 2】

cANGP TL3	GA0753	AAGATACC TGAATAACT CTC	302	asasGsdAdUdAdCdCUGAAUAACUCUCg UUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAagg cuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	557
cANGP TL3	GA0754	AAGATACC TGAATAACT CTC	303	asasgsAZACCUGAAUAACUCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	558
cANGP TL3	GA0755	AAGATACC TGAATAACT CTC	304	asasgsAUACZUGAAUAACUCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	559
cANGP TL3	GA0756	AAGATACC TGAATAACT CTC	305	asasgsAZACZUGAAUAACUCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	560
cANGP TL3	GA0757	AAGATACC TGAATAACT CTC	306	asasgsAZACCZGAAUAACUCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	561
hANGP TL3	GA0758	AAGATACC TGAATAAC CCTC	307	asasgsAUACCUGAAYAACCCUCguuuuaga gcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau aacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	562
hANGP TL3	GA0759	AAGATACC TGAATAAC CCTC	308	asasgsAUACCUGAA(NImY)AACCCUCguu uuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccg uuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusus u	563
hANGP TL3	GA0760	AAGATACC TGAATAAC CCTC	309	asasgsAUACCUGAAAdWAACCCUCguuuuag agcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	564
hANGP TL3	GA0761	AAGATACC TGAATAAC CCTC	310	asasgsAUACCUGAATAACCCUCguuuuaga gcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau aacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	565
hANGP TL3	GA0762	AAGATACC TGAATAAC CCTC	311	asasgsAUACCYGAUAACCCUCguuuuaga gcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau aacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	566
hANGP TL3	GA0763	AAGATACC TGAATAAC CCTC	312	asasgsAUACC(NImY)GAUAACCCUCguu uuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccg uuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusus u	567
hANGP TL3	GA0764	AAGATACC TGAATAAC CCTC	313	asasgsAUACCDWGAAUAACCCUCguuuuag agcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	568
hANGP TL3	GA0765	AAGATACC TGAATAAC CCTC	314	asasgsAUACCTdUGAAUAACCCUCguuuua gagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguu ucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	569

【 0 5 4 6 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 3】

hANGP TL3	GA0766	AAGATACC TGAATAAC CCTC	315	asasgsAUACCYGAAYAACCCUCguuuuaga gcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau aacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	570
hANGP TL3	GA0767	AAGATACC TGAATAAC CCTC	316	asasgsAUACC(NImY)GAA(NImY)AACCC UCguuuuagagcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcu aguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggug cusususu	571
hANGP TL3	GA0768	AAGATACC TGAATAAC CCTC	317	asasgsAUACCCdWGAAAdWAACCCUCguuuu agagcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguu aucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	572
hANGP TL3	GA0769	AAGATACC TGAATAAC CCTC	318	asasgsAUACCTdUGAATdUAACCCUCguuu uagagcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccgu uaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	573
hANGP TL3	GA0770	AAGATACC TGAATAAC CCTC	319	asasgsAUACCUGA(2,6- DAP)UAACCCUCguuuuagagcuagaaaauagcaa guuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagug gcaccgagucggugcusususu	574
hANGP TL3	GA0771	AAGATACC TGAATAAC CCTC	320	asasgsAUACCUGAAU(2,6- DAP)ACCCUCguuuuagagcuagaaaauagcaagu uaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcac cgagucggugcusususu	575
hANGP TL3	GA0772	AAGATACC TGAATAAC CCTC	321	asasgsAUACCUGA(2,6-DAP)U(2,6- DAP)ACCCUCguuuuagagcuagaaaauagcaagu uaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcac cgagucggugcusususu	576
hANGP TL3	GA0773	AAGATACC TGAATAAC CCTC	322	asasgsAUACCUGAAAdUAACCCUCguuuuag agcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	577
hANGP TL3	GA0774	AAGATACC TGAATAAC CCTC	323	asasgsAUACCUGAAAdUAACCCUCguuuuag agcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	578
hANGP TL3	GA0775	AAGATACC TGAATAAC CCTC	324	asasgsAdUACCUGAAAdUAACCCUCguuuua gagcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	579
hANGP TL3	GA0776	AAGATACC TGAATAAC CCTC	325	asasgsAUACCUdGAAUAACCCUCguuuuag agcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	580
hANGP TL3	GA0777	AAGATACC TGAATAAC CCTC	326	+As+As+GsAUACCUGAAUAACCCUCguu uuagagcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccg uuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcususus u	581
hANGP TL3	GA0778	AAGATACC TGAATAAC CCTC	327	asasgsAU+A+CCUGAAUAACCCUCguuuua gagcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguua ucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	582
hANGP TL3	GA0779	AAGATACC TGAATAAC CCTC	328	asasgsdAUACCUGAAUAACCCUCguuuuag agcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuau caacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu	583

【 0 5 4 7 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 4】

hANGP TL3	GA0780	AAGATACC TGAATAAC CCTC	329	asasgsAdUACCUGAAUAACCCUCguuuuag agcuagaaaagcaaguuuuuuuaggcuaguccguuau caacuugaaaaagggcaccgagucggugcusususu	584
hANGP TL3	GA0781	AAGATACC TGAATAAC CCTC	330	asasgsAUdACCUGAAUAACCCUCguuuuag agcuagaaaagcaaguuuuuuuaggcuaguccguuau caacuugaaaaagggcaccgagucggugcusususu	585
hANGP TL3	GA0782	AAGATACC TGAATAAC CCTC	331	asasgsAUAdCCUGAAUAACCCUCguuuuag agcuagaaaagcaaguuuuuuuaggcuaguccguuau caacuugaaaaagggcaccgagucggugcusususu	586
hANGP TL3	GA0783	AAGATACC TGAATAAC CCTC	332	asasgsAUACCDUGAAUAACCCUCguuuuag agcuagaaaagcaaguuuuuuuaggcuaguccguuau caacuugaaaaagggcaccgagucggugcusususu	587
hANGP TL3	GA0784	AAGATACC TGAATAAC CCTC	333	asasgsAUACCUGAAUdAACCCUCguuuuag agcuagaaaagcaaguuuuuuuaggcuaguccguuau caacuugaaaaagggcaccgagucggugcusususu	588
hANGP TL3	GA0785	AAGATACC TGAATAAC CCTC	334	asasgsAUACCUIAAUAACCCUCguuuuagag cuagaaaagcaaguuuuuuuaggcuaguccguuaucaa cuugaaaaagggcaccgagucggugcusususu	589
hANGP TL3	GA0786	AAGATACC TGAATAAC CCTC	335	asasgsAUACC(MP- U)GAAUAACCCUCguuuuagagcuagaaaagca aguuuuuuuuaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagu ggcaccgagucggugcusususu	590
hANGP TL3	GA0787	AAGATACC TGAATAAC CCTC	336	asasgsAUACCUGAA(MP- U)AACCCUCguuuuagagcuagaaaagcaaguuua aauuaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagggcacc gagucggugcusususu	591
hANGP TL3	GA0788	AAGATACC TGAATAAC CCTC	337	asasgsAUACC(MP-U)GAA(MP- U)AACCCUCguuuuagagcuagaaaagcaaguuua aauuaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagggcacc gagucggugcusususu	592
hANGP TL3	GA472	AAGATACC TGAATAAC CCTC	338	asasisAUACCUGAAUAACCCUCgUUUUA GagcuaGaaaagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	593
hANGP TL3	GA473	AAGATACC TGAATAAC CCTC	339	asasisAUACCUIAAUAACCCUCgUUUUA GagcuaGaaaagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUcc GUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugc usususu	594
hANGP TL3	GA631	AAGATACC TGAATAAC CCTC	340	asdAsgsdAdUdAdCdCUGdAdAUAACCCU CgUUUUAAGagcuaGaaaagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcac cgagucggugcusususu	595
hANGP TL3	GA633	AAGATACC TGAATAAC CCTC	341	dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAACdC CUCgUUUUAAGagcuaGaaaagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu	596

【 0 5 4 8 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 5】

hANGP TL3	GA635	AAGATACC TGAATAAC CCTC	342	dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdC dCUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAa AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	597
hANGP TL3	GA636	AAGATACC TGAATAAC CCTC	343	asasdGsdAdUdAdCdCUGAAUAACCCUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAagg cuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	598
hANGP TL3	GA722	AAGATACC TGAATAAC CCTC	344	asdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdCd CUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu	599
hANGP TL3/cA NGPTL 3	GA672	AAGATACC TGAATAAC CCTC/AAGA TACCTGAAT AACTCTC	345	asasgsAUACCUGAAZAACZCUCgUUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggug cusususu	600
hANGP TL3	GA675	AAGATACC TGAATAAC CCTC	346	asdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdCd CUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG UUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUusususu	601
hANGP TL3	GA676	AAGATACC TGAATAAC CCTC	347	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGdAUdAAAdCCd CUdCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUusususu	602
hANGP TL3	GA677	AAGATACC TGAATAAC CCTC	348	asasdGsdAdUdAdCdCUdGdAUdAAAdCCdC UdCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG UUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUusususu	603
hANGP TL3	GA678	AAGATACC TGAATAAC CCTC	349	asdAsdGsdAdTdAdCdCdTdGAAUAACCCU CGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	604
hANGP TL3	GA679	AAGATACC TGAATAAC CCTC	350	dAsdAsdGsdAdUdAdCdCdUdGdAAUAACC CUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG UUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUusususu	605
hANGP TL3	GA680	AAGATACC TGAATAAC CCTC	351	asasgsAUAdCCdUGAAdUAACCCUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUusususu	606

【 0 5 4 9 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 6】

hANGP TL3	GA681	AAGATACC TGAATAAC CCTC	352	asdAsdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAAdC CdCudCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUsususu	607
hANGP TL3	GA682	AAGATACC TGAATAAC CCTC	353	asasdGsdAdUdAdCCUGAAUAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsusus u	608
hANGP TL3	GA683	AAGATACC TGAATAAC CCTC	354	dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdC dCUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUsususu	609
hANGP TL3	GA684	AAGATACC TGAATAAC CCTC	355	asasdGsdAdUdAdCdCUGAAUAACCCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus usu	610
hANGP TL3	GA685	AAGATACC TGAATAAC CCTC	356	asasgsAdUAdCCdUGdAAUdAAAdCdCCdUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsu susu	611
hANGP TL3	GA686	AAGATACC TGAATAAC CCTC	357	asasdGsdAdUdAdCdCdUGAAUAACCCUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsu susu	612
hANGP TL3	GA687	AAGATACC TGAATAAC CCTC	358	asasgsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACCCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus usu	613
hANGP TL3	GA688	AAGATACC TGAATAAC CCTC	359	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACCCUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsu susu	614
hANGP TL3	GA689	AAGATACC TGAATAAC CCTC	360	asasgsAUdACCUGAAUAAdCCCUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	615
hANGP TL3	GA690	AAGATACC TGAATAAC CCTC	361	asasgsAUACCdGAAAdUAACCdCUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	616

【 0 5 5 0 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 7】

hANGP TL3	GA691	AAGATACC TGAATAAC CCTC	362	asasgsdAdUdAdCCdUdGAAdUdAACCCUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsu susu	617
hANGP TL3	GA692	AAGATACC TGAATAAC CCTC	363	asasdGsdAUdAdCCUGAAUAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus u	618
hANGP TL3	GA693	AAGATACC TGAATAAC CCTC	364	asasdGsdAUdAdCdCUGAAUAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus u	619
hANGP TL3	GA694	AAGATACC TGAATAAC CCTC	365	asasdGsdAUdAdCdCdUGAAUAACCCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus usu	620
hANGP TL3	GA695	AAGATACC TGAATAAC CCTC	366	asasdGsdAUdAdCdCdUdGAAUAACCCUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsu susu	621
hANGP TL3	GA696	AAGATACC TGAATAAC CCTC	367	asasdGsdAUAdCdCdUGAAUAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus u	622
hANGP TL3	GA697	AAGATACC TGAATAAC CCTC	368	asasdGsdAUAdCdCdUdGAAUAACCCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus usu	623
hANGP TL3	GA698	AAGATACC TGAATAAC CCTC	369	asasdGsAdUAdCCdUGAAUAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus u	624
hANGP TL3	GA699	AAGATACC TGAATAAC CCTC	370	asasgsdAUdACdCUdGAAUAACCCUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus usu	625
hANGP TL3	GA700	AAGATACC TGAATAAC CCTC	371	asasgsAUACcdUGAAdUAACCCUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus usu	626

【 0 5 5 1 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 8】

hANGP TL3	GA701	AAGATACC TGAATAAC CCTC	372	asasgsdAUdACdCUdGAdAUdAAAdCCdCUd CGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	627
hANGP TL3	GA702	AAGATACC TGAATAAC CCTC	373	asasgsAUACCUGAdAUdAACCCUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	628
hANGP TL3	GA703	AAGATACC TGAATAAC CCTC	374	asasdGsAUdCCUGAdAUdAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUU AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsusus u	629
hANGP TL3	GA704	AAGATACC TGAATAAC CCTC	375	dAsdAsdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACC CUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG UUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUsususu	630
hANGP TL3	GA705	AAGATACC TGAATAAC CCTC	376	asasgsdAdUdACdCdUdGdAAUAACCCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus usu	631
hANGP TL3	GA706	AAGATACC TGAATAAC CCTC	377	asdAsgsdAdUdAdCdCUGdAdAUAAACCCU CGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	632
hANGP TL3	GA707	AAGATACC TGAATAAC CCTC	378	asasdGsdAdUdACdCdUdGdAAUAACCCUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsu susu	633
hANGP TL3	GA708	AAGATACC TGAATAAC CCTC	379	asasgsdAdUdAdCCUGAdAdUAACCCUdCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsus usu	634
hANGP TL3	GA709	AAGATACC TGAATAAC CCTC	380	dAsasgsdAdUdAdCCUGAdAdUAACCCUd CGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	635

【 0 5 5 2 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1 9】

hANGP TL3	GA710	AAGATACC TGAATAAC CCTC	381	dAsasgsdAdUAdCdCdUdGdAAAdUAACdCC UCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC Usususu	636
hANGP TL3	GA711	AAGATACC TGAATAAC CCTC	382	asasgsdAdUAdCdCdUdGdAAAdUAACdCCU CGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	637
hANGP TL3	GA712	AAGATACC TGAATAAC CCTC	383	asasdGsdAdUdACCUGAAUAACCCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsusus u	638
hANGP TL3	GA713	AAGATACC TGAATAAC CCTC	384	asdAsdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAAdCCd CUdCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUsususu	639
hANGP TL3	GA714	AAGATACC TGAATAAC CCTC	385	dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCCd CUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG UUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUsususu	640
hANGP TL3	GA715	AAGATACC TGAATAAC CCTC	386	dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdC CUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG UUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUsususu	641
cANGP TL3	GA720	AGAAAAAG ATACCTGA ATAACTCTC	387	asgsaasaaAGAUACCUGAAUAACUCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	642
cANGP TL3	GA721	TCAGAAAA AGATACCT GAATAACT CTC	388	uscsagsaaAAAGAUACCUGAAUAACUCU CgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcac cgagucggugcusususu	643
hANGP TL3	GA724	AAGATACC TGAATAAC CCTC	389	asasgsdAdUdAdCCdUdGAAdUdAACCCUC gUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAag gcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccg agucggugcusususu	644
hANGP TL3	GA735	AAGATACC TGAATAAC CCTC	390	GGAAGAUACCUGAAUAACCCUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	645

【 0 5 5 3 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 20】

hANGP TL3	GA741	AAGATACC TGAATAAC CCTC	391	GAAGAUACCUGAAUAACCCUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	646
cANGP TL3	GA344	aagatacCTGA ATAACTCTC	392	asasgsAUACCUGAAUAACUCUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCUususu	647
cANGP TL3	GA557	AAGATACC TGAATAACT CTC	393	asasgsAUACCUGAAUAACUCUCgUUUUA GagcuaGaaauagcaaGUUAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaaguggcaccgagucggugc usususuUUu	648
cANGP TL3	GA663	AAGATACC TGAATAACT CTC	394	asdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAdCdUd CUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu	649
cANGP TL3	GA664	AAGATACC TGAATAACT CTC	395	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAdCUd CUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUAaA AuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagug Gcaccgagucggugcusususu	650
cANGP TL3	GA665	AAGATACC TGAATAACT CTC	396	asasdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAdCUdC UdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu	651
cANGP TL3	GA666	AAGATACC TGAATAACT CTC	397	asdAsdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACUC UCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUAaAu AaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGca ccgagucggugcusususu	652
cANGP TL3	GA667	AAGATACC TGAATAACT CTC	398	dAsdAsdGsdAdUdACdCdUdGdAAUAACU CUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucggugcusususu	653
cANGP TL3	GA668	AAGATACC TGAATAACT CTC	399	asasgsAUAdCCdUGAAdUAACUCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcusususu	654
cANGP TL3	GA669	AAGATACC TGAATAACT CTC	400	asdAsdGsdAdUdAdCdCdUdGAdAUdAAdC UdCUdCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUA AaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaag ugGcaccgagucggugcusususu	655
cANGP TL3	GA734	AAGATACC TGAATAACT CTC	401	GGAAGAUACCUGAAUAACUCUCGUUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	656
cANGP TL3	GA740	AAGATACC TGAATAACT CTC	402	GAAGAUACCUGAAUAACUCUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAA AGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	657

【0554】

10

20

30

40

50

【表 8 - 2 1】

cANGP TL3	GA747	AAGATACC TGAATAACT CTC	403	asasgsdAdUdAdCCdUdGAAdUdAACUCUC gUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAag gcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccg agucggugcusususu	658
cANGP TL3	GA748	AAGATACC TGAATAACT CTC	404	asasdGsdAUdAdCCUGAAUAACUCUCgUU UUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgaguc ggugcusususu	659
cANGP TL3	GA749	AAGATACC TGAATAACT CTC	405	asasdGsdAUdAdCdCUGAAUAACUCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucggugcusususu	660
cANGP TL3	GA750	AAGATACC TGAATAACT CTC	406	asasdGsdAdUdAdCdCdUGAAUAACUCUC gUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAag gcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccg agucggugcusususu	661
cANGP TL3	GA751	AAGATACC TGAATAACT CTC	407	asasdGsdAUdAdCdCdUGAAUAACUCUCg UUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAagg cuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccga gucggugcusususu	662
cANGP TL3	GA752	AAGATACC TGAATAACT CTC	408	asasgAsdUAdCCdUGdAAdUAdACdUCdUC gUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAag gcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccg agucggugcusususu	663
cANGP TL3	GA755	AAGATACC TGAATAACT CTC	409	asasdGsdAdUdAdCCUGAAUAACUCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	664
cANGP TL3	GA756	AAGATACC TGAATAACT CTC	410	asasgsAUACCUdGAAdUAACUdCUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	665
cANGP TL3	GA757	AAGATACC TGAATAACT CTC	411	asasgsdAdUdAdCCdUdGAAdUdAACUCUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	666
cANGP TL3	GA758	AAGATACC TGAATAACT CTC	412	asasdGsdAUdAdCCUGAAUAACUCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	667
cANGP TL3	GA759	AAGATACC TGAATAACT CTC	413	asasdGsdAUdAdCdCUGAAUAACUCUCGU UUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	668

【 0 5 5 5 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 2 2】

cANGP TL3	GA760	AAGATACC TGAATAACT CTC	414	asasdGsdAdUdAdCdCdUGAAUAACUCUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU <u>su</u> <u>susu</u>	669
cANGP TL3	GA761	AAGATACC TGAATAACT CTC	415	asasdGsdAUdAdCdCdUGAAUAACUCUCG UUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU <u>sus</u> <u>usu</u>	670
cANGP TL3	GA762	AAGATACC TGAATAACT CTC	416	asdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCdUd CUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG UUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CU <u>sususu</u>	671
cANGP TL3	GA763	AAGATACC TGAATAACT CTC	417	asasdGsdAdUdACdCUdGAdAUdAAAdCUdC UdCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAG UUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CU <u>sususu</u>	672
cANGP TL3	GA764	AAGATACC TGAATAACT CTC	418	asdAsdGsdAdTdAdCdCdTdGAAUAACUCU CGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU <u>sususu</u>	673
cANGP TL3	GA765	AAGATACC TGAATAACT CTC	419	asasgsAUAdCCdUGAAUAACUCUCGUU UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU <u>sususu</u>	674
cANGP TL3	GA766	AAGATACC TGAATAACT CTC	420	dAsdAsgsadUdAdCdCdUdGdAAUdAAAdCd UdCUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG UGC <u>Usususu</u>	675
cANGP TL3	GA767	AAGATACC TGAATAACT CTC	421	asasgsAdUAdCCdUGdAAAdUAdACdUCdUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU <u>su</u> <u>susu</u>	676
cANGP TL3	GA768	AAGATACC TGAATAACT CTC	422	asasgsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACUCUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU <u>su</u> <u>susu</u>	677

【 0 5 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 2 3】

cANGP TL3	GA769	AAGATACC TGAATAACT CTC	423	asasdGsdAdUdAdCdCdUdGAAUAACUCU CGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu	678
cANGP TL3	GA770	AAGATACC TGAATAACT CTC	424	asasgsAUdACCUGAAUAAdCUCUCGUUU UAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu	679
hANGP TL3	GA656	AAAGATAC CTGAATAA CCCTC	425	asasasGAUACCUGAAUAACCCUCgUUUU AGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGU ccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg gcsususu	680
hANGP TL3	GA657	AAAAGATA CCTGAATA ACCCTC	426	asasaasGAUACCUGAAUAACCCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcsususu	681
hANGP TL3	GA658	AAAAAGAT ACCTGAAT AACCCTC	427	asasaasaGAUACCUGAAUAACCCUCgUUU UAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucgg ugcsususu	682
hANGP TL3	GA659	GAAAAAGA TACCTGAAT AACCCTC	428	gsasaasaAGAUACCUGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucgggucsususu	683
hANGP TL3	GA660	AGAAAAAG ATACCTGA ATAACCCTC	429	asgsaasaaAGAUACCUGAAUAACCCUCgU UUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggc uaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgag ucgggucsususu	684
hANGP TL3	GA661	TCAGAAAA AGATACCT GAATAACC CTC	430	uscsagsaaAAAGAUACCUGAAUAACCCU CgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuA aggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcac cgagucgggucsususu	685
hANGP TL3	GA662	TATCAGAA AAAGATAC CTGAATAA CCCTC	431	usasucsagAAAAAGAUACCUGAAUAACC CUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaA uAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGc accgagucgggucsususu	686

【 0 5 5 7 】

10

20

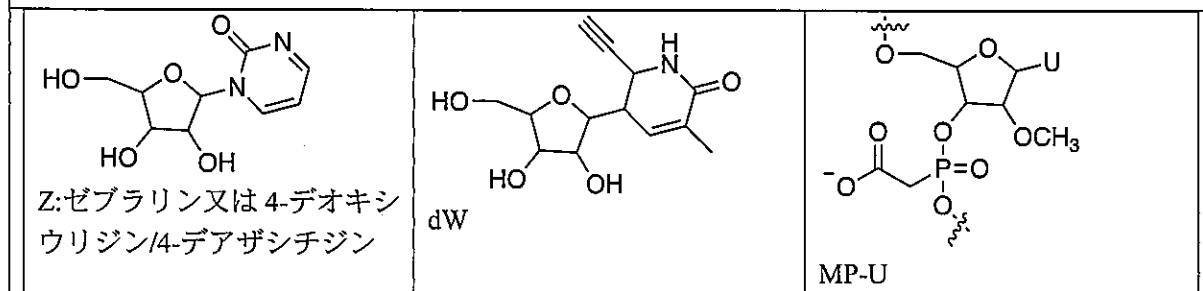
30

40

50

【表 8 - 2 4】

大文字のヌクレオチド(A、G、C、I、及びT)は、それぞれ、2'-デオキシリボヌクレオチドであるアデニン、グアニン、シトシン、イノシン、及びチミンを示し、ガイド RNA 配列では、大文字のヌクレオチド(A、C、G、I、及びU)は、それぞれ、リボヌクレオチドであるアデニン、グアニン、シトシン、イノシン、及びウラシルを示し、小文字のヌクレオチド(a、g、c、i、及びu)は、別途指定されない限り、2'-O-メチルリボヌクレオチド(2'-OMe)を示す。DNA プロトスペーサーは、2'-デオキシリボヌクレオチドを含む他の改変が単一ガイド RNA のプロトスペーサーセクションに導入される場合を除き、ガイド RNA 設計において RNA 又は RNA 等価物に変換されることを理解されたい。s:ホスホロチオエート(PS)。dA、dC、及びdGは、2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシシチジン、及び2'-デオキシグアノシンを示し、dUは、チミジン及び又は2'-デオキシウリジンを示し、Zは、ゼブラリン又は4-デオキシウリジン/4-デアザシチジンを示す。Y又はYは、シュードウリジンを示し、N1mY又はN1mYは、N1m-プソイドウリジンを示し、MP-Uは、2'-O-メチル-3'-ホスホノアセテート-ウリジンを示し、dWは、2'-デオキシエチニルメチルピリドン-シチジンを示し、2, 6-DAPは、2, 6-ジアミノプリンを示し、「+」記号(+A、+G、+C、+U)は、ロックド核酸を示す。Xは、ネブラリンである。



【0558】

【0556】tracrRNA配列の概要を表9に提供する。

【0559】

【表9】

表9. TracrRNA配列

	配列	説明	配列番号
tracrRNA 1 番	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUsususu	最小限の改変 tracrRNA	3
tracrRNA 2 番	gUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUU AucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcusususu	2'-OMe 濃縮さ れた tracrRNA	4

【0560】

【0557】遺伝子エディタータンパク質の概要を表10に提供する。

【0561】

10

20

30

40

50

【表 10 - 1】

表 10. 遺伝子エディタータンパク質及びそのコードする核酸の配列。

	配列	説明	配列 番号
MA004			
MA004	AGGAAAu'AAGAGAGAAAAGAAGAGu'AAGAAGAAAu'Au'AAG AGCCACCAu'GAGCGAGGu'GGAGu'u'CAGCCACGAGu'ACu'GGA u'GCGGCACGCCCu'GACCCu'GGCCAAGCGGGCCCCGGGACGAGC GGGAGGu'GCCCCu'GGGCGCCGu'GGu'GGu'GGu'GAACAACCGG Gu'GAu'CGGCGAGGGGu'GGAACCGGGCCAu'CGGCCu'GCACGA CCCCACCGCCACGCCGAGAu'CAu'GGCCCu'GCGGCAGGGCGG CCu'GGu'GAu'GCAGAAu'ACCGGu'GAu'CGACGCCACCCu'Gu' ACGu'GACCu'u'CGAGCCCu'GCGu'GAu'Gu'GCGCCGGCGCCAu'G Au'CCACAGCCCGAu'CGGCCGGGu'GGu'Gu'u'CGGCGu'GCGGAA CGCCAAGACCGCGCGCCCGGCAGCCu'GAu'GGACGu'GGu'GCA CCACCCCGGAu'GAACCAACCGGu'GGAGAu'CAACGAGGGCAu' 'CCu'GGCCGACGAGu'GCGCCGCCu'GGu'Gu'GCGGu'u'Cu'u'C CGAu'GCCCCGCGGGGu'Gu'u'CAACGCCCAGAAGAAGGCCCA GAGCAGCACCGACAGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCAGCAGCGG CAGCGAGACACCCGGCACCGAGCGAGCGCCACCCCGAGAG CAGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCAGCGACAAGAAGu'ACAGCAu' CGGCCu'GGCCAu'CGGCACCAACAGCGu'GGGu'GGGCCu'GAu' 'CAACGACGAGu'ACAAGGu'GCCAGCAAGAAGu'u'CAAGGu'GC u'GGGCAACACCGACCGGCACAGAu'CAAGAAGAACCu'GAu'C GGCGCCCu'GGu'Gu'u'CGACAGCGGCGAGACAGCCGAGGCCACC	mRNA	687
	CGGGu'GAAGCGGACCGCCCCGCGGCGGu'ACACCCGGCGGAAG AACCGGAu'Cu'GGu'ACCu'GCAGGAGAu'Cu'u'CAGCAACGAGAu' GGCCAAGGu'GGACGACAGCu'u'Cu'u'CCACCGGu'GGAGGAGA GGu'u'CCu'GGu'GGAGGAGGACAAGAAGCAGAGCGGCACCCC Au'Cu'u'CGGCAACu'CGu'GGACGAGGu'GGCCu'ACCACGAGAA Gu'ACCCACCAu'Cu'ACCACCu'GCGGAAGAAGCu'GGu'GGACA GCACCGACAAGGCCGACCu'GCGGCu'GAu'Cu'ACCu'GGCCCu'G GCCCACu'GAu'CAAGu'u'CCGGGGCCACu'u'CCu'GAu'CGAGGG CGACCu'GAACCCCGACAACAGCGACGu'GGACAAGCu'Gu'u'CAu' 'CCAGCu'GGu'GCAGACCu'ACAACAGCu'Gu'u'CGAGGAGAACC CCAu'CAACGCCAGCGGCGu'GGACGCCAAGGCCAu'CCu'GAGCG CCCCGGu'GAGCAAGAGCCGGCGGu'GGAGAACCu'GAu'CGCC CAGCu'GCCCCGCGAGAAGAAGAACGGCCu'Gu'u'CGGCAACCu' GAu'CGCCCu'GAGCCu'GGGCCu'GACCCCAACu'u'CAAGAGCA ACu'u'CGACCu'GGCCGAGGACGCCAAGCu'GCAGCu'GAGCAAG GACACCu'ACGACGACGACCu'GGACAACCu'GGu'GGCCAGAu' CGGCGACCAGu'ACGCCGACCu'Gu'u'CCu'GGCCGCCAAGAACCu' 'GAGCGACGCCAu'CCu'GGu'GAGCGACAu'CCu'GCGGGu'GAACA CCGAGAu'CAACAAGGCCCCCu'GAGCGCCAGAu'GAu'CAAGC GGu'ACGACGAGCACCACAGGACCu'GACCCu'GGu'GAAGGCC u'GGu'GCGGCAGCAGCu'GCCCCAGAAGu'ACAAGGAGAu'Cu'u'C u'u'CGACCAAGCAAGAACGGCu'ACGCCGGu'ACAu'CGACGG CGGCGCCAGCCAGGAGGAGu'u'Cu'ACAAGu'u'CAu'CAAGCCCA u'CCu'GGAGAAGAu'GGACGGCACCGAGGAGCu'GGu'GGu'GAAG		

【0562】

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

Cu'GAACCGGGAGGACCu'Gcu'GCGGAAGCAGCGGACCu'u'CGA CAACGGCAGCAu'CCCCACCAGAu'CCACCu'GGGCGAGCu'GCA CGCCAu'CCu'GCGGCGGCAGGAGGACu'u'Cu'ACCCCu'u'CCu'GA AGGACAACCGGGAGAAGAu'CGAGAAGAu'CCu'GACCu'u'CCGG Au'CCCCu'ACu'ACGu'GGGCCCCCu'GGCCCGGGCAACAGCCGG u'u'CGCCu'GGAu'GACCCGCAAGAGCGAGGAGACAAu'CACCCC Cu'GGAACu'u'CGAGGAGGu'GGu'GGACAAGGGCGCCAGCGCCC AGAGCu'u'CAu'CGAGCGGAu'GACCAACu'u'CGACAAGAACCu'G CCCAACGAGAAGGu'Gcu'GCCAACGACAGCCu'Gcu'Gu'ACGA Gu'ACu'u'CACCGu'Gu'ACAACGAGCu'GACCAAGGu'GAAGu'AC Gu'GACCGAGGGCAu'GCGGAAGCCCGCCu'u'CCu'GAGCGGCGA GCAGAAGAAGGCCAu'CGu'GGACCu'Gcu'Gu'u'CAAGACCAACC GGAAGGu'GACCGu'GAAGCAGCu'GAAGGAGGACu'ACu'u'CAAG AAGAu'CGAGu'Gcu'u'CGACAGCGu'GGAGAu'CAGCGGCGu'GG AGGACCGGu'u'CAACGCCAGCCu'GGGCACCu'ACCACGACCu'G Cu'GAAGAu'CAu'CAAGGACAAGGACu'u'CCu'GGACAACGAGGA GAACGAGGACAu'CCu'GGAGGACu'CGu'Gcu'GACCCu'GACCC u'Gu'u'CGAGGACCGGGAGAu'GAu'CGAGGAGCGGGu'GAAGACC u'ACGCCCCACu'Gu'u'CGACGACAAGGu'GAu'GAAGCAGCu'GAA GCGGCGGCGGu'ACACCGGGu'GGGGCCGGCu'GAGCCGGAAGCu 'GAu'CAACGGCAu'CCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAu'CC u'GGACu'u'CCu'CAAGAGCGACGGCu'u'CGCCAACCGGAACu'u'C Au'GCAGCu'GAu'CCACGACGACAGCCu'GACCu'u'CAAGGAGGA CAu'CCAGAAGGCCCAGGu'GAGCGGCCAGGGCGACAGCCu'GCA CGAGCACu'CGCCAACCu'GGCCGGCAGCCCCGCCAu'CAAGAA GGGCAu'CCu'GCAGACCGu'GAAGGu'GGu'GGACGAGCu'GGu'G AAGGu'GAu'GGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAu'CGu'GAu'CGA GAu'GGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAA CAGCCGGGAGCGGAu'GAAGCGGAu'CGAGGAGGGCAu'CAAGG AGCu'GGGCAGCCAGAu'CCu'GAAGGAGCACCCCGu'GGAGAAC ACCCAGCu'GCAGAACGAGAAGCu'Gu'ACCu'Gu'ACu'ACCu'GCA GAACGGCCGGGACAu'Gu'ACGu'GGACCAGGAGCu'GGACu'CA ACCGGCu'GAGCGACu'ACGACGu'GGACCACu'CGu'GCCCCAG AGCu'u'CCu'GAAGGACGACAGCAu'CGACAACAAGGu'Gcu'GAC CCGGAGCGACAAGAACC GGCGCAAGAGCGACAACGu'GCCCCAG CGAGGAGGu'GGu'GAAGAAGAu'GAAGAACu'ACu'GGCGGCAGC u'Gcu'GAACGCCAAGCu'GAu'CACCCAGCGGAAGu'u'CGACAAC Cu'GACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCu'GAGCGAGCu'GGACAA GGCCGGCu'u'CAu'CAAGCGGCAGCu'GGu'GGAGACACGGCAGA u'CACCAAGCACGu'GGCCAGAu'CCu'GGACAGCCGGAu'GAAC ACCAAGu'ACGACGAGAACGACAAGCu'GAu'CCGGGAGGu'GAA GGu'GAu'CACCCu'CAAGAGCAAGCu'GGu'GAGCGACu'u'CCGGA AGGACu'u'CCAGu'u'Cu'ACAAGGu'GCGGGAGAu'CAACAACu'A CCACCACGCCCACGACGCCu'ACCu'GAACGCCGu'GGu'GGGCAC CGCCCu'GAu'CAAGAAGu'ACCCCAAGCu'GGAGAGCGAGu'u'CG u'Gu'ACGGCGACu'ACAAGGu'Gu'ACGACGu'GCGGAAGAu'GAu' CGCCAAGAGCGAGCAGGAGAu'CGGCAAGGCCACCGCCAAGu'A Cu'u'Cu'u'Cu'ACAGCAACAu'CAu'GAACu'u'Cu'u'CAAGACCGAG			

10

20

30

40

【0563】

【表 10 - 3】

Au'CACCCu'GGCCAACGGCGAGAu'CCGGAAGCGGCCCu'GAu' CGAGACAAACGGCGAGACAGGCGAGAu'CGu'Gu'GGGACAAGG GCCGGGACu'u'CGCCACCGu'GCGGAAGGu'GCu'GAGCAu'GCCC CAGGu'GAACAu'CGu'GAAGAAGACCGAGGu'GCAGACCGGCGG Cu'u'CAGCAAGGAGAGCAu'CCu'GCCAAGCGGAACAGCGACA AGCu'GAu'CGCCCCGAAGAAGGACu'GGGACCCCAAGAAGu'AC GGCGGCu'u'CGAGAGCCCCACCGu'GGCCu'ACAGCGu'GCu'GGu' GGu'GGCCAAGGu'GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCu'CAAGA GCGu'GAAGGAGCu'GCu'GGGCAu'CACCAu'CAu'GGAGCGGAGC AGCu'u'CGAGAAGAACCCCAu'CGACu'u'CCu'GGAGGCCAAGGG Cu'ACAAGGAGGu'GAAGAAGGACCu'GAu'CAu'CAAGCu'GCCCCA AGu'ACAGCCu'Gu'u'CGAGCu'GGAGAACGGCCGGAAGCGGAu'G Cu'GGCCAGCGCCGGCGAGCu'GCAGAAGGGCAACGAGCu'GGCC Cu'GCCAGCAAGu'ACGu'GAACu'u'CCu'Gu'ACCu'GGCCAGCCA Cu'ACGAGAAGCu'GAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGA AGCAGCu'Gu'u'CGu'GGAGCAGCACAAGCACu'ACCu'GGACGAG Au'CAu'CGAGCAGAu'CAGCGAGu'u'CAGCAAGCGGGu'GAu'CCu' 'GGCCGACGCCAACCu'GGACAAGGu'GCu'GAGCGCCu'ACAACA AGCACCGGGACAAGCCCAu'CCGGGAGCAGGCCGAGAACAu'CA u'CCACCu'Gu'u'CACCCu'GACCAACCu'GGGCGCCCCCGCCGCCu' u'CAAGu'ACu'u'CGACACCACCAu'CGACCGGAAGCGGu'ACACC AGCACCAAGGAGGu'GCu'GGACGCCACCCu'GAu'CCACCAGAG CAu'CACCGGCCu'Gu'ACGAGACACGGAu'CGACCu'GAGCCAGCu 'GGGCGGCGACGAGGGCGCCGACAAGCGGACCGCCGACGGCAG CGAu'u'CGAGAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGu'Gu'GAGCGG CCGCu'u'AAu'u'AAGCu'GCCu'u'Cu'GCGGGGCu'u'GCCu'u'Cu'GG CCAu'GCCCu'u'Cu'u'Cu'CCCu'u'GCACCu'Gu'ACCu'Cu'u'GGu' Cu'u'GAAu'AAAGCCu'GAGu'AGGAAGu'Cu'AGA		
MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPGAVLVLNNRVIGEG WNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCV MCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEI TEGILADECAALLCRFFRMPRRVFNAQKKAQSSTDSGSSGGSSGS ETPGTSESATPESSGGSSGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYK VPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRY TRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTTYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKF RGHFLIEGDLNPDNSDVDFLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKA ILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD LAEDAKLQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILL SDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYK EIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIE KILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGAS AQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEISGVEDRFNASLGTYHDLKHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT LFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLIN GIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS	タンパ ク質	688

10

20

30

40

【0564】

【表 10 - 4】

	GQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQ LQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKD DSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT QRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYHH AHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQ EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW DKGRDFATVRKVLSMPQVNVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFESPTVAYSVLVVAKEKGSKKLKSVEL LGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLENGR KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHHRDK PIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLI HQSITGLYETRIDLSQLGGDEGADKRTADGSEFESPKKKRKV		
5'UTR	AGGAAAU'AAGAGAGAAAAGAAGAGu'AAGAAGAAAU'Au'AAG AGCCACC	mRNA	689
TadA	Au'GAGCGAGGu'GGAGu'u'CAGCCACGAGu'ACu'GGAu'GCGGC ACGCCCu'GACCCu'GGCCAAGCGGGCCCGGACGAGCGGGAGG u'GCCCGu'GGGCGCCGu'GGu'GGu'GGu'GAACAACCGGGu'GAu'C GGCGAGGGGu'GGAACCGGGCCAu'CGGCCu'GCACGACCCACC GCCCACGCCGAGAu'CAu'GGCCCu'GCGGCAGGGCGGCCu'GGu' GAu'GCAGAAAu'ACCGGu'GAu'CGACGCCACCCu'Gu'ACGu'GA CCu'u'CGAGCCCu'GCGu'GAu'Gu'GCGCCGGCGCCAu'GAu'CCAC	mRNA	690
	AGCCGGAu'CGGCCGGGu'GGu'Gu'u'CGGCGu'GCGGAACGCCAA GACCGGCGCCGCCGCGCAGCCu'GAu'GGACGu'GGu'GCACACCC CGGAu'GAACCAACCGGGu'GGAGAu'CACCGAGGGCAu'CCu'GG CCGACGAGu'GCGCCGCCCu'GGu'Gu'GCCGGu'u'Cu'u'CCGGAu'G CCCCGGCGGGu'Gu'u'CAACGCCCAGAAGAAGGCCCAGAGCAGC ACCGAC		
	MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNRRVIGEG WNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCV MCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEI TEGILADECAALLCRFFRMPRRVFNAQKKAQSSTD	タンパ ク質	691
TadA と Cas9 ニ ッカー ゼとの 間のリ ンカー	AGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCAGCAGCGGCAGCGAGACACCC GGCACCAGCGAGAGCGCCACCCCGAGAGCAGCGGCGGCAGC AGCGGCGGCAGC	mRNA	692
	SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESGGSSGGS	タンパ ク質	693
Cas9 ニ ッカー ゼ	GACAAGAAGu'ACAGCAu'CGGCCu'GGCCAu'CGGCACCAACAG CGu'GGGGu'GGGCCGu'GAu'CACCGACGAGu'ACAAGGu'GCCCA GCAAGAAGu'u'CAAGGu'GGu'GGGCAACACCGACCGGCACAGC Au'CAAGAAGAACCu'GAu'CGGCGCCCu'GGu'Gu'u'CGACAGCGG CGAGACAGCCGAGGCCACCCGGGu'GAAGCGGACCGCCCGGCG GCGGu'ACACCCGGCGGAAGAACCAGGu'Cu'GGu'ACCu'GCAGG AGAu'Cu'u'CAGCAACGAGAu'GGCCAAGGu'GGACGACAGCu'u'C	mRNA	694

【0565】

10

20

30

40

50

【表 10 - 5】

u'u'CCACCGGCu'GGAGGAGAGCu'u'CCu'GGu'GGAGGAGGACAA GAAGCAGGAGCGGCACCCCAu'Cu'u'CGGCAACAu'CGu'GGACG AGGu'GGCCu'ACCACGAGAAGu'ACCCACCAu'Cu'ACCACCu'G CGGAAGAAGCu'GGu'GGACAGCACCGACAAGGCCGACCu'GCG GGu'GAu'Cu'ACCu'GGCCCu'GGCCACAu'GAu'CAAGu'u'CCGGG GCCACu'u'CCu'GAu'CGAGGGCGACCu'GAACCCCGACAACAGC GACGu'GGACAAGCu'Gu'u'CAu'CCAGCu'GGu'GCAGACCu'ACAA CCAGCu'Gu'u'CGAGGAGAACCCCAu'CAACGCCAGCGGCGu'GG ACGCCAAGGCCAu'CCu'GAGCGCCCGGGu'GAGCAAGAGCCGGC GGCu'GGAGAACCu'GAu'CGCCAGCu'GCCCCGCGAGAAGAAG AACGGCCu'Gu'u'CGGCAACCu'GAu'CGCCCu'GAGCCu'GGGCCu' GACCCCAACu'u'CAAGAGCAACu'u'CGACCu'GGCCGAGGACG CCAAGCu'GCAGCu'GAGCAAGGACACCu'ACGACGACGACCu'G GACAACCu'GGu'GGCCAGAu'CGGCGACCAGu'ACGCCGACCu' Gu'u'CCu'GGCCGCAAGAACCu'GAGCGACGCCAu'CCu'GGu'GA GCGACAu'CCu'GCGGGu'GAACACCGAGAu'CAACAAGGCCCCC u'GAGCGCCAGCAu'GAu'CAAGCGGu'ACGACGAGCACCACCAG GACCu'GACCCu'GGu'GAAGGCCCu'GGu'GCGGCAGCAGCu'GCC CGAGAAGu'ACAAGGAGAu'Cu'u'Cu'u'CGACCAGAGCAAGAACG GGu'ACGCCGGCu'ACAu'CGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGu' 'u'Cu'ACAAGu'u'CAu'CAAGCCCAu'CCu'GGAGAAGAu'GGACGG CACCAGGAGCu'GGu'GGu'GAAGCu'GAACCGGGAGGACCu'GC u'GCGGAAGCAGCGGACCu'u'CGACAACGGCAGCAu'CCCCACC AGAu'CCACCu'GGGCGAGCu'GCACGCCAu'CCu'GCGGCGGCAG GAGGACu'u'Cu'ACCCCu'u'CCu'GAAGGACAACCGGGAGAAGAu' CGAGAAGAu'CCu'GACCu'u'CCGGAu'CCCu'ACu'ACGu'GGGCC CCCu'GGCCCGGGGCAACAGCCGGu'u'CGCCu'GGAu'GACCCGC AAGAGCGAGGAGACAu'CAACCCCu'GGAACu'u'CGAGGAGGu' GGu'GGACAAGGCGCGCCAGCGCCAGAGCu'u'CAu'CGAGCGGAu' 'GACCAACu'u'CGACAAGAACCu'GCCCCACGAGAAGGu'GGu'GC CCAAGCACAGCCu'GGu'GGu'ACGAGu'ACu'u'CAACGu'Gu'ACAAC GAGCu'GACCAAGGu'GAAGu'ACGu'GACCGAGGGCAu'GCGGAA GCCCGCCu'u'CCu'GAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAu'CGu'GG ACCu'GGu'Gu'u'CAAGACCAACCGGAAGGu'GACCGu'GAAGCAG Cu'GAAGGAGGACu'ACu'u'CAAGAAGAu'CGAGu'GGu'u'CGACA GCGu'GGAGAu'CAGCGGCGu'GGAGGACCGGu'u'CAACGCCAGC Cu'GGGACCu'ACCACGACCu'GGu'GAAGAu'CAu'CAAGGACAA GGACu'u'CCu'GGACAACGAGGAGAACGAGGACAu'CCu'GGAGG ACAu'CGu'GGu'GACCCu'GACCCu'Gu'u'CGAGGACCGGGAGAu'G Au'CGAGGAGCGGGu'GAAGACCu'ACGCCCCCu'Gu'u'CGACGA CAAGGu'GAu'GAAGCAGCu'GAAGCGGCGGCGGu'ACACCGGGu' GGGGCCGGGu'GAGCCGGAAGCu'GAu'CAACGGCAu'CCGGGAC AAGCAGAGCGGCAAGACCAu'CCu'GGACu'u'CCu'CAAGAGCGA CGGGu'u'CGCAACCGGAACu'u'CAu'GCAGCu'GAu'CCACGACG ACAGCCu'GACCu'u'CAAGGAGGACAu'CCAGAAGGCCAGGu'G AGCGGCCAGGGCGACAGCCu'GCACGAGCACAu'CGCCAACCu'G GCCGGCAGCCCCGCCAu'CAAGAAGGGCAu'CCu'GCAGACCGu'G AAGGu'GGu'GGACGAGCu'GGu'GAAGGu'GAu'GGGCCGGCACA	10	20	30	40

【0566】

【表 10 - 6】

AGCCCGAGAACAu'CGu'GAu'CGAGAu'GGCCCGGGAGAACCAG ACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGAu'GAAG CGGAu'CGAGGAGGGCAu'CAAGGAGCu'GGGCAGCCAGAu'CCu' GAAGGAGCACCCCGu'GGAGAACACCCAGCu'GCAGAACGAGAA GCu'Gu'ACCu'Gu'ACu'ACCu'GCAGAACGGCCGGGACAu'Gu'ACG u'GGACCAGGAGCu'GGACAu'CAACCGGCu'GAGCGACu'ACGAC Gu'GGACCACAu'CGu'GCCCCAGAGCu'u'CCu'GAAGGACGACAG CAu'CGACAACAAGGu'Gcu'GACCCGGAGCGACAAGAACCGGG GCAAGAGCGACAACGu'GCCCCAGCGAGGAGGu'GGu'GAAGAAG Au'GAAGAAACu'ACu'GGCGGCAGCu'Gcu'GAACGCCAAGCu'GAu' CACCCAGCGGAAGu'u'CGACAACCu'GACCAAGGCCGAGCGGGG CGGCCu'GAGCGAGCu'GGACAAGGCCGGCu'u'CAu'CAAGCGGC AGCu'GGu'GGAGACACGGCAGAu'CACCAAGCACGu'GGCCAG Au'CCu'GGACAGCCGAu'GAACACCAAGu'ACGACGAGAACGA CAAGCu'GAu'CCGGGAGGu'GAAGGu'GAu'CACCCu'CAAGAGCA AGCu'GGu'GAGCGACu'u'CCGGAAGGACu'u'CCAGu'u'Cu'ACAA GGu'GCGGGAGAu'CAACAACu'ACCACCACGCCACGACGCCu'A CCu'GAACGCCGu'GGu'GGGCACCGCCCu'GAu'CAAGAAGu'ACC CCAAGCu'GGAGAGCGAGu'u'CGu'Gu'ACGGCGACu'ACAAGGu'G u'ACGACGu'GCGGAAGAu'GAu'CGCCAAGAGCGAGCAGGAGAu' CGGCAAGGCCACCGCCAAGu'ACu'u'Cu'u'Cu'ACAGCAACAu'CA u'GAACu'u'Cu'u'CAAGACCGAGAu'CACCCu'GGCCAACGGCGAG Au'CCGGAAGCGGCCCu'GAu'CGAGACAAACGGCGAGACAGG CGAGAu'CGu'Gu'GGGACAAGGGCCGGGACu'u'CGCCACCGu'GC GGAAGGu'Gcu'GAGCAu'GCCCCAGGu'GAACAu'CGu'GAAGAAG ACCGAGGu'GCAGACCGGCGGCu'u'CAGCAAGGAGAGCAu'CCu' GCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCu'GAu'CGCCCGGAAGAAGGA Cu'GGGACCCCAAGAAGu'ACGGCGGCu'u'CGAGAGCCCCACCGu 'GGCCu'ACAGCGu'Gcu'GGu'GGu'GGCCAAGGu'GGAGAAGGGC AAGAGCAAGAAGCu'CAAGAGCGu'GAAGGAGCu'Gcu'GGGCAu' CACCAu'CAu'GGAGCGGAGCAGCu'u'CGAGAAGAACCCCAu'CG ACu'u'CCu'GGAGGCCAAGGGCu'ACAAGGAGGu'GAAGAAGGAC Cu'GAu'CAu'CAAGCu'GCCCAAGu'ACAGCCu'Gu'u'CGAGCu'GG AGAACGGCCGGAAGCGGAu'Gcu'GGCCAGCGCCGGCGAGCu'G CAGAAGGGCAACGAGCu'GGCCCu'GCCAGCAAGu'ACGu'GAA Cu'u'CCu'Gu'ACCu'GGCCAGCCACu'ACGAGAAGCu'GAAGGGCA GCCCCGAGGACAACAGAGCAGAAGCAGCu'Gu'u'CGu'GGAGCAG CACAAGCACu'ACCu'GGACGAGAu'CAu'CGAGCAGAu'CAGCGA Gu'u'CAGCAAGCGGGu'GAu'CCu'GGCCGACGCCAACCu'GGACA AGGu'Gcu'GAGCGCCu'ACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAu'C CGGGAGCAGGCCGAGAACAu'CAu'CCACCu'Gu'u'CACCCu'GAC CAACCu'GGGCGCCCCCGCCGCCu'u'CAAGu'ACu'u'CGACACCAC CAu'CGACCGGAAGCGGu'ACACCAGCACCAAGGAGGu'Gcu'GG ACGCCACCCu'GAu'CCACCAGAGCAu'CACCGGCCu'Gu'ACGAG ACACGAu'CGACCu'GAGCCAGCu'GGCGGCGGAC			
DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKN LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNE MAK VDDSFHRL EESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL	タンパ ク質	695	

【0567】

10

20

30

40

50

【表 10 - 7】

	RKKLV DSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSD VDK LFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLNLI AQLP GEKKNGFLGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKD TYDDDL DNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI KRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGG ASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPH QIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGN SRFAWMTRKSEETITPWNFEVV DKGASAQSFIERMTNFDKNLPN EKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIV DLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT YH DLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKT Y A HL FDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS DG FANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPA I KKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIMARENQTTQKGQKNS RERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDM YVDQELDINRLSDYDV DHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS DNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT LKSKLVSDFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKY PKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFF KTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQV NIVKKTVEQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFESPT VAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEA KGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQQLFVEQHKHYLDEIIEQISE FSKR VILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLTNLGAP AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD		
Cas9 ニ ッカー ゼと NLS と の間の リンカ ー	GAGGGCGCCGAC EGAD	mRNA タンバ ク質	696 697
核局在 化配列 (NLS)	AAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGu'u'CGAGAGCCCCAAGAAG AAGCGGAAGGu'Gu'GA KRTADGSEFESPKKKRKV	mRNA タンバ ク質	698 699
3'UTR	GCGGCGCGCu'u'AAu'u'AAGCu'GCCu'u'Cu'GCGGGGGu'u'GCCu'u' Cu'GGCCAu'GCCCu'u'Cu'u'Cu'Cu'CCCu'u'GCACCu'Gu'ACCu'Cu' u'GGu'Cu'u'u'GAAu'AAAGCCu'GAGu'AGGAAGu'Cu'AGA	mRNA	700
MA079	AGGACu'CCu'CCCCAu'CCu'Cu'CCCu'Cu'Gu'CCCu'Cu'Gu'CCCu'C u'GACCCu'GCACu'Gu'CCCAGCACCAu'GAGCGAGGu'GGAGu'u'C AGCCACGAGu'ACu'GGAu'GCGCCACGCCCu'GACCCu'GGCCAA GCGCGCCCCGCGACGAGCGGAGGu'GCCCCu'GGGCGCCGu'GCu' GGu'GCu'GAACAACCGCGu'GAu'CGGCGAGGGCu'GGAACCGCG	mRNA	701

【0568】

10

20

30

40

50

【表 10 - 8】

CCAu'CGGCCu'GCACGACCCACCGCCACGCGGAGAu'CAu'GG CCCu'GCGCCAGGGCGGCCu'GGu'GAu'GCAGAACu'ACCGCCu'G Au'CGACGCCACCCu'Gu'ACGu'GACCu'u'CGAGCCCu'GCGu'GAu' Gu'GCGCCGGCGCCAu'GAu'CCACAGCCGAu'CGGCCGCGu'GGu' 'Gu'u'CGGCGu'GCGCAACGCCAAGACCGGCGCCGCGCGCAGCCu' 'GAu'GGACGu'Gcu'GCACACCCCGGAu'GAACACCGCGu'GG AGAu'CACCGAGGGCAu'CCu'GGCCGACGAGu'GCGCCGCCu'G Cu'Gu'GCGCGu'u'Cu'u'CCGCAu'GCCCCGCGCGu'Gu'u'CAACGC CCAGAAGAAGGCCAGAGCAGCAGCAGCAGCGCGCGCAGCAG CGGCGGCAGCAGCGGCAGCGAGACACCGGCACCGAGCGAGAG CGCCACCCCGAGAGCAGCGCGGCAGCAGCGCGCGCAGCGA CAAGAAGu'ACAGCAu'CGGCCu'GGCCAu'CGGCACCAACAGCGu' 'GGGGu'GGGCCu'GAu'CACCGACGAGu'ACAAGu'GCCCAGCA AGAAGu'u'CAAGGu'Gcu'GGGCAACACCGACCGCCACAGCAu'C AAGAAGAACCu'GAu'CGGCGCCCu'Gcu'Gu'u'CGACAGCGGCGA GACAGCCGAGGCCACCCGCCu'GAAGCGCACCGCCCGCGCGCG Cu'ACACCCGCGCAAGAACCAGAu'Cu'Gcu'ACCu'GCAGGAGAu 'Cu'u'CAGCAACGAGAu'GGCCAAGGu'GGACGACAGCu'u'Cu'u'C CACCGCCu'GGAGGAGAGCu'u'CCu'GGu'GGAGGAGGACAAGAA GCACGAGCGCCACCCCAu'Cu'u'CGGCAACu'CGu'GGACGAGGu 'GGCCu'ACCACGAGAAGu'ACCCACCAu'Cu'ACCACCu'GCGCA AGAAGCu'GGu'GGACAGCACCGACAAGGCCGACCu'GCGCCu'G Au'Cu'ACCu'GGCCCu'GGCCACAu'GAu'CAAGu'u'CCGCGGCCA Cu'u'CCu'GAu'CGAGGGCGACCu'GAACCCCGACAACAGCGACGu 'GGACAAGCu'Gu'u'CAu'CCAGCu'GGu'GCAGACCu'ACAACCAG Cu'Gu'u'CGAGGAGAACCCCAu'CAACGCCAGCGGCCu'GGACGC CAAGGCCAu'CCu'GAGCGCCCGCCu'GAGCAAGAGCCGCGCCu' GGAGAACCu'GAu'CGCCAGCu'GCCCCGCGAGAAGAAGAACG GCCu'Gu'u'CGGCAACCu'GAu'CGCCCu'GAGCCu'GGGCCu'GACC CCCAACu'u'CAAGAGCAACu'u'CGACCu'GGCCGAGGACGCCAA Gcu'GCAGCu'GAGCAAGGACACCu'ACGACGACGACCu'GGACA ACCu'Gcu'GGCCAGAu'CGGCGACCAu'ACGCGACCu'Gu'u'C Cu'GGCCGCCAAGAACCu'GAGCGACGCCAu'CCu'Gcu'GAGCGA CAu'CCu'GCGCGu'GAACACCGAGAu'CACCAAGGCCCCCu'GA GCGCCAGAu'GAu'CAAGCGCu'ACGACGAGCACCAAGGACC u'GACCCu'Gcu'GAAGGCCCu'GGu'GCGCCAGCAGCu'GCCCCGAG AAGu'ACAAGGAGAu'Cu'u'Cu'u'CGACCAGAGCAAGAACGGCu'A CGCCGGCu'ACAu'CGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGAGu'u'Cu' ACAAGu'u'CAu'CAAGCCCAu'CCu'GGAGAAGu'GGACGGCACC GAGGAGCu'Gcu'GGu'GAAGCu'GAACCGCGAGGACCu'Gcu'GCG CAAGCAGCGCACCu'u'CGACAACGGCAGCAu'CCCCACCAAGu' CCACCu'GGGCGAGCu'GCACGCCAu'CCu'GCGCCGCCAGGAGGA Cu'u'Cu'ACCCCu'u'CCu'GAAGGACAACCGCGAGAAGAu'CGAGA AGAu'CCu'GACCu'u'CCGCAu'CCCu'ACu'ACGu'GGGCCCCu'G GCCCCGCGCAACAGCCCGu'u'CGCCu'GGAu'GACCCGCAAGAGC GAGGAGACAAu'CACCCCu'GGAACu'u'CGAGGAGGu'GGu'GGA CAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCu'u'CAu'CGAGCGCAu'GACCA ACu'u'CGACAAGAACCu'GCCCCACGAGAAGGu'Gcu'GCCCAAG		

10

20

30

40

【0569】

【表 10 - 9】

CACAGCCu'GGu'Gu'ACGAGu'ACu'u'CACCGu'Gu'ACAACGAGCu' GACCAAGGu'GAAGu'ACGu'GACCGAGGGCAu'GCGCAAGCCCG CCu'u'CCu'GAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAu'CGu'GGACCu'G Cu'Gu'u'CAAGACCAACCGCAAGGu'GACCGu'GAAGCAGCu'GAA GGAGGACu'ACu'u'CAAGAAGAu'CGAGu'GGu'u'CGACAGCGu'G GAGAu'CAGCGGCGu'GGAGGACCGCu'u'CAACGCCAGCCu'GGG CACCu'ACCACGACCu'GGu'GAAGAu'CAu'CAAGGACAAGGACu' u'CCu'GGACAACGAGGAGAACGAGGACAu'CCu'GGAGGACAu'C Gu'GGu'GACCCu'GACCCu'Gu'u'CGAGGACCGCGAGAu'GAu'CGA GGAGCGCCu'GAAGACCu'ACGCCCACCu'Gu'u'CGACGACAAGGu 'GAu'GAAGCAGCu'GAAGCGCCGCGCu'ACACCGGCu'GGGGCC GCCu'GAGCCGCAAGCu'GAu'CAACGGCAu'CCGCGACAAGCAG AGCGGCAAGACCAu'CCu'GGACu'u'CCu'CAAGAGCGACGGCu'u' CGCCAACCGCAACu'u'CAu'GCAGCu'GAu'CCACGACGACAGCCu 'GACCu'u'CAAGGAGGACAu'CCAGAAGGCCAGGu'GAGCGGCC AGGGCGACAGCCu'GCACGAGCACAu'CGCCAACCu'GGCCGGCA GCCCCGCCAu'CAAGAAGGGCAu'CCu'GCAGACCGu'GAAGGu'G Gu'GGACGAGCu'GGu'GAAGGu'GAu'GGCCGCGCACAAGCCCGA GAACu'CGu'GAu'CGAGAu'GGCCGCGAGAACCAGACACCC AGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGCGAGCGCAu'GAAGCGAu'C GAGGAGGGCAu'CAAGGAGCu'GGGCGAGCCAGAu'CCu'GAAGGA GCACCCCGu'GGAGAACACCCAGCu'GCAGAACGAGAAGCu'Gu' ACCu'Gu'ACu'ACCu'GCAGAACGGCCGCGACAu'Gu'ACGu'GGAC CAGGAGCu'GGACAu'CAACCGCCu'GAGCGACu'ACGACGu'GGA CCACAu'CGu'GCCCCAGAGCu'u'CCu'GAAGGACGACAGCAu'CG ACAACAAGGu'GGu'GACCCGCGAGCGACAAGAACC CGGCAAGA GCGACAACGu'GCCAGCGAGGAGGu'GGu'GAAGAAGAu'GAAG AACu'ACu'GGCGCCAGCu'GGu'GAACGCCAAGCu'GAu'CACCCA GCGCAAGu'u'CGACAACCu'GACCAAGGCCGAGCGCGGCGGCCu 'GAGCGAGCu'GGACAAGGCCGGCu'u'CAu'CAAGCGCCAGCu'GG u'GGAGACACGCCAGAu'CACCAAGCACGu'GGCCAGAu'CCu'G GACAGCCGCAu'GAACACCAAGu'ACGACGAGAACGACAAGCu' GAu'CCGCGAGGu'GAAGGu'GAu'CACCCu'CAAGAGCAAGCu'GG u'GAGCGACu'u'CCGCAAGGACu'u'CCAGu'u'Cu'ACAAGGu'GCG CGAGAu'CAACAACu'ACCACCACGCCCACGACGCCu'ACCu'GAA CGCCGu'GGu'GGGCAACGCCCu'GAu'CAAGAAGu'ACCCCAAGCu 'GGAGAGCGAGu'u'CGu'Gu'ACGGCGACu'ACAAGGu'Gu'ACGAC Gu'GCGCAAGAu'GAu'CGCCAAGAGCGAGCAGGAGAu'CGGCAA GGCCACCGCCAAGu'ACu'u'Cu'u'Cu'ACAGCAACAu'CAu'GAACu' u'Cu'u'CAAGACCGAGAu'CACCCu'GGCCAACGGCGAGAu'CCGC AAGCGCCCCu'GAu'CGAGACAAACGGCGAGACAGGCGAGAu' CGu'Gu'GGGACAAGGGCCGCGACu'u'CGCCACCGu'GCGCAAGG u'GGu'GAGCAu'GCCCCAGGu'GAACAu'CGu'GAAGAAGACCGAG Gu'GCAGACCGGCGGGu'u'GAGCAAGGAGAGCAu'CCu'GCCCCA GCGCAACAGCGACAAGCu'GAu'CGCCCGCAAGAAGGACu'GGG ACCCCAAGAAGu'ACGGCGGGu'u'CGACAGCCCCACCGu'GGCCu 'ACAGCGu'GGu'GGu'GGu'GGCCAAGGu'GGAGAAGGGCAAGAG CAAGAAGCu'CAAGAGCGu'GAAGGAGCu'GGu'GGGCAu'CACCA			

10

20

30

40

【0570】

【表 10 - 10】

u'CAu'GGAGCGCAGCAGCu'u'CGAGAAGAACCCCAu'CGACu'u'C Cu'GGAGGCCAAGGGCu'ACAAGGAGGu'GAAGAAGGACCu'GAu' CAu'CAAGCu'GCCCCAu'ACAGCCu'Gu'u'CGAGCu'GGAGAACG GCCGCAAGCGCAu'Gcu'GGCCAGCGCCGGCGAGCu'GCAGAAGG GCAACGAGCu'GGCCCu'GCCCAGCAAGu'ACGu'GAACu'u'CCu'G u'ACCu'GGCCAGCCACu'ACGAGAAGCu'GAAGGGCAGCCCCGA GGACAACGAGCAGAAGCAGCu'Gu'u'CGu'GGAGCAGCACAAAGC ACu'ACCu'GGACGAGAu'CAu'CGAGCAGAu'CAGCGAGu'u'CAGC AAGCGCGu'GAu'CCu'GGCCGACGCCAACCu'GGACAAGGu'Gcu' GAGCGCCu'ACAACAAGCACCAGCGACAAGCCCAu'CCGCGAGCA GGCCGAGAACAu'CAu'CCACCu'Gu'u'CACCCu'GACCAACCu'GG GCGCCCCCGCCGCCu'u'CAAGu'ACu'u'CGACACCACCAu'CGACC GCAAGCGCu'ACACCAGCACCAAGGAGGu'Gcu'GGACGCCACCC u'GAu'CCACCAGAGCAu'CACCGGCCu'Gu'ACGAGACACGCAu'C GACCu'GAGCCAGCu'GGCGGGCGACGAGGGCGCCGACAAGCGC ACCGCCGACGGCAGCGAGu'u'CGAGAGCCCCAAGAAGAAGCGC AAGGu'Gu'AAAGu'Gu'CCAGACCAu'u'Gu'Cu'u'CCAACCCAGCu 'GGCCu'Cu'AGAACACCCACu'GGCCAGu'CCu'AGAGCu'CCu'Gu' CCCu'ACCCACu'Cu'u'Gcu'ACAAu'AAAu'Gcu'GAAu'GAAu'CC Au'Cu'AGA			10
ETPGTSESATPESSGSSGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYK VPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRY TRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIF GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDDSTDKADLRLIYLALAHMIKF RGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKA ILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD LAEDAKLQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILL SDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYK EIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTCELLVKLN REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIE KILTRFIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGAS AQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT LFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLIN GIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAICKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGSGILKEHPVENTQ LQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYVDHIVPQSFLKD DSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT QRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYYHH AHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQ EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW DKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGSKKLKSVKEL LGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGR	タンバ ク質	702	20
			30
			40

【0571】

【表 10 - 11】

	KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH PIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDEGADKRTADGSEFESPKK KRKV		
5'UTR	AGGACu'CCu'CCCCAu'CCu'Cu'CCCu'Cu'Gu'CCCu'Cu'Gu'CCCu'C u'GACCCu'GCACu'Gu'CCCAGCACC	mRNA	703
TadA	Au'GAGCGAGGu'GGAGu'u'CAGCCACGAGu'ACu'GGAu'GCGCCA CGCCCu'GACCCu'GGCCAAGCGCGCCCGCGACGAGCGCGAGGu' GCCCCu'GGGCGCCGu'GCu'GGu'GCu'GAACAACCGCGu'GAu'CG GCGAGGGCu'GGAACCGCGCCAu'CGGCCu'GCACGACCCACCG CCCACGCCGAGAu'CAu'GGCCCu'GCGCCAGGGCGGCCu'GGu'G Au'GCAGAACu'ACCGCCu'GAu'CGACGCCACCCu'Gu'ACGu'GAC Cu'u'CGAGCCCu'GCGu'GAu'Gu'GCGCCGGCGCCAu'GAu'CCACA GCCGAu'CGGCCCGGu'GGu'Gu'u'CGGCGu'GCGCAACGCCAAG ACCGGCGCCGCCGCGCAGCCu'GAu'GGACGu'GCu'GCACCACCCC GGCAu'GAACCACCGGu'GGAGAu'CACCGAGGGCAu'CCu'GGC CGACGAGu'GCGCCGCCCu'GCu'Gu'GCCGCu'u'Cu'u'CCGCAu'GC CCCGCCCGGu'Gu'u'CAACGCCAGAGAAGGCCAGAGCAGCA CCGAC	mRNA	704
	MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEG WNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCV MCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEI TEGILADECAALLCRFFRMPRRVFNAQKKAQSSTD	タンバ ク質	705
TadA と Cas9 ニ ッカー ゼとの 間のリ ンカー	AGCGGCGGCAGCAGCGCGGCAGCAGCGGCAGCGAGACACCC GGCACCAGCGAGAGCGCCACCCCGAGAGCAGCGGCGGCAGC AGCGGCGGCAGC	mRNA	692
	SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS	タンバ ク質	693
Cas9 ニ ッカー ゼ	GACAAGAAGu'ACAGCAu'CGGCCu'GGCCAu'CGGCACCAACAG CGu'GGGCu'GGGCCu'GAu'CACCGACGAGu'ACAAGGu'GCCCCA GCAAGAAGu'u'CAAGGu'GCu'GGGCAACACCGACCGCCACAGC Au'CAAGAAGAACCu'GAu'CGGCGCCCu'GCu'Gu'u'CGACAGCGG CGAGACAGCCGAGGCCACCCGCCu'GAAGCGCACCGCCCGCCG CCGCu'ACACCCGCCGCAAGAACCGCAu'Cu'GCu'ACCu'GCAGGA GAu'Cu'u'CAGCAACGAGAu'GGCCAAGGu'GGACGACAGCu'u'Cu 'u'CCACCGCCu'GGAGGAGAGCu'u'CCu'GGu'GGAGGAGGACAA GAAGCACGAGCGCCACCCCAu'Cu'u'CGGCAACAu'CGu'GGACG AGGu'GGCCu'ACCACGAGAAGu'ACCCCAACAu'Cu'ACCACCu'G CGCAAGAAGCu'GGu'GGACAGCACCGACAAGGCCGACCu'GCGC Cu'GAu'Cu'ACCu'GGCCCu'GGCCCAu'GAu'CAAGu'u'CCGCGG CCACu'u'CCu'GAu'CGAGGGCGACCu'GAACCCCGACAACAGCG ACGu'GGACAAGCu'Gu'u'CAu'CCAGCu'GGu'GCAGACCu'ACAAC CAGCu'Gu'u'CGAGGAGAACCCCAu'CAACGCCAGCGGCGu'GGA CGCCAAGGCCAu'CCu'GAGCGCCCGCCu'GAGCAAGAGCCGCGG CCu'GGAGAACCu'GAu'CGCCAGCu'GCCCCGCGAGAAGAAGA ACGGCCu'Gu'u'CGGCAACCu'GAu'CGCCCu'GAGCCu'GGGCCu'G	mRNA	706

【0572】

10

20

30

40

50

【表 10 - 12】

ACCCCCAACu'u'CAAGAGCAACu'u'CGACCu'GGCCGAGGACGC CAAGCu'GCAGCu'GAGCAAGGACACCu'ACGACGACGACCu'GG ACAACCu'GGu'GGCCAGAu'CGGCGACCAGu'ACGCCGACCu'Gu 'u'CCu'GGCCGCCAAGAACCu'GAGCGACGCCAu'CCu'GGu'GAGC GACu'CCu'GCGCGu'GAACACCGAGAu'CACCAAGGCCCCCu' GAGCGCCAGCAu'GAu'CAAGCGCu'ACGACGAGCACCACCAGGA CCu'GACCCu'GGu'GAAGGCCCu'GGu'GCGCCAGCAGCu'GCCCG AGAGu'ACAAGGAGAu'Cu'u'Cu'u'CGACCAGAGCAAGAACGGC u'ACGCCGGCu'ACu'CGACGGCGGCCAGCCAGGAGAGu'u' Cu'ACAAGu'u'CAu'CAAGCCCAu'CCu'GGAGAAGAu'GGACGGCA CCGAGGAGCu'GGu'GGu'GAAGCu'GAACCGCGAGGACCu'GGu'G CGCAAGCAGCGCACCu'u'CGACAACGGCAGCAu'CCCCACCAG Au'CCACCu'GGGCGAGCu'GCACGCCAu'CCu'GCGCCGCCAGGA GGACu'u'Cu'ACCCCu'u'CCu'GAAGGACAACCGCGAGAAGAu'CG AGAAGAu'CCu'GACCu'u'CCGCAu'CCCu'ACu'ACGu'GGGCCCC Cu'GGCCCGCGCAACAGCCCGCu'u'CGCCu'GGAu'GACCCGCAA GAGCGAGGAGACAAu'CACCCCu'GGAACu'u'CGAGGAGGu'GG u'GGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCu'u'CAu'CGAGCGCAu'G ACCAACu'u'CGACAAGAACCu'GCCCAACGAGAAGGu'GGu'GCC CAAGCAGCCu'GGu'Gu'ACGAGu'ACu'u'CACCGu'Gu'ACAACG AGCu'GACCAAGGu'GAAGu'ACGu'GACCGAGGGCAu'GCGCAAG CCCGCCu'u'CCu'GAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAu'CGu'GGA CCu'GGu'Gu'u'CAAGACCAACCGCAAGGu'GACCGu'GAAGCAGC u'GAAGGAGGACu'ACu'u'CAAGAAGAu'CGAGu'GGu'u'CGACAG CGu'GGAGAu'GAGCGGCGu'GGAGGACCGCu'u'CAACGCCAGCC u'GGGCACCu'ACCACGACCu'GGu'GAAGAu'CAu'CAAGGACAAG GACu'u'CCu'GGACAACGAGGAGAACGAGGACAu'CCu'GGAGGA CAu'CGu'GGu'GACCCu'GACCCu'Gu'u'CGAGGACCGCGAGAu'GA u'CGAGGAGCGCCu'GAAGACCu'ACGCCACCu'Gu'u'CGACGAC AAGGu'GAu'GAAGCAGCu'GAAGCGCCGCCCu'ACACCGGCu'G GGGCCGCCu'GAGCCGCAAGCu'GAu'CAACGGCAu'CCGCGACA AGCAGAGCGGCAAGACCAu'CCu'GGACu'u'CCu'CAAGAGCGAC GGCu'u'CGCCAACCGCAACu'u'CAu'GCAGCu'GAu'CCACGACGA CAGCCu'GACCu'u'CAAGGAGGACAu'CCAGAAGGCCAGGu'GA GCGGCCAGGGGACAGCCu'GCACGAGCACAu'CGCCAACCu'GG CCGCAGCCCCGCCAu'CAAGAAGGGCAu'CCu'GCAGACCGu'GA AGGu'GGu'GGACGAGCu'GGu'GAAGGu'GAu'GGGCCGCCACAAG CCCGAGAACu'CGu'GAu'CGAGAu'GGCCCGCGAGAACCAGAC CACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGCGAGCGAu'GAAGCG CAu'CGAGGAGGGCAu'CAAGGAGCu'GGGCAGCCAGAu'CCu'GA AGGAGCACCCCGu'GGAGAACACCCAGCu'GCAGAACGAGAAGC u'Gu'ACCu'Gu'ACu'ACCu'GCAGAACGGCCGCGACAu'Gu'ACGu' GGACCAGGAGCu'GGACAu'CAACCGCCu'GAGCGACu'ACGACGu 'GGACCACAu'CGu'GCCCCAGAGCu'u'CCu'GAAGGACGACAGCA u'CGACAACAAGGu'GGu'GACCCGCGAGCGACAAGAACCAGCGCA AGAGCGACAACGu'GCCAGCGAGGAGGu'GGu'GAAGAAGAu'G AAGAACu'ACu'GGCGCCAGCu'GGu'GAACGCCAAGCu'GAu'CAC CCAGCGCAAGu'u'CGACAACCu'GACCAAGGCCGAGCGCGCGCG	10
AGAGCGACAACGu'GCCAGCGAGGAGGu'GGu'GAAGAAGAu'G AAGAACu'ACu'GGCGCCAGCu'GGu'GAACGCCAAGCu'GAu'CAC CCAGCGCAAGu'u'CGACAACCu'GACCAAGGCCGAGCGCGCGCG	40

【0573】

10

20

30

40

50

【表 10 - 13】

CCu'GAGCGAGCu'GGACAAGGCCGGCu'u'CAu'CAAGCGCCAGCu 'GGu'GGAGACACGCCAGAu'CACCAAGCACGu'GGCCAGAu'CC u'GGACAGCCGCAu'GAACACCAAGu'ACGACGAGAACGACAAG Cu'GAu'CCGCGAGGu'GAAGGu'GAu'CACCCu'CAAGAGCAAGCu' GGu'GAGCGACu'u'CCGCAAGGACu'u'CCAGu'u'Cu'ACAAGGu'G CGCGAGAu'CAACAACu'ACCACCACGCCACGACGCCu'ACCu'G AACGCCGu'GGu'GGGCACCGCCCu'GAu'CAAGAAGu'ACCCCAA GCu'GGAGAGCGAGu'u'CGu'Gu'ACGGCGACu'ACAAGGu'Gu'AC GACGu'GCGCAAGAu'GAu'CGCCAAGAGCGAGCAGGAGAu'CGG CAAGGCCACCGCCAAGu'ACu'u'Cu'u'Cu'ACAGCAACAu'CAu'GA ACu'u'Cu'u'CAAGACCGAGAu'CACCCu'GGCCAACGGCGAGAu'C CGCAAGCGCCCCCu'GAu'CGAGACAAACGGCGAGACAGGCGAG Au'CGu'Gu'GGGACAAGGGCCGCGACu'u'CGCCACCGu'GCGCAA GGu'GGu'GAGCAu'GCCCCAGGu'GAACAu'CGu'GAAGAAGACCG AGGu'GCAGACCGGCGGCu'u'GAGCAAGGAGAGCAu'CCu'GCCC AAGCGCAACAGCGACAAGCu'GAu'CGCCCGCAAGAAGGACu'G GGACCCCAAGAAGu'ACGGCGGCu'u'CGACAGCCCCACCGu'GGC Cu'ACAGCGu'GGu'GGu'GGu'GGCCAAGGu'GGAGAAGGGCAAGA GCAAGAAGCu'CAAGAGCGu'GAAGGAGCu'GGu'GGGCAu'CAAC Au'CAu'GGAGCGCAGCAGCu'u'CGAGAAGAACCCCAu'CGACu'u' CCu'GGAGGCCAAGGGCu'ACAAGGAGGu'GAAGAAGGACCu'GA u'CAu'CAAGCu'GCCCCAAGu'ACAGCCu'Gu'u'CGAGCu'GGAGAAC GGCCGCAAGCGCAu'GGu'GGCCAGCGCCGCGAGCu'GCAGAAG GGCAACGAGCu'GGCCCu'GCCCAGCAAGu'ACGu'GAACu'u'CCu' Gu'ACCu'GGCCAGCCACu'ACGAGAAGCu'GAAGGGCAGCCCCG AGGACAACGAGCAGAAGCAGCu'Gu'u'CGu'GGAGCAGCACAAG CACu'ACCu'GGACGAGAu'CAu'CGAGCAGAu'GAGCGAGu'u'GAG CAAGCGCu'GAu'CCu'GGCCGACGCCAACCu'GGACAAGGu'GGu' 'GAGCGCCu'ACAACAAGCACCGCGACAAGCCCAu'CCGCGAGC AGGCCGAGAACu'CAu'CCACCu'Gu'u'CACCCu'GACCAACCu'G GGCGCCCCCGCCGCCu'u'CAAGu'ACu'u'CGACACCACCAu'CGAC CGCAAGCGCu'ACACCAGCACCAAGGAGGu'GGu'GGACGCCACC Cu'GAu'CCACCAGAGCAu'CAACGGCCu'Gu'ACGAGACACGCAu' CGACCu'GAGCCAGCu'GGGCGGCGAC			
DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKN LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK VDDSEFFHRLSEESFLVEEDKKHERHPFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL RKKLVDDSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVK LFIQLVQTYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLP GEKKNGFLGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDL DNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMI KRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGG ASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPH QIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPN EKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIV DLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYH DLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHL	タンパ ク質	707	

【0574】

10

20

30

40

【表 10-14】

	FDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDG FANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPA KKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNS RERMKRIEELGKELGSQLKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDM YVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT LKSCLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA PKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFF KTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQV NIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPT VAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEA KGYKEVKKDLIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFLYLASHYEKLKGPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISE FSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAP AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLHQSITGLYETRIDLSQLGGD		
Cas9 ニ ッカー ゼと NLS と の間の リンカ ー	GAGGGCGCCGAC	mRNA	696
	EGAD	タンパ ク質	697
核局在 化配列 (NLS)	AAGCGCACCGCCGACGGCAGCGAGu'u'CGAGAGCCCCAAGAAG AAGCGCAAGGu'G	mRNA	708
	KRTADGSEFESPKKKRKV	タンパ ク質	709
3'UTR	AGu'Gu'CCAGACCAu'u'Gu'Cu'u'CCAACCCAGCu'GGCCu'Cu'AG AACACCCACu'GGCCAGu'CCu'AGAGCu'CCu'Gu'CCCu'ACCCACu 'Cu'u'u'GCu'ACAAu'AAAu'GCu'GAAu'GAAu'CCAu'Cu'AGA	mRNA	710
nCas9 構成要素のアミノ酸位置 691 及び 1135 における変異及びそれらの対応するヌクレオチ ド配列は、太字及び下線で示される。 u':N ¹ -メチルシュドウリジン 5'UTR 内の第 1 のヌクレオチドは、2'-O-メチル改変を有する。			

10

20

30

【0575】

実施例 14. 例示的な LNP 製剤

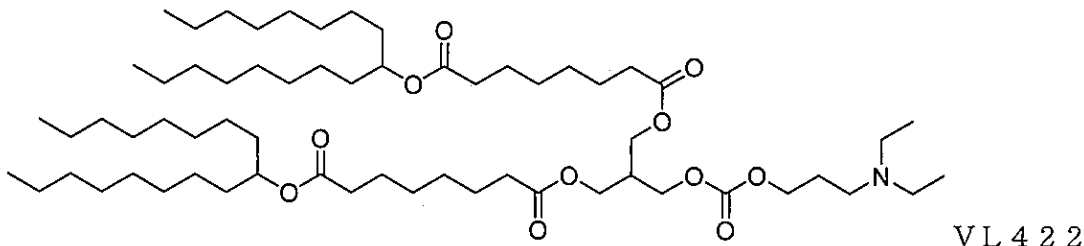
【0558】LNP 製剤を表 11 に示す。7-95~7-98、及び 7-109~7-111 を除き、GalNAc-脂質として 1004 を使用する、GalNAc-LNP 製剤のパラメータ及び特性。7-95 は 1044 であった。7-96 及び 7-109 は 1002 であった。7-97 及び 7-110 は 1014 であった。並びに 7-98 及び 7-111 は 1078 であった。1004 又は別の示された GalNAc-脂質を、示された後添加が使用された場合を除き、エタノール中の脂質（例えば、イオン化可能な脂質、ステルス脂質及びヘルパー脂質）の混合物の製剤化プロセスに添加した。アミノ脂質 502 を、アミノ脂質 VL422 を使用した 7-78、及び 7-80~7-86 を除く全ての LNP ID に使用した。LNP 組成は、全ての実施例において様々である。LNP 調製には、異なる pH で選択された異なる製剤緩衝液を使用した。最終製剤緩衝液の pH は 6~8 の範囲に維持された。7-64、7-65、7-87~7-98、及び使用した gRNA が

40

50

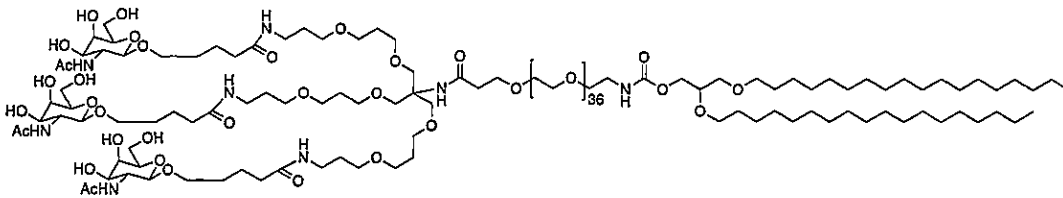
gRNA GA260であった7-105~7-111、及びgRNA GA257を使用した7-78~7-86を除き、全てのGalNAc-LNPは、1:1の重量比でmRNA MA004及びgRNA GA256を保有していた。LNP7-77の調製には、交差混合及びTFFを使用した。

【化25】



10

VL422



1044

【0576】

[0559]脂質混合物添加方法は、脂質混合物（イオン化可能な脂質、ステルス脂質、及びヘルパー脂質を含むが、これらに限定されない）を混合チャンバに送達するために1つのチャンネル／ラインを使用した方法を指すことを理解されたい。GalNAc-脂質1004は、LNP中のGalNAc-脂質の最終モル%が0.01~10%の範囲であるように、脂質賦形剤チャンネルに含まれていた。第2のチャンネル／ラインを使用して、水溶液（限定されないが、ガイドRNA及びmRNAを含む）に溶解されたカーゴを送達した。脂質及びRNAチャンネルを、所望の幾何形状（例えば、とりわけ、Tミキサー、クロスミキサー）の混合デバイス内で混合した。次いで、希釈緩衝液を下流の第2のミキサー（とりわけ、Tミキサー、クロスミキサー）を介して、得られたエタノール／水性混合物に導入し、所望のLNPを生成した。このようにして生成されたLNPを1分間~120分間静置した後、緩衝液を最終製剤緩衝液に交換して保存した。緩衝液交換は、PD-10カラム、透析、又はTFFを介して行った。

20

30

【0577】

[0560]インライン希釈方法は、1つのチャンネルが脂質混合物（イオン化可能な脂質、ステルス脂質、ヘルパー脂質などを含むが、これらに限定されない）を送達する方法を指すことが理解されるべきである。第2のチャンネル／ラインを使用して、水溶液（限定されないが、ガイドRNA及びmRNAを含む）に溶解されたカーゴを送達した。脂質及びRNAチャンネルを、所望の幾何形状（例えば、とりわけ、Tミキサー、クロスミキサー）の混合デバイス内で混合する。GalNAc-脂質1004は、LNP中のGalNAc-脂質の最終モル%が0.01~10%の範囲であるように、希釈緩衝液に含まれていた。次いで、所望の量のGalNAc-脂質を含有する希釈緩衝液を、第3のチャンネルを介して、得られたエタノール／水性混合物に直ちに導入して、所望のLNPを生成した。LNPを1分間~120分間静置した後、緩衝液を最終製剤緩衝液に交換して保存した。緩衝液交換は、PD-10カラム、透析、又はTFFを介して行った。

40

【0578】

【表 1 1 - 1】

表 1 1

LNP ID	賦形剤 mol% 502/コレステロール /DSPC/507/1004	薬物製 品緩衝 液	保存	Z 平均 (nm)	PDI	封入(%)	1004 添加 方法
7-42	55/38.4/4.7/1.6/0.3	Tris	2-4C	105.405	0.082	95.57	インライン 希釈
7-43	55/37.7/4.7/2.1/0.5	Tris	2-4C	89.59	0.048	95.16	インライン 希釈
7-44	55/38.6/4.7/1.6/0.1	PBS	2-4C	96.47	0.021	94.48	脂質混合物
7-45	55/38.5/4.7/1.6/0.2	PBS	2-4C	90.54	0.094	94.76	脂質混合物
7-46	55/38.4/4.7/1.6/0.3	PBS	2-4C	92.28	0.077	95.35	脂質混合物
7-47	55/38.3/4.7/1.6/0.4	PBS	2-4C	92.03	0.01	95.6	脂質混合物
7-48	55/38.2/4.7/1.6/0.5	PBS	2-4C	83.4	0.065	94.99	脂質混合物
7-55	55/38.2/4.7/2.1/0.5	PBS	2-4C	88.37	0.051	95.1	脂質混合物
7-49	55/38.6/4.7/1.6/0.1	PBS	2-4C	124.1	0.0918	93.6	後添加
7-50	55/38.65/4.7/1.6/0.05	PBS	2-4C	138	0.1133	93.4	脂質混合物
7-51	55/38.95/4.7/1.3/0.05	PBS	2-4C	117.7	0.01225	92.8	脂質混合物
7-52	55/38.9/4.7/1.3/0.1	PBS	2-4C	133.2	0.04513	91.4	脂質混合物
7-53	55/38.8/4.7/1.3/0.2	PBS	2-4C	117.2	0.02134	93.5	脂質混合物
7-54	55/38.7/4.7/1.3/0.3	PBS	2-4C	107	0.0641	93.4	脂質混合物
7-56	55/38.15/4.7/2.1/0.05	PBS	2-4C	73.8	0.01	95.14	脂質混合物
7-57	55/38.675/4.7/1.6/0.025	PBS	2-4C	86.04	0.022	94.18	脂質混合物
7-58	55/38.69/4.7/1.6/0.01	PBS	2-4C	87.2	0.036	93.9	脂質混合物
7-59	55/38.975/4.7/1.3/0.025	PBS	2-4C	93.24	0.06	93.91	脂質混合物
7-64	55/38.65/4.7/1.6/0.05	PBS	2-4C	103.4	0.01883	95.97	脂質混合物
7-65	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	102.2	0.01135	92.55	脂質混合物
7-66	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	101	0.05521	95.51	脂質混合物
7-67	55/37.25/4.7/3/0.05	Tris	2-4C	91.23	0.03484	90.36	脂質混合物
7-68	52.4/34.55/10/3/0.05	Tris	2-4C	86.79	0.04927	91.13	脂質混合物
7-69	55/38.15/4.7/3/0.05	Tris	2-4C	103.5	0.007838	89.49	脂質混合物
7-70	52.4/34.55/10/3/0.05	Tris	2-4C	70.94	0.07394	93.09	脂質混合物
7-71	50/37.95/9/3/0.05	Tris	2-4C	72.3	0.04853	92.23	脂質混合物
7-72	47/40.95/9/3/0.05	Tris	2-4C	66.33	0.05201	92.98	脂質混合物
7-74	50/37.95/9/3/0.05	Tris	2-4C	67.91	0.08725	91.48	脂質混合物
7-75	50/37.95/9/3/0.05	Tris	2-4C	82.7	0.2582	91.36	脂質混合物
7-77	50/37.95/9/3/0.05	Tris	2-4C	70.22	0.06838	91.57	脂質混合物
7-78	50/38/9/3/0	Tris	2-4C	66.85	0.06473	93.53	対照
7-79	50/37.95/9/3/0.05	Tris	2-4C	70.9	0.1017	95.23	脂質混合物
7-80	50/37.99/9/3/0.01	Tris	2-4C	66.91	0.05535	93.6	脂質混合物
7-81	50/37.95/9/3/0.05	Tris	2-4C	66.96	0.05259	93.89	脂質混合物
7-82	50/37.9/9/3/0.1	Tris	2-4C	65.32	0.05412	93.28	脂質混合物
7-83	50/37.7/9/3/0.3	Tris	2-4C	64.83	0.07319	93.33	脂質混合物

【 0 5 7 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

7-84	50/37.5/9/3/0.5	Tris	2-4C	63	0.09219	93.21	脂質混合物
7-85	50/37/9/3/1	Tris	2-4C	62.7	0.1178	92.19	脂質混合物
7-86	50/36/9/3/2	Tris	2-4C	60.86	0.06607	91.41	脂質混合物
7-87	55/38.2/4.7/2.1/0	Tris	2-4C	106.6	0.008889	94.85	対照
7-88	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	120.6	0.01052	94.27	後添加
7-89	55/37.7/4.7/2.1/0.5	Tris	2-4C	92.61	0.01561	95.7	後添加
7-90	55/38.19/4.7/2.1/0.01	Tris	2-4C	98.35	0.01628	95.01	脂質混合物
7-91	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	98.61	0.01343	94.91	脂質混合物
7-92	55/37.95/4.7/2.1/0.25	Tris	2-4C	95.98	0.01044	95.84	脂質混合物
7-93	55/37.7/4.7/2.1/0.5	Tris	2-4C	89.63	0.02471	96.15	脂質混合物
7-94	55/37.2/4.7/2.1/1	Tris	2-4C	84.69	0.02132	95.28	脂質混合物
7-95	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	100.4	0.0228	94.27	脂質混合物
7-96	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	100.6	0.007328	95.09	脂質混合物
7-97	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	94.89	0.02021	94.41	脂質混合物
7-98	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	94.82	0.01814	94.86	脂質混合物
7-105	55/38.2/4.7/2.1/0	Tris	2-4C	99.27	0.02149	91.7	対照
7-106	55/38.2/4.7/2.1/0	Tris	2-4C	107.6	0.003511	93.20	対照
7-107	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	100.4	0.0343	93.59	脂質混合物
7-108	55/37.7/4.7/2.1/0.5	Tris	2-4C	93.59	0.04789	92.33	脂質混合物
7-109	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	100.6	0.0288	92.48	脂質混合物
7-110	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	98.78	0.03208	92.86	脂質混合物
7-111	55/38.15/4.7/2.1/0.05	Tris	2-4C	100.9	0.002	92.65	脂質混合物
7-112	47.1/46.1/4.7/2.1/0	PBS	2-4C	85.5	0.0313	96.3	対照
7-113	55/38.2/4.7/2.1/0	PBS	2-4C	84.8	0.0263	96.7	対照
7-114	55/38.2/4.7/2.1/0	PBS	2-4C	90.35	0.01	96.4	対照
7-115	55/38.2/4.7/2.1/0	PBS	2-4C	87.21	0.0077	94.10	対照
7-116	55/38.6/4.7/1.6/0.1	PBS	2-4C	107.5	0.297	94.00	脂質混合物
7-117	55/38.2/4.7/2.1/0	PBS	2-4C	89	0.01	93.74	対照
7-118	55/38.65/4.7/1.6/0.05	PBS	2-4C	83.2	0.024	94.26	脂質混合物
7-119	55/38.95/4.7/1.3/0.05	PBS	2-4C	94.8	0.06	93.33	脂質混合物
7-120	55/38.2/4.7/2.1/0	PBS	2-4C	89.77	0.03029	93.32	対照
7-121	55/38.65/4.7/1.6/0.05	PBS	2-4C	101.1	0.03086	92.21	脂質混合物
7-122	55/38.2/4.7/2.1/0	Tris	2-4C	104.7	0.01344	90.52	対照
7-123	55/37.3/4.7/3/0	Tris	2-4C	90.9	0.03435	90.91	対照
7-124	52.4/34.6/10/3/0	Tris	2-4C	87.66	0.01843	91.54	対照
7-125	55/38.15/4.7/2.1/0.05	PBS	2-4C	82.07	0.02038	96.00	脂質混合物
7-126	55/38.2/4.7/2.1/0	Tris	2-4C	103.7	0.01282	90.98	対照
7-127	52.4/34.6/10/3/0	Tris	2-4C	71.56	0.03463	93.43	対照
7-128	50/38/9/3/0	Tris	2-4C	72.09	0.03283	92.57	対照
7-129	47/41/9/3/0	Tris	2-4C	64.48	0.07433	93.88	対照
7-130	50/38/9/3/0	Tris	2-4C	67.24	0.07985	90.26	対照

【0 5 8 0】

10

20

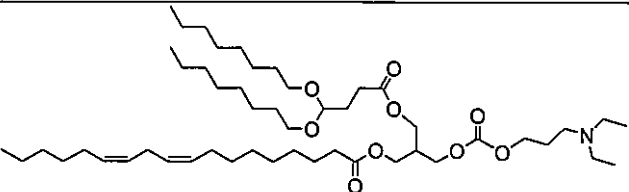
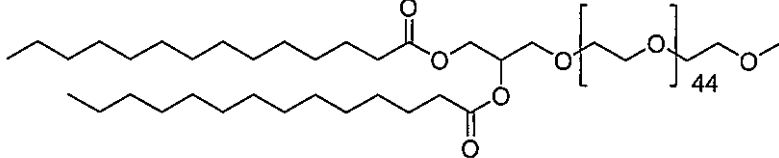
30

40

50

【表 1 2】

表 1 3. LNP 調製物に使用される脂質及び PEG-脂質賦形剤

化合物 番号	構造
502	
507	

10

【0581】

方法

【0562】初代肝細胞のプレATING、培養、及びトランスフェクション。

【0563】BioIVTからの初代ヒト肝臓肝細胞（PHH）及び初代カニクイザル肝臓肝細胞（PCH）を、製造者のプロトコルに従って培養した。簡潔に述べると、初代ヒト肝細胞及び初代カニクイザル肝細胞を、BioIVTから凍結アリコートとして得た。識別されていない個々のドナーにそれぞれ由来する2つのロットの初代ヒト肝細胞を実験に使用した。STLを初期スクリーニング実験に使用し、IRZを効力用量応答及びオフターゲット実験に使用した。初代カニクイザル肝細胞を用いた実験には、UMPロットを使用した。製造業者の指示に従って、細胞を解凍し、予め加熱しておいたINVITROGROHT培地ですすぎ、その後、50gで5分間（PCHの場合）又は100gで10分間（PCHの場合）、4℃で遠心分離した。上清を廃棄し、ペレット化した細胞をプレATING培地であるINVITROGROCPに再懸濁させ、プレATINGされたか、又は一晩ウシコラーゲンでコーティングされた24ウェルプレート又は48ウェルプレートのいずれかにプレATINGした。各24ウェルプレートについて、1バイアルの細胞を使用して、およそ350,000細胞／ウェルの密度を達成し、各48ウェルプレートの場合、2バイアルの細胞を使用して、およそ200,000細胞／ウェルの密度を達成した。プレATINGした細胞を、37℃及び5%CO₂雰囲気下での組織培養インキュベーター中で少なくとも4時間であるが最大24時間までの時間放置し、接着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成について確認した。次いで、インキュベーション培地を、新鮮な肝細胞維持培地（完全INVITROGRO培地）と交換した。したがって、細胞は、トランスフェクションの準備ができた。細胞を、リポフェクタミントランスフェクション剤を使用するか、又はLNPのいずれかでトランスフェクションした。

20

30

【0582】

【0564】初代肝細胞のトランスフェクションのためにリポフェクタミン試薬MessengerMax（ThermoFisher）を使用する場合、gRNA又はgRDNAを、1,250～5,000ng/mLの範囲の全RNAの用量で、以下を介して同量のインビトロ転写されたABE8.8 mRNA（分子量による比1：1）と共トランスフェクションした。溶液A：所望の量のガイドRNA又はガイドRDNAを、OptiMEM中のmRNAの1：1重量比と混合した。溶液B：OptiMEM中のMessengerMAXを、室温で10分間インキュベートした。溶液A及びBを混合した後、混合物を室温で5分間インキュベートした。初期のスクリーニング実験では、次いで、この混合物を、用量滴定のためにOptiMEMに1：2で連続的に希釈した。いずれにせよ、それぞれの溶液60μLを細胞の各ウェルに滴下した。次いで、細胞を37℃で3日間維持

40

50

した。細胞を採取し、製造業者の指示に従って、Thermo Kingfisher (48ウェルプレート実験の場合)又はQiagen DNEasy blood and Tissue Kit (24ウェルプレート実験の場合)のいずれかを使用してゲノムDNA抽出のために調製し、Qubit 3.0 Fluorometerを使用して定量化した。

【0583】

[0565]トランスフェクションも、LNPを用いて行った。所望のLNPを、試験物品の所望の最高用量(10,000~45,000 ng/TA/mL)に依存する濃度で、プレATING前に10%カニクイザル血清を含有するプレATING培地と混合した。必要な場合、この混合物を、培地中に1:1.5又は1:2で連続的に希釈した。LNP希釈混合物を37℃で15分間インキュベートし、次いで、前の培地を吸引した後、45,000~69 ng/TA/mLの範囲の用量で、プレATINGされた細胞に添加した。次いで、細胞を37℃で3日間維持した。細胞を採取し、製造業者の指示に従って、Thermo Kingfisher若しくはPromega Maxwell RSC 48 (48ウェルプレート実験の場合)又はQiagen DNEasy blood and Tissue Kit (6ウェル及び24ウェルプレート実験の場合)のいずれかを使用してゲノムDNA抽出のために調製し、Qubit 3.0 Fluorometerを使用して定量化した。OGMについては、Bionano Genomicの高分子量(HMW)gDNA抽出のためのプロトコルに従ってゲノムDNAを抽出した。1.5×10⁶個の細胞のペレットを40 µLのDNA Stabilizing Buffer中に再懸濁させ、続いてプロテイナーゼK消化、RNase A処理、及び220 µLのLysis and Binding Buffer (LBB)中の溶解を行った。ゲノムDNAを単離し、Nanobind Disksに結合させ、洗浄し、65 µLのElution Bufferによって溶出させた。次いで、ゲノムDNAを一晩均質化し、Qubit Broad Range dsDNA Assay Kitを使用して定量化した。

【0584】

標的化アンプリコン配列決定。

[0567]オンターゲット及びオフターゲット編集を評価するために、10 ngのゲノムDNAインプットを、Q5 HotStartポリメラーゼ (NEB) 及び5' Nexteraアダプターオーバーハング配列を有する (Primer3 v.4.1.0 (<https://primer3.ut.ee/>))により設計された) 標的ゲノム部位に特異的なプライマーを用いるPCR増幅に使用した。プライマー配列は、以下の通りであった。

【0585】

10

20

30

40

50

【表 13】

表12： プライマー配列

種	標的	順方向プライマー名称	順方向プライマー配列 (5'から 3')	配列番号	逆方向プライマー名称	逆方向プライマー配列 (5'から 3')	配列番号
ヒト	オンターゲット	GA0100_O T_B1+	TCGTCGGC AGCGTCAG ATGTGTATA AGAGACAG AATGTGGG AAGATACT TTGAAGA	711	GA0100_O T_B1-	GTCTCGTGG GCTCGGAG ATGTGTATA AGAGACAG CGATTACTG GCAATGTC CCC	714
ヒト	OT1	GA0100_O T_B2+	TCGTCGGC AGCGTCAG ATGTGTATA AGAGACAG CCTGGTCTC CTGTTCACA CT	712	GA0100_O T_B2-	GTCTCGTGG GCTCGGAG ATGTGTATA AGAGACAG AGAAATGG TTTGCTCAG AGGA	715
カニクイザル	オンターゲット	cAN_Ex6_3 _NEXT_F1	TCGTCGGC AGCGTCAG ATGTGTATA AGAGACAG GGGATTCG GATTTTAA AAGTTGTC	713	cAN_Ex6_3 _NEXT_R1	GTCTCGTGG GCTCGGAG ATGTGTATA AGAGACAG CCCAATGC AATCCCGG AAAA	716

10

20

【0586】

[0569] ThermoFisher Sequelprep Normalization Plate KitによるPCRアンプリコンの精製の後に、ユニークデュアルインデックス (UDI) を含有するIlluminaプライマー、Nextera XT Index Kit V2 Set A及び／又はNextera XT Index Kit V2 Set Dを用いたQ5 HotStartポリメラーゼによる第2のラウンドのPCRを行って、バーコード生成ライブラリーを生成した。Sequelprep Normalization Plate Kitによる最終精製の後に、個々のアンプリコンをプールし、Qubit 3.0 Fluorometerを使用して定量化した。変性、8 pMへの希釈、及び30% PhiXによる補充の後、プールされたライブラリーは、Illumina MiSeq Systemで2×150 bpのペアエンド配列決定を受けた。

30

【0587】

[0570] 標的化アンプリコン配列決定データを、バッチモード (CRISPResso Batch) でCRISPResso2 v2.0.31で分析した。ABE実験の場合、以下のパラメータを設定した。「--default_min_aln_score 95 --quantification_window_center 10 --quantification_window_size 10 --base_editor_output --conversion_nuc_from A --conversion_nuc_to G --min_frequency_alleles_around_cut_to_plot 0.1 --max_rows_alleles_around_cut_to_plot 100」。NHP実験の場合、低品質のリードを除外するように、以下の追加のパラメータを設定した。「--min_single_bp_q

40

50

quality 30」。更に、全ての場合で、FLASH推奨 (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) に従って、パラメータ「--max_paired_end_reads_overlap」を $2R - F + 0.25 * F$ に設定し、ここで、Rはリード長であり、Fはアンプリコン長であった。

【0588】

【0571】NHP試料からのオンターゲットデータの場合、及び細胞オンターゲットデータのいくつかの場合に、編集は、「Quantification_window_nucleotide_percentage_table.txt」出力テーブルから、主な編集された位置（プロトスペーサーDNA配列の位置6）における任意のAからG/C/Tの置換をサポートしたリードの割合として定量化した。インデルは、「Alleles_frequency_table_around_sgRNA*.txt」出力テーブルから、30bpを超える欠失をサポートしたリードを除外しつつ、ニック部位の（PAM配列の上流の位置-3における）いずれかの側での5bpウィンドウにわたる挿入又は欠失をサポートしたリードの割合として定量化した。オフターゲット部位（OT1）、及びオンターゲット部位を評価するある特定の事例である編集を、「Alleles_frequency_table_around_sgRNA*.txt」出力テーブルから、30bpを超える欠失を有する対立遺伝子からのリードを除外しつつ、編集ウィンドウ内のA→G置換を有する対立遺伝子（プロトスペーサーのPAM遠位側の位置1~10）からのリードの割合として定量化した。各部位について、最小で1000リードを必要とする、編集ウィンドウにおけるAからGの置換をサポートするリードの割合を合計することによって、塩基編集を定量化した。

【0589】

SureSelect 標的化濃縮配列決定。

【0573】SureSelectパネルを設計し、Agilent Technologiesから購入した。標的濃縮のためのSureSelect RNAプローブのパネルを、Agilent SureDesignモジュールを使用して、インプットとして各側に隣接する追加の150ntゲノム配列とともにONE-seq（GA441及び組換えABE8.8タンパク質を使用する）によって指名された各候補オフターゲット部位プロトスペーサー配列を使用して、設計した。RefSeq、Ensembl、CCDS、Gencode、VEGA、SNP、及びCytoBandデータベースを標的パラメータに使用し、設計には最も厳格なマスキングと3倍のタイリング密度を適用した。

【0590】

【0574】SureSelectを行うために、ゲノムのおよそ60,000コピーを含有する50~150ngのゲノムDNAを、各実験複製物について使用した。これにより、希少な置換事象の検出をサポートするために、1000を超える固有の分子が分析されたことを確実にする。得られたRNAプローブを用い、AgilentのXT HS2プロトコルに従って、SureSelectアッセイを行った。簡潔に述べると、gDNA試料を、Covaris M220集中型超音波発生装置（75Wのピーク入射電力、20%のデューティファクタ、200サイクル／バースト、150秒間）を使用して、180~250bpのサイズ範囲に断片化した。剪断されたgDNA試料を、NGSライブラリー調製ステップ（末端修復、dAテーリング、UMIアダプターライゲーション、全ゲノム増幅、プローブハイブリダイゼーション及び捕捉、並びに捕捉後増幅）に供した。最終的なライブラリー試料を、2×150bpのペアエンド配列決定を用いて、Broad Institute on an Illumina NovaSeq S4によって外部で配列決定した。治療及び対照の各条件について、2つの生物学的複製を行った。

【0591】

【0575】SureSelectデータを分析するために、AgilentのAGENT v2.0.5ツールの「Trimmer」スクリプトを使用して、アダプターをトリミングした。リードを、パラメータ「-C」を用いたBWA MEM v0.7.17-r1188を使用して、GRCh38参照ヒトゲノムにアラインメントした（ftp://

ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCA/000/0001/405/GCA_000001405.15_GRCh38/seqs_for_alignment_pipelines.ucsc_ids/GCA_000001405.15_GRCh38_no_alt_analysis_set.fna)。アラインメントされたリードを処理し、パラメータ「-i-R-IB-OB-U-L」を用いたAgilentのAGeNT v2.0.5ツールにおいて「LocatIt」スクリプトを使用して、重複を除去した。編集ウィンドウ内の各位置（プロトスペーサーのPAM遠位側の位置1～10）におけるヌクレオチド分布は、パラメータ「base-depth-F 3848-Q 30」を用いたperbase v0.6.3 (https://github.com/sstadick/perbase) を使用して決定された。

10

【0592】

【0576】オフターゲット編集の定量化の第1のステップは、各部位の編集ウィンドウにおいてAからGの編集を含有するリードの対立遺伝子合計を計算することによって行われた。このステップに続いて、対立遺伝子リードカウントの差と治療条件との関連を試験した統計学的試験を実施した（治療ラベル対未治療ラベル）。各部位について、最小で1000リードを必要とする、編集ウィンドウにおけるAからGの置換をサポートするリードの割合を合計することによって、塩基編集を定量化した。正味の編集（治療されたものの編集%の平均から、未治療のものの編集%の平均を差し引いたもの）を、編集の効果サイズの尺度として計算した。

20

【0593】

【0577】次に、以下のように、治療ベクトル治療_i（治療された=1、対照=0）を使用して、編集されたリードの割合に基づいてlogオッズ比をモデリングするロジスティック回帰モデルから導出されたP値を使用して、治療試料及び対照試料にわたる編集を、有意性について評価した。

$$\log \pi_{i1} - \pi_i = \beta_0 + \beta_1 * \text{治療}_i \quad \log \pi_{i1} - \pi_i = \beta_0 + \beta_1 * \text{治療}_i$$

【0594】

【0578】ロジスティック回帰モデルを、各部位についてフィッティングし、結果（logオッズ）が治療ベクトルと関連する（すなわち、帰無仮説が $\beta_1 = 0$ である）場合、有意性計算が検定される。P値が0.05以下である部位、及び対照試料中の編集レベルが0.1%未満である部位は、オフターゲット部位として示される。

30

【0595】

脂質ナノ粒子製剤及び分析。

【0580】使用したLNPは、既に記載されているように製剤化され（Conway, A. et al. 2019 Mol. Ther. 27, 866–877、Villiger, L. et al. 2021 Nat. Biomed. Eng. 5, 179–189）、（1）個々のペイロードのためにある程度最適化された、製造業者のプロトコルに従うPrecision Nanosystems NanoAssemblerシステムを使用したマイクロ流体混合によって、又は（2）有機溶媒中の脂質賦形剤の溶液及びgRNA及びmRNAの水溶液の急速なインライン混合のいずれかによって、生成された。脂質溶液は、一般に、4つの製剤賦形剤、すなわち、エタノール中、所定のモル比で混合された、アミノ脂質、PEG-脂質と呼ばれる脂質にコンジュゲートされた平均分子量2000 Daのモノメトキシポリエチレングリコール（又はメトキシポリウイエチルグリコール（methoxy polyethylene glycol））、コレステロール、及び1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）の混合物から構成される。LNP組成物は、40～65%のアミノ脂質、2～20%のDSPC、1～5%のPEG-脂質を含み、残りはコレステロール（全てモル%）であった。別途指定されない限り、RNA水溶液は、所望のmRNAとガイドRNA（gRNA）との1：1重量比の混合物を含有する。gRNAに対するmRNAの比の影響を評価するために、評価のために、対応するLNPの調製（例えば、マウスにおける6：1、3：1、2：1、1：1

40

50

、1：2、1：3及び1：6のgRNAに対するmRNAの比を評価するためのLNP試験物品の調製)の前に、所望の重量比のmRNA及びgRNAを含有する水溶液を調製した。いくつかの他の事例では、mRNA及び2つのgRNAを、1：0.5：0.5(mRNA：gRNA1：gRNA2)重量比で混合して、単一の試験物品に所望のmRNA及び2つのgRNAを含有するLNPを調製した。次いで、所望のmRNAからgRNAへの水溶液を、マイクロ流体又は急速インライン混合によって、エタノール中の脂質賦形剤と混合した。報告されたNHP試験の全てのLNPは、記載されるWO2019/036028A1、WO2015/199952A1、WO2017/004143、WO2020/081938A1及びWO2020/061426A2と同じインライン混合プロトコルに従うことによって調製された。NHP LNP試験物品の調製に使用したPEG-脂質は、WO2019/036028A1、WO2015/199952A1から選択された。LNP組成物及びイオン化可能なアミノ脂質は、特許公開第WO/2017/004143A1号、第WO/2017/075531A1号及び第WO/2018/191719 A1号から選択された。

10

20

30

40

50

【0596】

[0581]一例として、細胞及びNHP試験に使用されるLNPは、55～70nmの平均流体力学的直径範囲を有し、動的光散乱によって決定される場合、0.2未満の多分散指数を有し、Quant-iT Ribogreen Assayによって測定される場合、85～100%の全RNA封入を有していた。LNP粒径(Z-Ave、流体力学的直径)、多分散指数、及び全RNA封入を、投与前に文献に記載されているように測定した。

【0597】

ゲノムDNA抽出。

[0583]100～200mgのサル肝臓を、2mLの溶解マトリックスチューブ(MPBio)に入れた。製造業者のプロトコルに従って、FastPrep-24システム(MPBio)を使用して、マウス肝臓については0.5mLのPBS、サル肝臓については0.25mLのPBSを用いて肝臓を溶解させた。ゲノムDNAを、製造業者のプロトコルに従ってKingFisher Flex自動抽出装置(Thermo-Fisher Scientific)で、ビーズベースの抽出キットMagMAX-96 DNA Multi-Sample Kit(Thermo-Fisher Scientific)を使用して、およそ20μLのサル肝臓溶解物から単離した。サル肝臓生検試料の場合、Qiagen DNEasy Blood&Tissueキット抽出を使用して、製造業者の指示に従ってゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAを更に使用するまで4℃で保存するか、又は長期保存のために-80℃で保存した。

【0598】

ELISAによって定量化されたANGPTL3タンパク質レベル。

[0585]血漿カニクイザルANGPTL3レベルをELISAによって決定した。簡潔に述べると、ヒトANGPTL3に特異的なモノクローナル抗体(R&D、パーツ番号893734)でコーティングされた96ウェルマイクロプレートにおいて、キャリブレーター希釈剤RD6Q(R&D、パーツ番号895128)で希釈された精製カニクイザルANGPTL3の試験試料又は標準を、アッセイ希釈剤RD1-76(R&D、パーツ番号895812)とともにインキュベートした。洗浄緩衝液(R&D、パーツ番号895003)で4回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)にコンジュゲートされたヒトANGPTL3に特異的なポリクローナル抗体を含有するヒトANGPTL3コンジュゲート(R&D、パーツ番号893735)を、次に、個々のウェル中でインキュベートした。4回の洗浄後、TMB基質溶液(R&D、パーツ番号895000及び895001)を使用して、プレートを現像した。光学密度を、450nmに設定したマイクロプレートリーダーを使用して決定した。プレートの光学的な不完全さを補正するために、540nmでの読み取り値を450nmでの読み取り値から差し引いた。

【0599】

脂質レベルを定量化する。

[0587]試薬キットの各分析物は、試薬、コレステロール、トリグリセリド及びHDL-Cを含有し、特定の酵素反応生成物の吸光度測定値を使用して定量化される。LDL-Cは、間接的に決定される。循環コレステロールの大部分は、3つの主要なリポタンパク質画分、すなわち、非常に低密度のリポタンパク質(VLDL)、LDL、及びHDLにおいて見出される。 $[総C] = [VLDL-C] + [LDL-C] + [HDL-C]$ 。したがって、LDL-Cは、以下の関係 $[LDL-C] = [総C] - [HDL-C] - [TG] / 5$ (ここで、 $[TG] / 5$ は、発現されるVLDL-Cコレステロールの推定値である)に従って、総コレステロール、トリグリセリド及びHDL-Cの測定値から計算することができる。

10

[0600]トリグリセリドレベルの直接測定。

[0589]臨床分析装置を使用して、血清試料中の「脂質パネル」を測定した。これは、コレステロール(総C)、トリグリセリド(TG)及び高密度リポタンパク質コレステロール(HDL-C)の直接測定を伴う。トリグリセリドに特有の試薬キットには、緩衝液、校正剤、ブランク、及び対照が含まれる。提供された試薬を使用して、試験からの血清試料を分析した。一連のカップリング酵素反応を使用して、トリグリセリドを測定した。 H_2O_2 は、最後の反応の最終生成物であり、500nmでのその吸光度を使用して、分析物を定量化する。色強度は、トリグリセリド濃度に比例した。全ての値を mg/dL で報告した。

20

[0601]NHPのLNP治療。

[0591]NHP試験は、それぞれ、Institutional Animal Care and Use Committees of Envoy Biomedical and Altasciencesによって承認された。NHP試験を、Envoy Biomedical(試験番号VTP2001)及びAltasciences(試験番号1388.02、04、05、09、及び11)で行い、両方の試験でカンボジア由来のMacaca fascicularis)を使用した。動物は、試験開始時に2~3歳であり、体重は2~3kgであった。全ての動物を、PCSK9及び/又はANGPTL3の編集部位(複数可)で遺伝子型決定して、LNPを受けた任意の動物が、gRNA配列と完全に一致するプロトスペーサーDNA配列に対してホモ接合であることを確実にし、動物を様々な実験群に無作為に割り当てた。動物を、別途記載されない限り、LNP投与前に、 $1mg/kg$ のデキサメタゾン、 $0.5mg/kg$ のファモチジン、及び $5mg/kg$ のジフェンヒドラミンで前投薬した。LNPを、プライミングされた注入ラインに接続された末梢静脈に挿入された一時的なカテーテルを使用して、1時間(±5分)にわたって投与した。別途指定されない限り、用量製剤を $6mL/kg$ の体積で投与し、動物体重(キログラム)当たりの総RNAのmgに対応する mg/kg で投与した。用量は、LNPを製剤化した後、mRNA及びgRNAの量を構成する全RNAに基づいて計算した。動物の体重に基づく適切な体積を注入ポンプを使用して送達した。対照動物は、同じ注入条件下でLNPの代わりにリン酸緩衝生理食塩水を受けた。同じNHP試験で使用されたアミノ脂質1及びアミノ脂質2から構成された2つのLNPが存在した場合、試験物品は、これらのLNPを調製するために使用されたmRNAとgRNAが同じであったLNP1番及びLNP2番として特定された。試験に使用されたLNP組成物が1つだけの場合、試験物品は、LNPとして特定された。

30

40

[0602]

[0592]血液化学試料の場合、末梢静脈穿刺によって収集する前に、動物を少なくとも4時間絶食させた。NHP試験は、一般に、-10日目、-7日目、-5日目、1日目(LNP注入後6時間)、2日目、3日目、5日目、8日目、及び15日目のスケジュールでの収集に従った。長期試験では、試料を21日目及び28日目にも収集し、その後はほぼ2週間ごとに収集し、研究施設によってLDLコレステロール、HDLコレステロール

50

、総コレステロール、トリグリセリド、AST、及びALTについて分析した。各分析物について、－10日目、－7日目、及び－5日目の値の平均をベースライン値とみなした。各血液試料の一部を、ANGPTL3タンパク質測定のために治験責任医師に送った。

【0603】

光学ゲノムマッピング。

[0594]試料当たり合計750ngの高分子量(HMW)ゲノムDNAを、Bionano Prep Direct Label and Stain DLS Protocolに従って標識化に使用した。ゲノムDNAを、DLE-1酵素によるDLE-緑色フルオロフォアを用いてゲノム全体にわたって特異的モチーフ(CTTAAG)で標識した。DLE-1酵素を不活性化するためのプロテイナーゼK消化の後、試料を連続した膜吸着によって洗浄した。ゲノムDNA骨格を、サイズ特定のために対比染色し、インキュベートし、一晚均質化した。標識された試料のゲノムDNA濃度を、製造業者の指示に従ってQubit High Sensitivity dsDNA Assay Kitを使用して測定した。4～12ng/μLの濃度の標識された試料をSaphyrチップに入れ、Saphyr器具上で実行して、蛍光標識ゲノムDNA分子の画像を収集した。

10

【0604】

[0595]治療特異的構造バリエーション(SV)を特定するために、Bionanoからのベストプラクティスの推奨に従って、Structural Variant AnnotationパイプラインのDual Analysisモードを、未治療対照試料及び治療試料からの全てのSVコールの評価に使用した。

20

【0605】

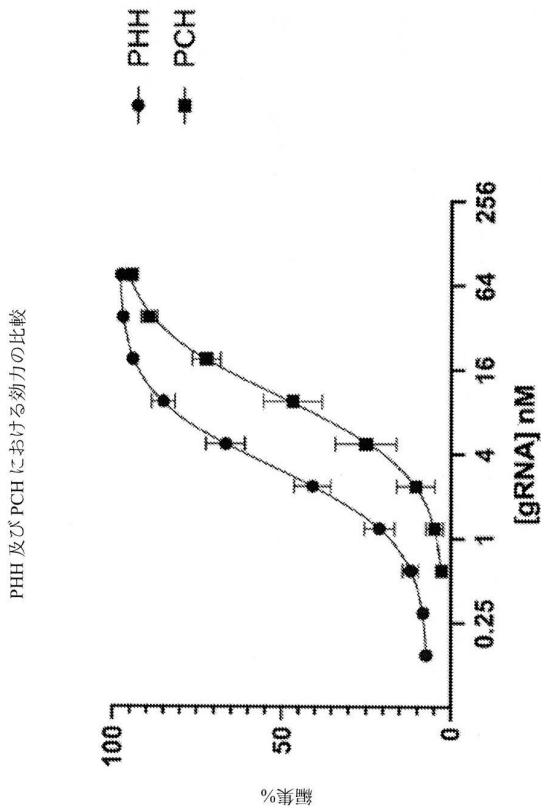
[0596]本発明の好ましい実施形態が本明細書に示され、記載されているが、そのような実施形態が例としてのみ提供されることは、当業者には明白であろう。ここで、当業者は、本発明から逸脱することなく、多数の変形、変更、及び置換が思い浮かぶであろう。本明細書に記載の本発明の実施形態に対する様々な代替形態が、本発明を実施する際に使用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は、本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲及びそれらの等価物の範囲内の方法及び構造が、それらによって包含されることが意図される。

30

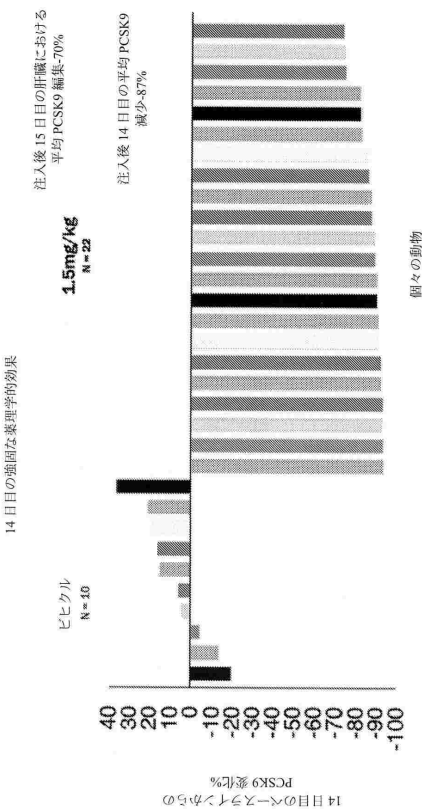
40

50

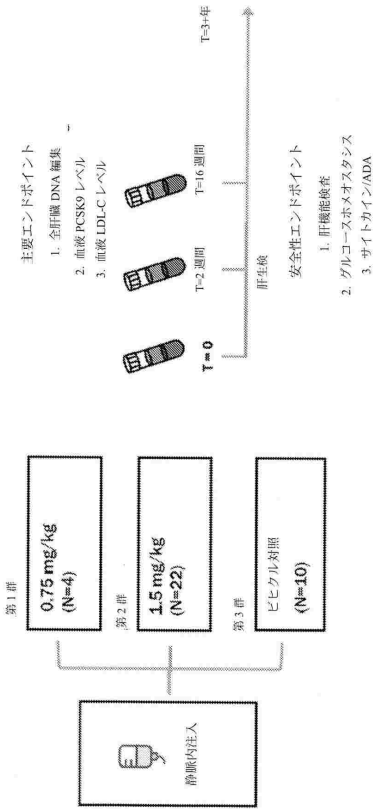
【図面】
【図 1】



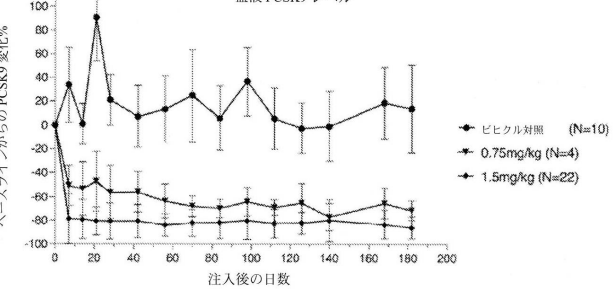
【図 3】



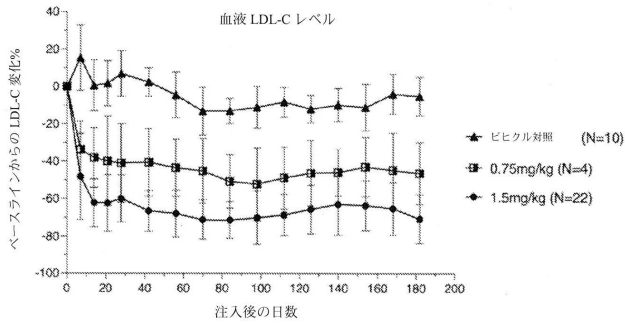
【図 2】



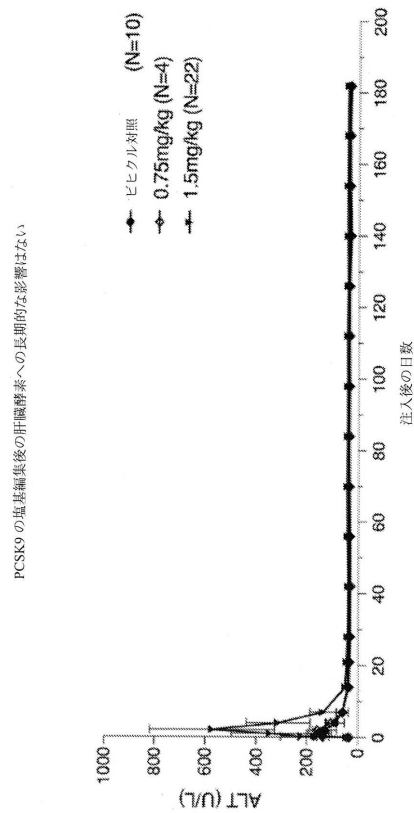
【図 4】



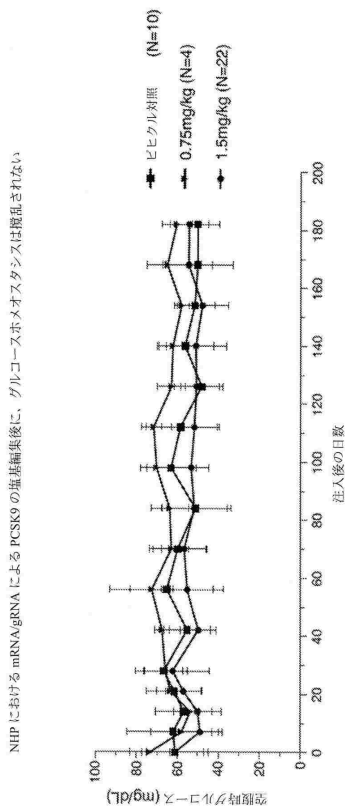
【図 5】



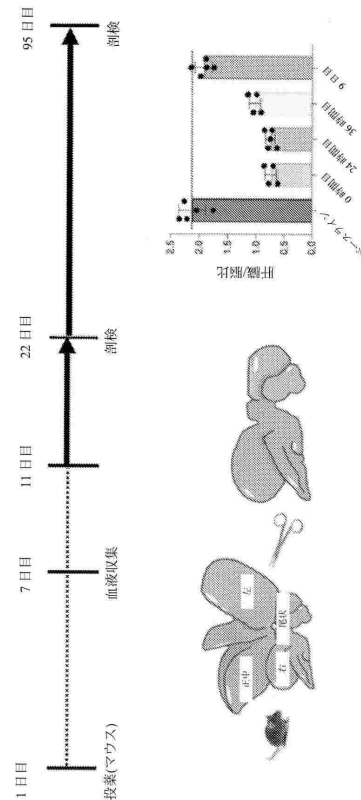
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

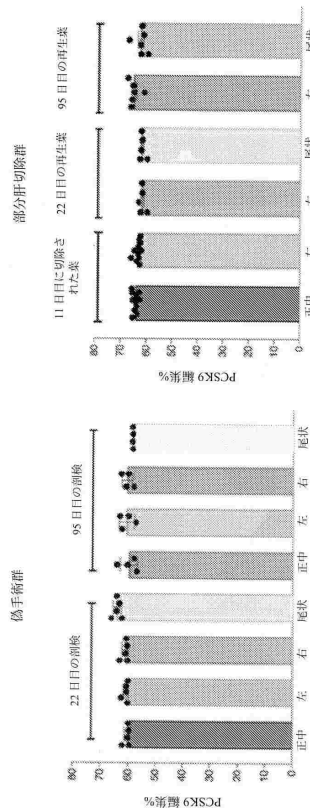
20

30

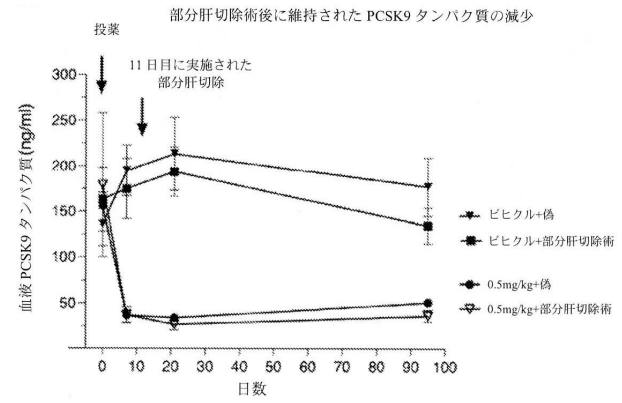
40

50

【図 9】



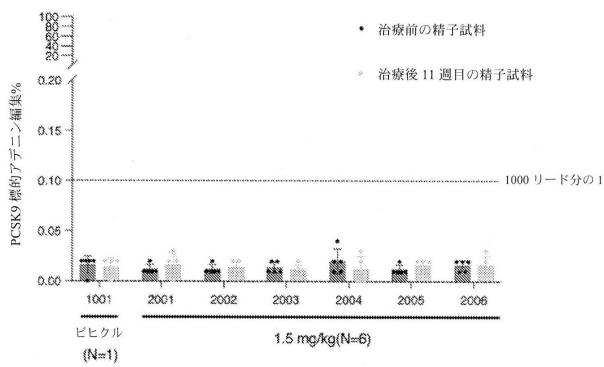
【図 10】



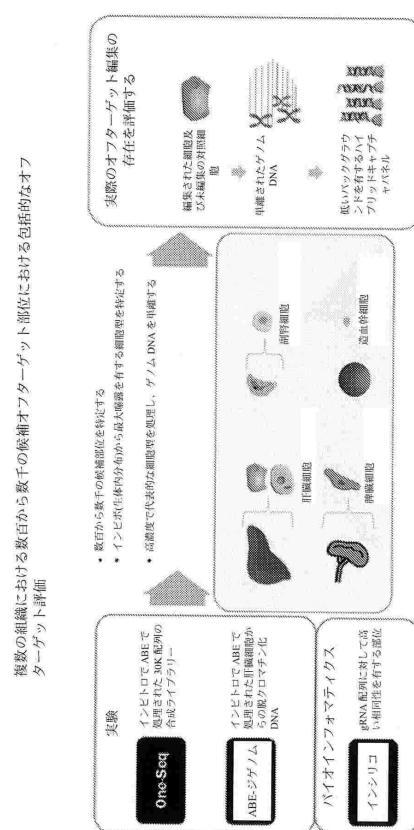
10

20

【図 11】



【図 12】

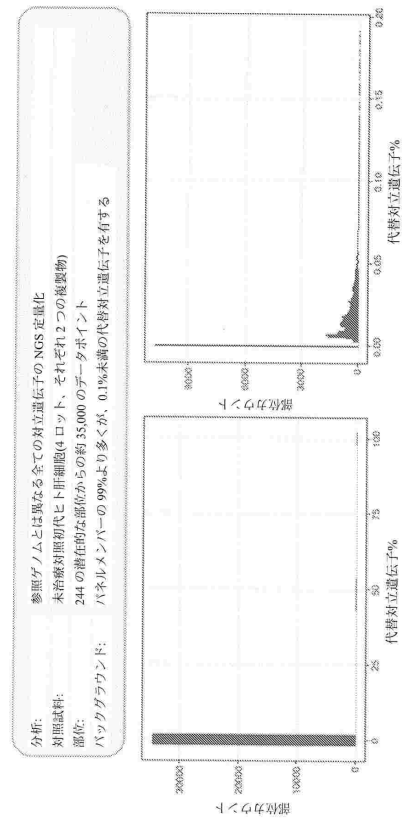


30

40

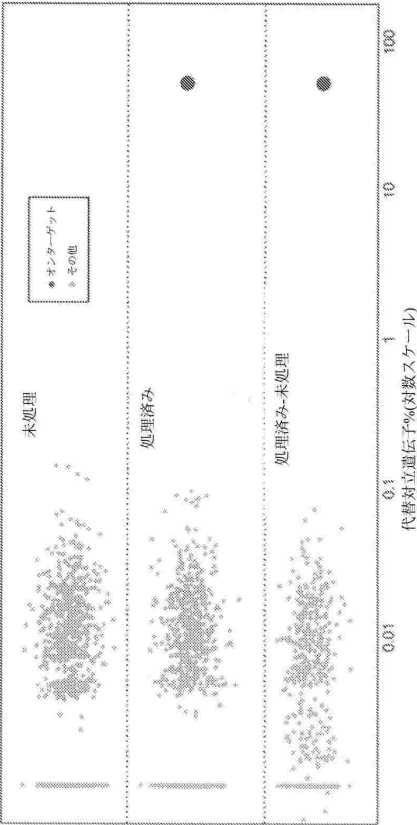
50

【図 1 3】



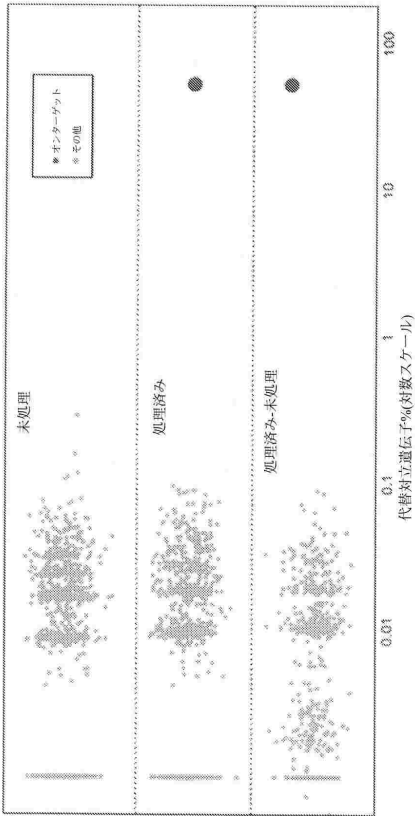
【図 1 4】

上位 244 個の候補部位のうち、初代ヒト肝細胞において検出可能なオフターゲット編集はない

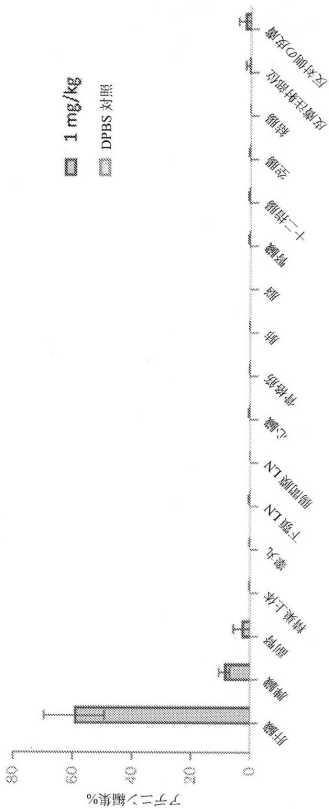


【図 1 5】

初代肝臓細胞におけるオフターゲット評価は、これらの結果を複製する。上位 244 の候補部位でオフターゲット編集なし



【図 1 6】



10

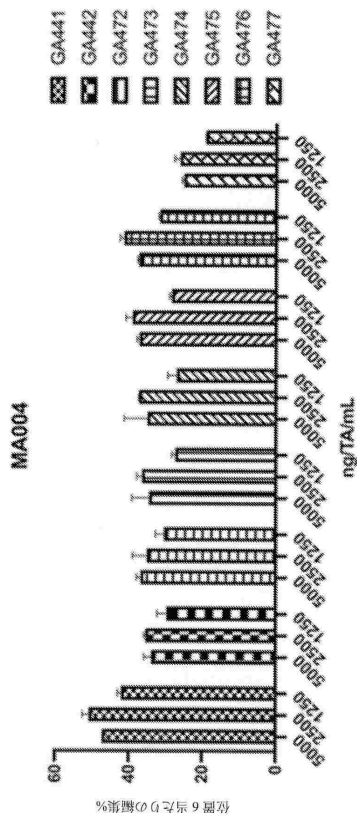
20

30

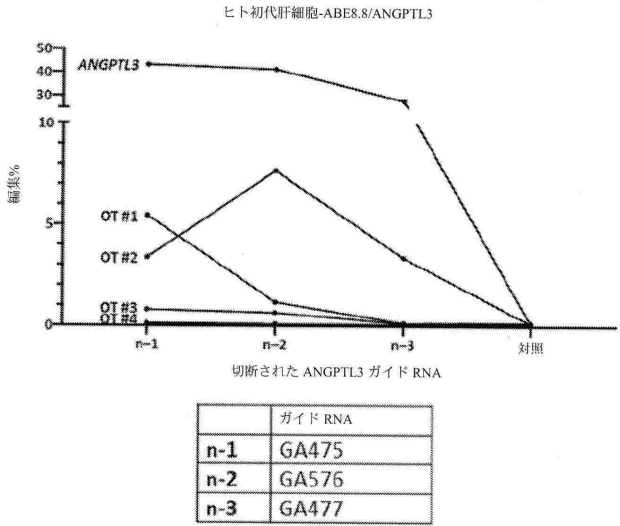
40

50

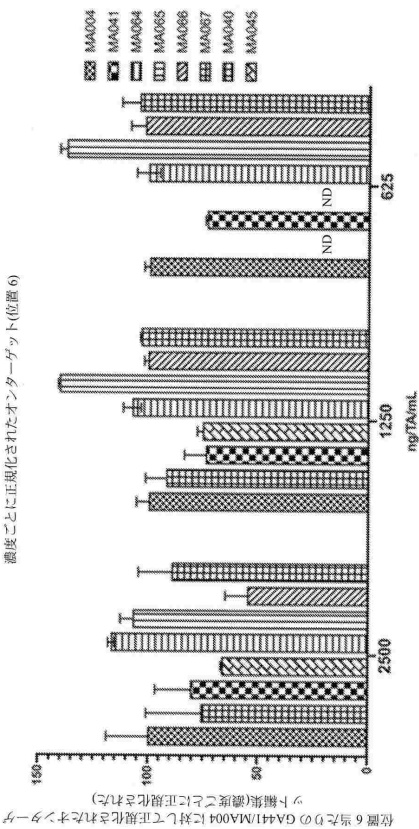
【図 1 7】



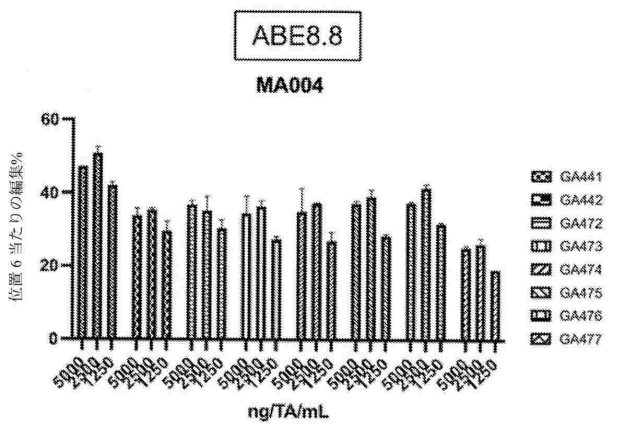
【図 1 8】



【図 1 9】



【図 2 0 A】



10

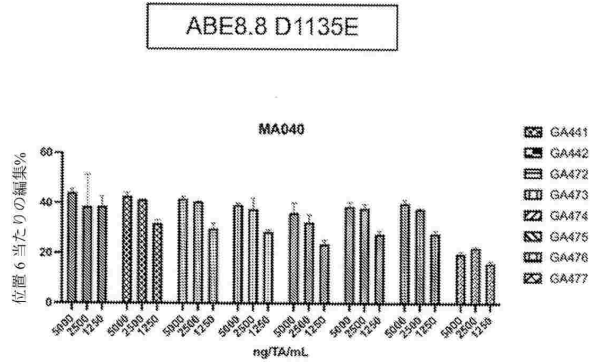
20

30

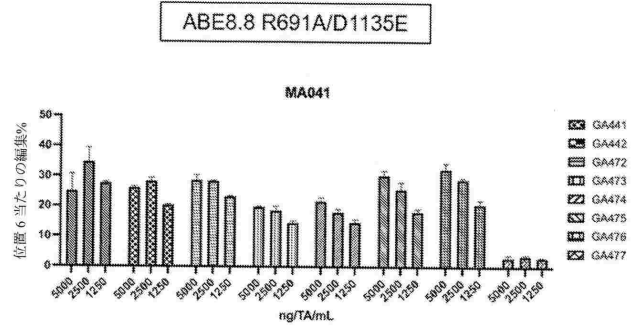
40

50

【図 20 B】

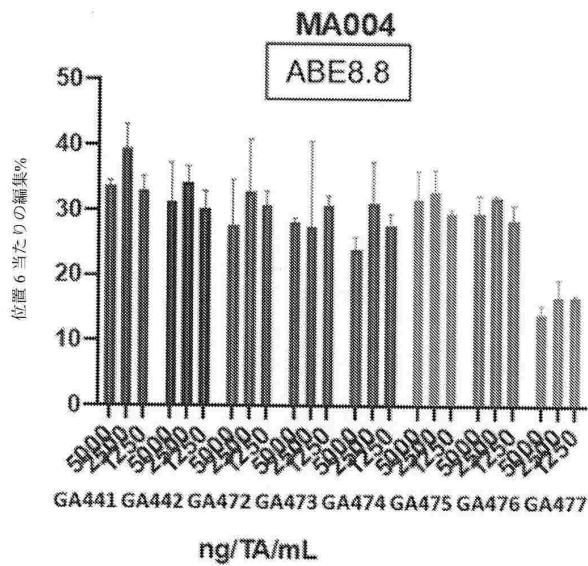


【図 20 C】

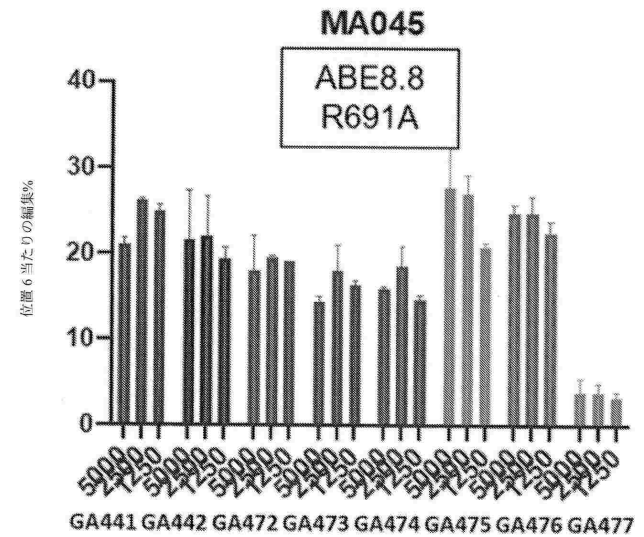


10

【図 20 D】



【図 20 E】



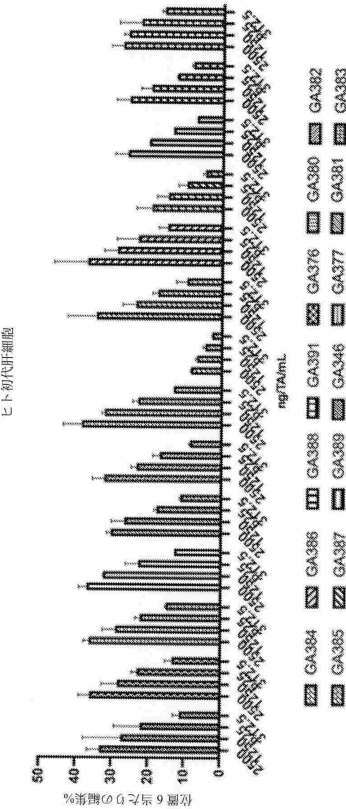
20

30

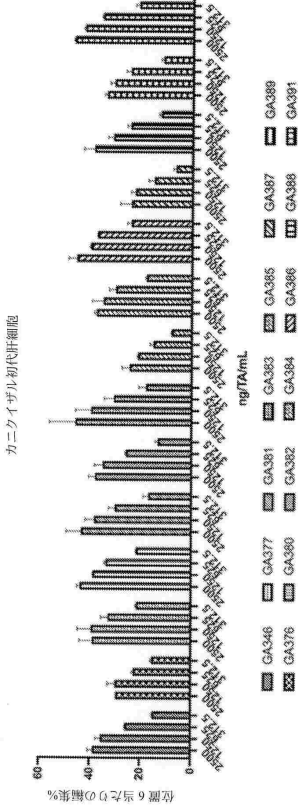
40

50

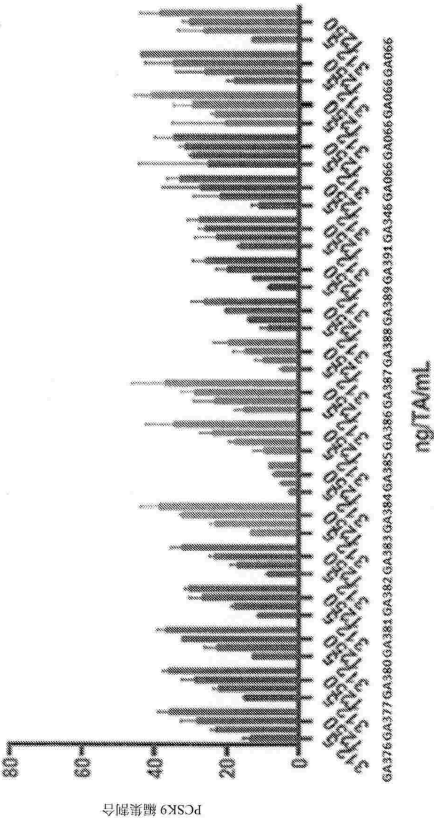
【図 2 1】



【図 2 2】



【図 2 3】



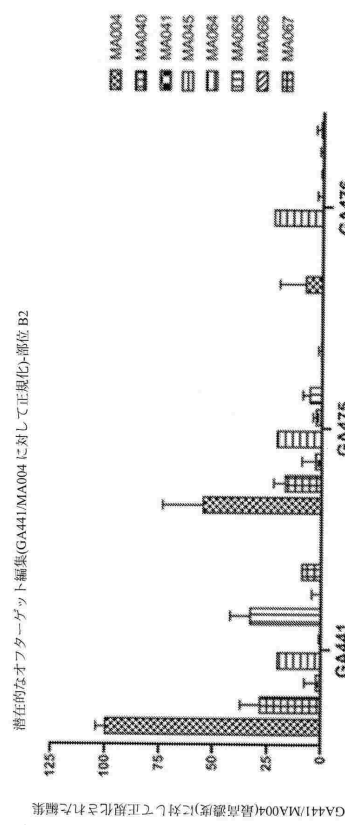
【図 2 4】

総 RNA 用量 (mg/kg)	ヒト総注入時間 ^a (分)	ヒト(予測) ^b		サル、2mg/kg(観測) ^c	
		C _{max} (μg/mL)	AUC _{inf} (μg×h/mL)	C _{max} (μg/mL)	AUC _{inf} (μg×h/mL)
イオン化可能なアミノ脂質					
0.1	30	7.33	677	484	5533
0.3	50	22.0	2032		
0.6	90	43.8	4064		
0.8	113	58.1	5419		
PEG-脂質					
0.1	30	1.43	188	102	2119
0.3	50	4.28	563		
0.6	90	8.54	1127		
0.8	113	11.3	1502		
MA-004					
0.1	30	0.136	6.17	16.5	63.7
0.3	50	0.407	18.5		
0.6	90	0.809	37.0		
0.8	113	1.07	49.4		

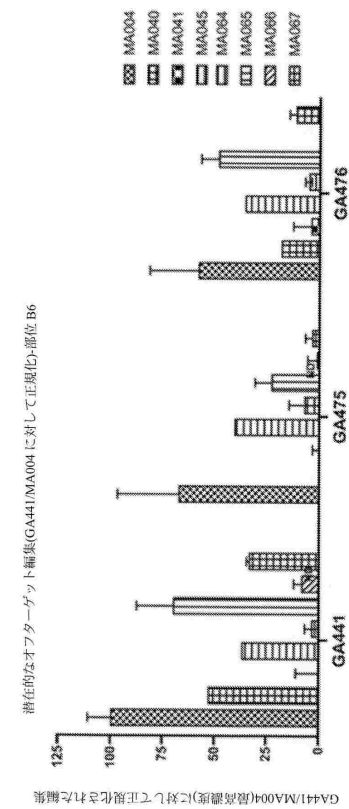
【図 2 5】

総 RNA 用量 (mg/kg)	体重 (kg)	予測されるイオン化可能 アミノ脂質 AUC ₀₋₂₄ (μg·h/mL)	予測されるイオン化可能 アミノ脂質 AUC ₀₋₂₄ 比 (75kg に対する)	予測される PCSK9 減少率	
				等しい効力	ヒトにおいて 3 倍大 きな効力
0.1	45	596	0.880	51.4	73.8
	75	677	1.00	54.4	75.8
	100	728	1.07	56.0	76.9
0.3	45	1788	0.880	73.8	86.4
	75	2032	1.00	75.8	87.3
	100	2183	1.07	76.9	87.7
0.6	45	3577	0.880	82.9	90.2
	75	4064	1.00	84.1	90.7
	100	4367	1.07	84.7	90.9
0.8	45	4769	0.880	85.5	91.2
	75	5419	1.00	86.5	91.6
	100	5823	1.07	87.0	91.8

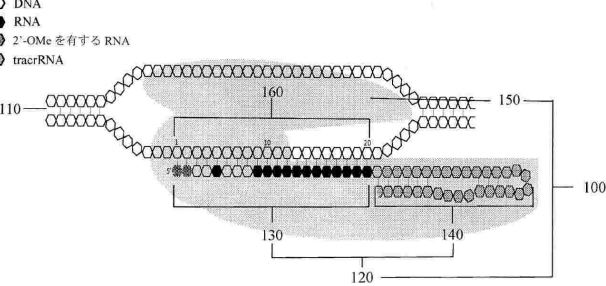
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8 A】



10

20

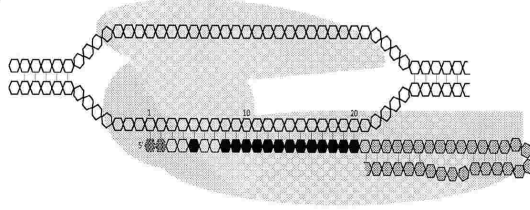
30

40

50

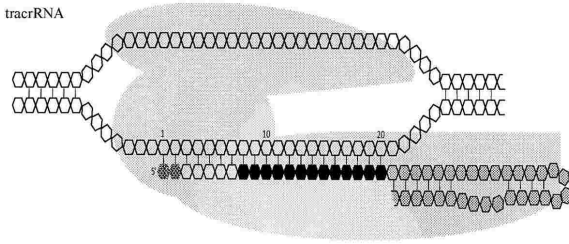
【図 28 B】

- DNA
- RNA
- ◐ 2'-OMe を有する RNA
- ◑ tracrRNA



【図 28 C】

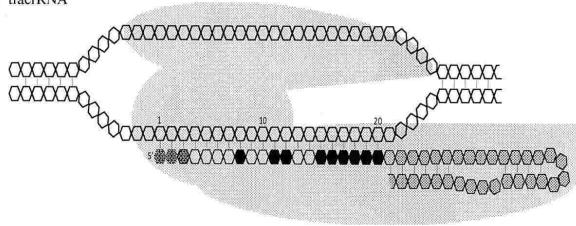
- DNA
- RNA
- ◐ 2'-OMe を有する RNA
- ◑ tracrRNA



10

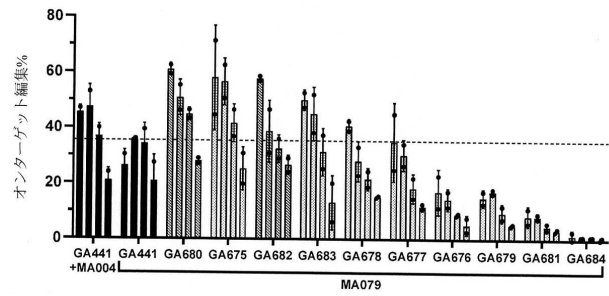
【図 28 D】

- DNA
- RNA
- ◐ 2'-OMe を有する RNA
- ◑ tracrRNA



【図 29】

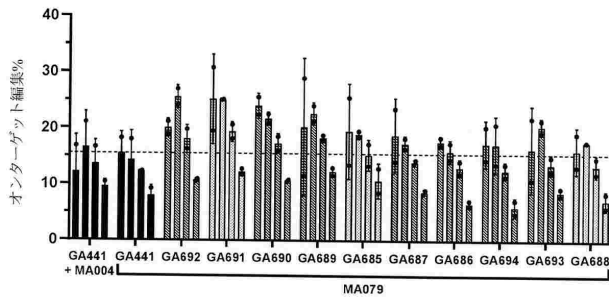
GA675-GA684



20

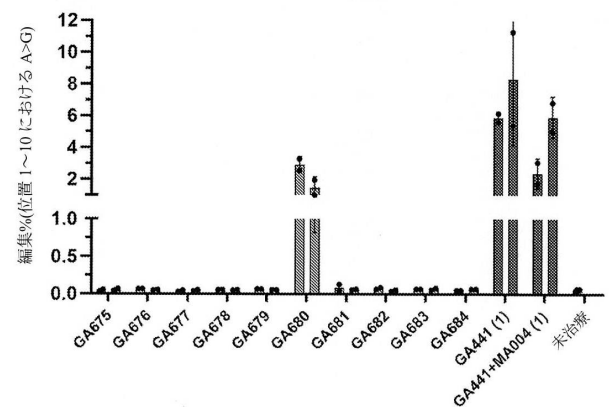
【図 30】

GA685-GA694



【図 31】

GA675-GA684

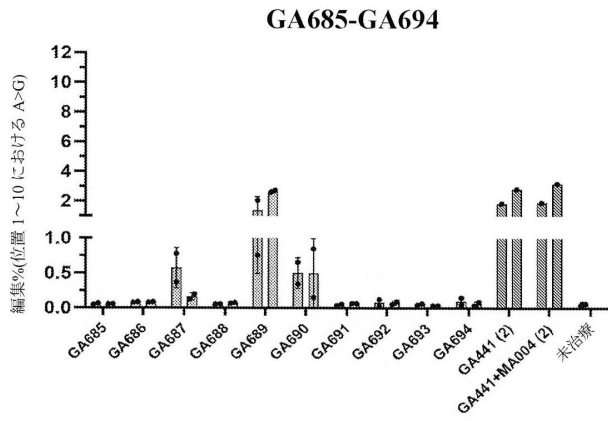


30

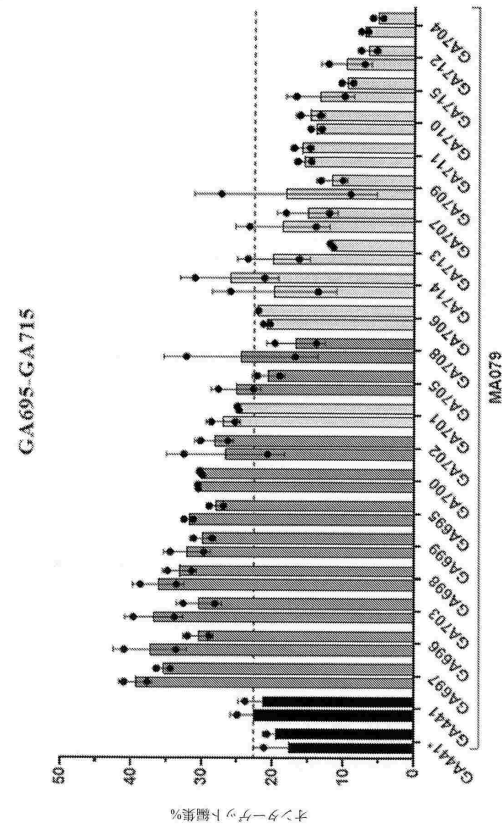
40

50

【図 3 2】



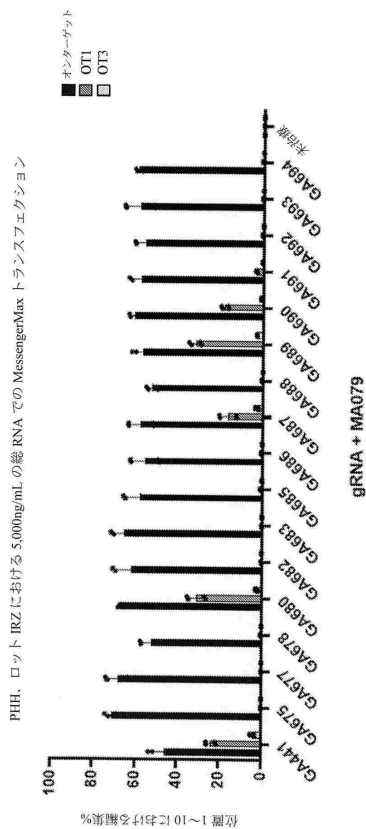
【図 3 3】



10

20

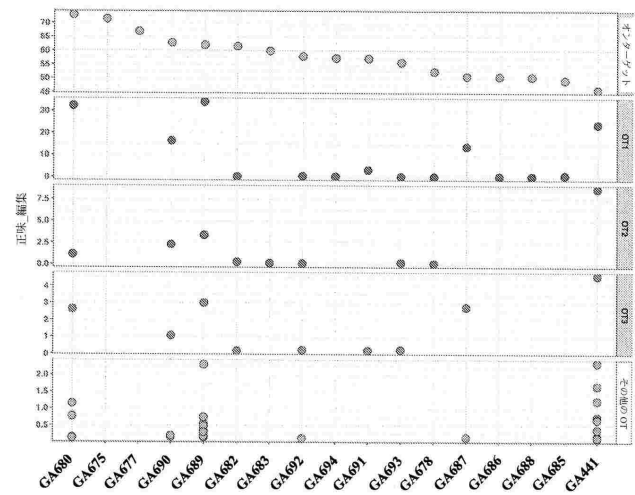
【図 3 4】



PHH, ロット IRZ における 5,000ng/mL の総 RNA での MessengerMax トランススクリプション

【図 3 5 A】

5000ng/mL の総 RNA、SureSelect インプット 50ng

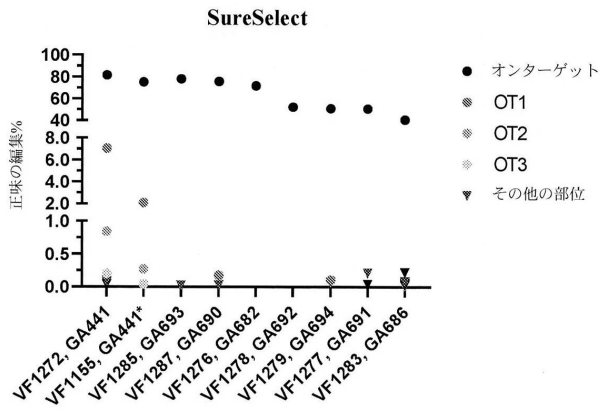


30

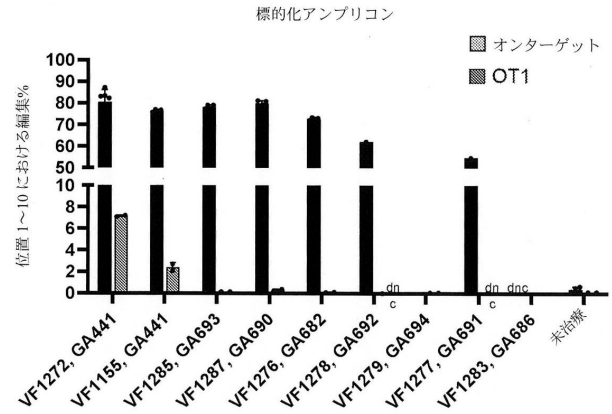
40

50

【図 38 A】

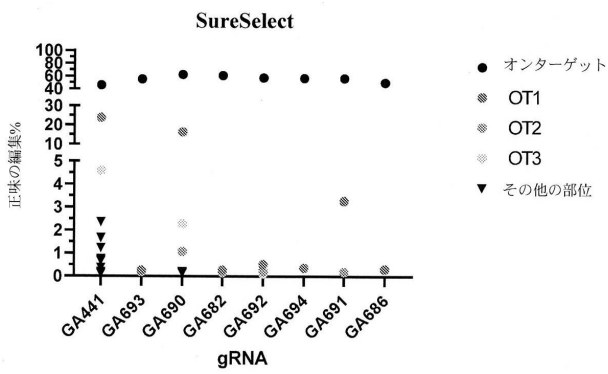


【図 38 B】

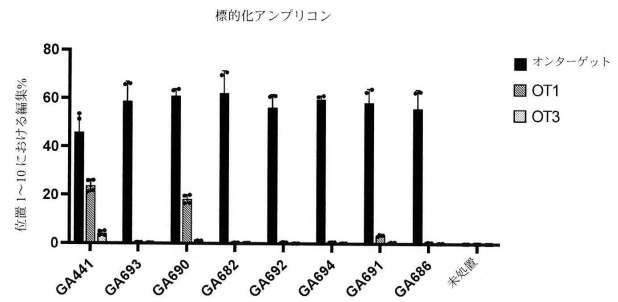


10

【図 39 A】



【図 39 B】



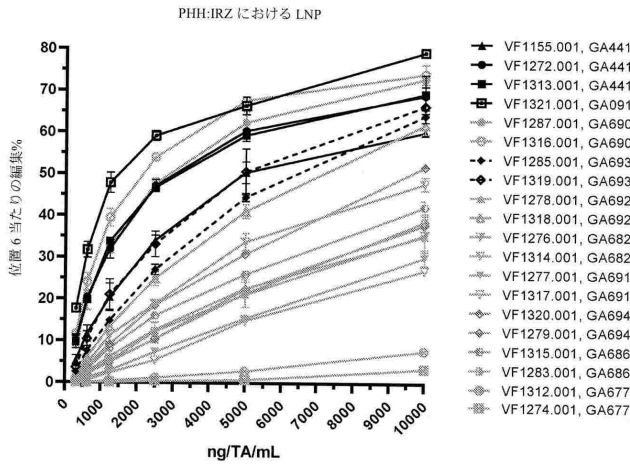
20

30

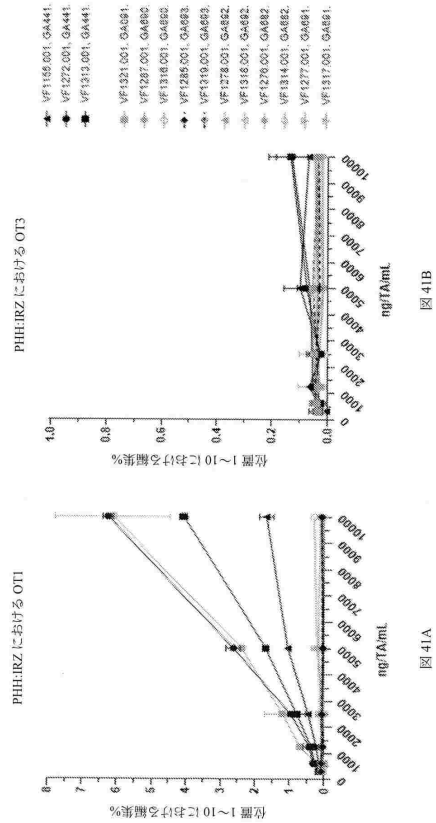
40

50

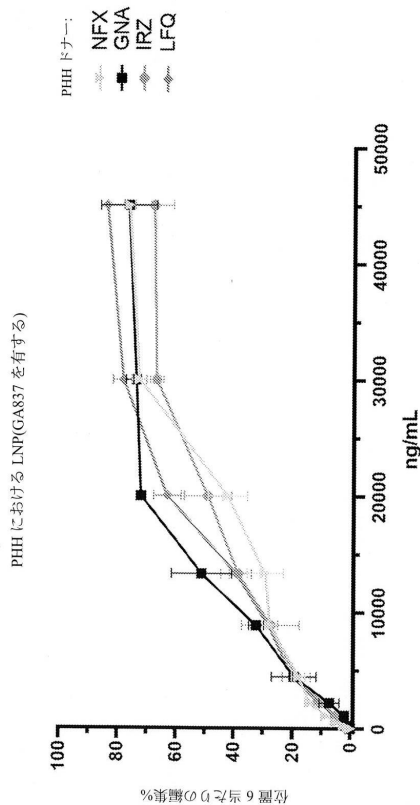
【図 4 0】



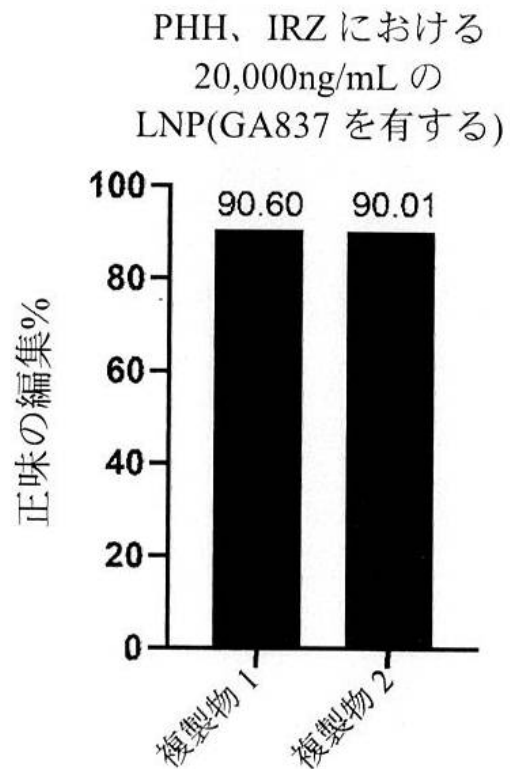
【図 4 1】



【図 4 2】



【図 4 3 A】



10

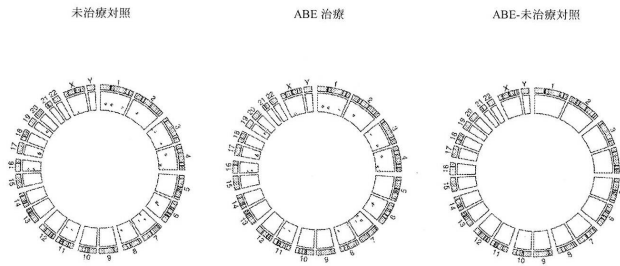
20

30

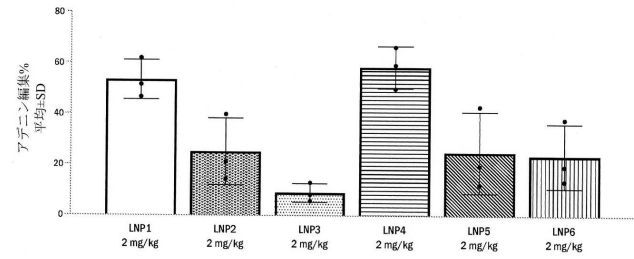
40

50

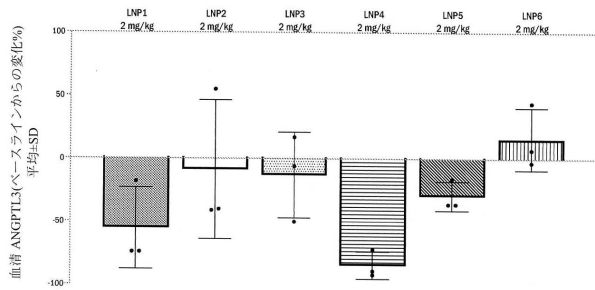
【図 4 3 B】



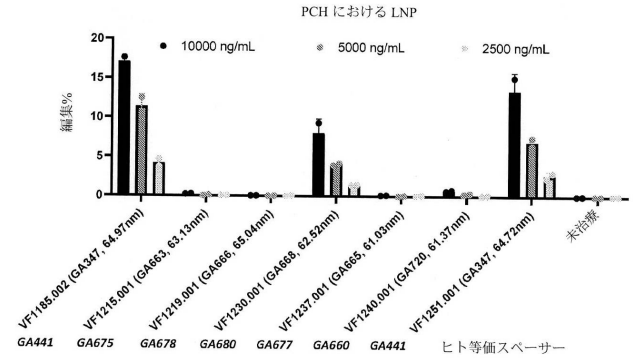
【図 4 4 A】



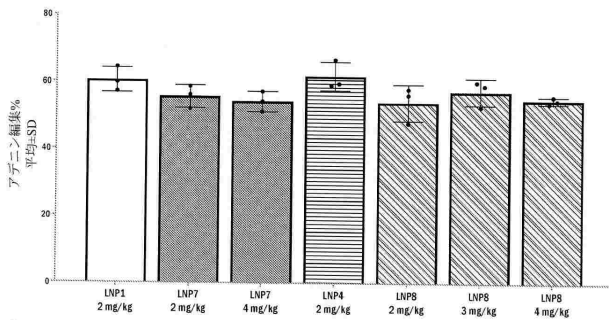
【図 4 4 B】



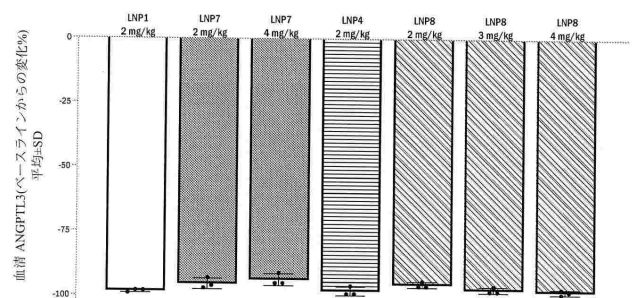
【図 4 5】



【図 4 6】



【図 4 7】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/44453

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 9/22, A61P 3/00 (2022.01)

ADD. C12N 15/82, C12N 9/16, C12N 15/11 (2022.01)

CPC - INV. C12N 15/907, C12Y 305/04005

ADD. C12N 2310/20, C07K 2319/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/0354750 A1 (PIONEER HI - BRED INTERNATIONAL, INC.) 12 November 2020 (12.11.2020) Abstract; Claim 21; Claim 22; para [0025]; para [0033]; para [0056]; para [0098]; para [0127]; Table 5	48, 50-51
Y		1-10, 49, 52-53, 55-56, 58-59
Y	US 2012/0285832 A1 (CONSTIEN et al.) 22 November 2012 (22.11.2012) Abstract; para [0008]; para [0015]; para [0090]; para [0101]; para [0105]; para [0143]; para [0181]; Table 2	1-10, 52-53, 55-56, 58-59
Y	US 2018/0312825 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 1 November 2018 (01.11.2018) Abstract; p104, Table 1	2, 4-6, 8, 10/(2, 4-6, 8), 49

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 January 2023

Date of mailing of the international search report

MAR 03 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/44453

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:

The electronic sequence listing submitted on 11/21/2022 in response to the PCT/ISA/225 issued on 10/13/2022 is acknowledged; however, it does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions. Therefore, the international search was not carried out on the basis of that non-compliant electronic sequence listing.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/44453

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.: 11-47, 54, 57, 60-115, 217-219
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

---Please see continuation in first extra 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-10, 48-53, 55-58, 58-59, limited to system comprising gene editor protein contained in LNP

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/44453

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

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

Group I+, Claims 1-10, 48-53, 55-56, 58-59, 116-216, directed to an in vivo hybrid guide gene editing system. The system will be searched to the extent that the system encompasses (a) a gene editor protein and (b) a hybrid guide nucleic acid wherein (a) and (b) are constituent components of a pharmaceutical composition that comprises a lipid nanoparticle (LNP) containing (a) (note, this is the first claimed component combination for the inventive system). The first named invention was determined based on the first claimed gene editor protein that is contained in a LNP (claim 1) for the inventive system embodiment. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-10, 48-53, 55-56, 58-59 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the system encompasses (a) a gene editor protein and (b) a hybrid guide nucleic acid wherein (a) and (b) are constituent components of a pharmaceutical composition that comprises a lipid nanoparticle (LNP) containing (a). Additional system(s) comprising additional iterations of component(s) (e.g., LNP containing (b)), nucleic acids (e.g., a nucleic acid encoding the gene editor protein) and/or different combination(s) thereof will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected iterations of component(s) (e.g., LNP containing (b)), nucleic acids (e.g., a nucleic acid encoding the gene editor protein) and/or different combination(s) thereof. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a system comprising (a) a gene editor protein and (b) a hybrid guide nucleic acid wherein (a) and (b) are constituent components of a pharmaceutical composition that comprises a lipid nanoparticle (LNP) containing (b) (claims 1-10, 48-53, 55-56, 58-59).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Groups I+ each include the special technical feature of a unique combination of components of a gene editing system, and each combination of components is considered a distinct technical feature.

Common technical features

Group I+ inventions share the technical features of including:

an in vivo hybrid guide gene editing system comprising:

- (a) a gene editor protein or a component thereof comprising a nucleic acid binding domain, or a nucleic acid encoding the gene editor protein or the component thereof; and
- (b) a hybrid guide nucleic acid comprising (i) a spacer sequence comprising a deoxyribonucleotide and a ribonucleotide comprising a ribose, wherein a 2' hydroxyl group of the ribose is covalently linked to a methyl group (2'-OMe), and (ii) a binding scaffold for the gene editor protein or component thereof, wherein (a) and (b) are constituent components of a pharmaceutical composition that comprises a lipid nanoparticle (LNP) containing (a) or (b), wherein the LNP comprises an amino lipid, a phospholipid, a sterol and a PEG lipid.

However, these shared technical features are made obvious by US 2018/0312825 A1 to President and Fellows of Harvard College, (hereinafter 'Harvard') in view of US 2012/0295832 A1 to Constien et al., (hereinafter 'Constien').

Harvard teaches an in vivo hybrid guide gene editing system comprising:

- (a) a gene editor protein or a component thereof comprising a nucleic acid binding domain, and
- (b) a hybrid guide nucleic acid comprising (i) a spacer sequence comprising a deoxyribonucleotide, and (ii) a binding scaffold for the gene editor protein or component thereof (Abstract - 'Some aspects of this disclosure provide strategies, systems, reagents, methods, and kits that are useful for the targeted editing of nucleic acids, including editing a single site within the genome of a cell or subject, e.g., within the human genome. In some embodiments, fusion proteins of Cas9 and nucleic acid editing proteins or protein domains, e.g., deaminase domains, are provided'; Claim 308 - 'The fusion protein of claim 303, wherein the fusion protein further comprises a guide nucleic acid-binding domain, wherein the guide nucleic acid-binding domain binds a guide nucleic acid.'; Claim 317 - 'A complex comprising the fusion protein of claim 308 and a guide nucleic acid, wherein the guide nucleic acid binds to the single-stranded portion of the target nucleic acid sequence.'; para [0162] - 'Where appropriate, e.g., in the case of chemically synthesized molecules, nucleic acids can comprise nucleoside analogs such as analogs having chemically modified bases or sugars, and backbone modifications. ... chemically modified bases; biologically modified bases (e.g., methylated bases); intercalated bases; modified sugars (e.g., 2'-fluororibose, ribose, 2'-deoxyribose, arabinose, and hexose); and/or modified phosphate groups (e.g., phosphorothioates and 5'-N-phosphoramidite linkages).'; para [0273] - 'In some embodiments, a Cas9 nickase may further facilitate the removal of a base on the non-edited strand in an organism whose genome is edited in vivo.'; para [0277] - 'In some embodiments, the contacting is in vivo in a subject.').

Harvard fails to expressly teach wherein (a) and (b) are constituent components of a pharmaceutical composition that comprises a lipid nanoparticle (LNP) containing (a) or (b), wherein the LNP comprises an amino lipid, a phospholipid, a sterol and a PEG lipid.

—please see continuation on next sheet —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/44453

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

— continued from previous sheet —

Constien teaches pharmaceutical compositions comprising LNPs and nucleic acids wherein the LNP comprises an amino lipid, a phospholipid, a sterol and a PEG lipid (Abstract - 'The present invention provides novel amino-lipids, compositions comprising such amino-lipids and methods of producing them. In addition, lipid nanoparticles comprising the novel amino-lipids and a biologically active compound are provided, as well as methods of production and their use for intracellular drug delivery.'; para [0143] - 'In another object the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising the amino-lipids of the invention. Preferably said pharmaceutical composition comprises the lipid nanoparticles of the present invention and a biologically active compound'; para [0015] - 'Individual siRNAs directed against the targets indicated below the bars were formulated into LNPs consisting of 50% KL25, 10% DSPC, 38.5% cholesterol and 1.5% PEG2000-c-DMG.'; para [0090] - 'Examples include, but are not limited to, fatty acids (e.g. oleic acid, linoleic acid, stearic acid), glycerolipids (e.g. mono-, di-, triglycerols such as triglycerides), phospholipids (e.g. phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine), and sphingolipids (e.g. sphingomyelin)'). Constien further teaches a ribonucleotide comprising a ribose, wherein a 2' hydroxyl group of the ribose is covalently linked to a methyl group (2'-OMe) (para [0181] - 'In order to increase siRNA stability and abrogate immune responses, 2'-O-methyl modified nucleotides were placed within certain positions in the siRNA duplex.'). Since Constien teaches advantageous formulations that impart greater stability to nucleic acids (para [0101] - 'Those additional components of a lipid nanoparticle of the present invention serve various purposes such as aiding manufacturing and storage stability as well as modulation of the biodistribution.'; para [0105] - 'In one embodiment, LNPs contain uncharged lipids modified with hydrophilic polymers, e.g. polyethylene glycol (herein also referred to as "PEG-lipids") to stabilize the lipid nanoparticle and to avoid aggregation.'; para [0006] - 'By introduction of appropriate chemical modifications stability towards nucleases can be increased and at the same time immune stimulation can be suppressed. Conjugation of lipophilic small molecules to the siRNAs improves the pharmacokinetic characteristics of the double stranded RNA molecule'), it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the LNP formulation of could be combined with the method of Harvard, to provide an improved formulation for gene editing *in vivo*.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of item 4 above:

Claims 11-47, 90-98, 105-113, 217-219 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Claims 54, 57, 60-115 are held unsearchable as these claims are drawn to sequences and Applicant failed to provide a sequence listing that complies with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.

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)	
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51		
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18		
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34		
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24		
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28		
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10		
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55	Z N A	
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	

(32)優先日 令和4年7月15日(2022.7.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,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,D E,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,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,T M,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500, スイート 901

(72)発明者 ラジーブ, カラントッタチル・ジー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500, スイート 901

(72)発明者 レイス, キャロライン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500, スイート 901

(72)発明者 デニジオ, ジェイミー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500, スイート 901

(72)発明者 ジャヤラム, ハリハラン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500, スイート 901

(72)発明者 アイヤー, ソウミヤ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500, スイート 901

(72)発明者 デ アルメイダ・ピント・ガルシア, サラ・クリスティナ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500, スイート 901

(72)発明者 ワーン, クイ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500, スイート 901

(72)発明者 チャドウィック, アレクサンドラ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500, スイート 901

(72)発明者 チェン, クリストファー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500, スイート 901

(72)発明者 リー, リチャード・グレン
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500
 , スイート 901

(72)発明者 ローデ, エレン
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, テクノロジー・スクエア 500
 , スイート 901

F ターム (参考) 4C076 AA19 AA65 AA95 BB01 BB11 BB12 BB13 BB14 BB15 BB16
 BB21 BB22 BB25 BB29 BB30 BB32 CC11 DD17M DD63M DD70M EE23M
 FF31

 4C084 AA13 MA05 MA13 MA31 MA52 MA55 MA56 MA57 MA59 MA60
 MA65 MA66 MA67 NA12 NA13 NA14 ZA451 ZA452

 4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 NA12 NA13 NA14 ZA45