(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-510038
(P2020-510038A)
(43)公表日　令和2年4月2日(2020.4.2)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	H	4C084
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	G	4C085
A61K 38/16	(2006.01)	A61K	39/395	U	
A61K 38/43	(2006.01)	A61K	39/395	T	
A61K 38/46	(2006.01)	A61K	38/16		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 184 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-548908 (P2019-548908)
(86)(22)出願日　平成30年3月9日 (2018.3.9)
(85)翻訳文提出日　令和1年11月11日 (2019.11.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/021880
(87)国際公開番号　WO2018/165631
(87)国際公開日　平成30年9月13日 (2018.9.13)
(31)優先権主張番号　62/469,219
(32)優先日　平成29年3月9日 (2017.3.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　507044516
プレジデント　アンド　フェローズ　オブ　ハーバード　カレッジ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３８，　ケンブリッジ，　クインシー　ストリート　１７
(74)代理人　100102842
弁理士　葛和　清司
(72)発明者　マイアンティ，ジュアン　パブロ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１５１、レビア、エンディコット　アヴェニュー　２７８、＃２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】がんワクチン

(57)【要約】
本明細書で提供されるのは、腫瘍関連抗原から免疫原性ペプチドまたはエピトープを生成するための、システム、組成物、および方法である（例えば、in vivoまたはex vivoで）。腫瘍関連抗原をコードするポリヌクレオチド（例えば遺伝子）は、選択された標的部位で、触媒的に不活性なＣａｓ９およびシトシンデアミナーゼを含む核酸塩基エディターによって編集され、腫瘍関連抗原に由来する天然ペプチドよりも免疫原性の高い、ヘテロクリティックペプチドまたはクリプティックペプチドの発現をもたらす。ヘテロクリティックペプチドまたはクリプティックペプチドは、強い腫瘍特異的免疫応答（例えば、Ｔ細胞応答またはＢ細胞応答）を誘導し、腫瘍の成長および転移を阻害する。

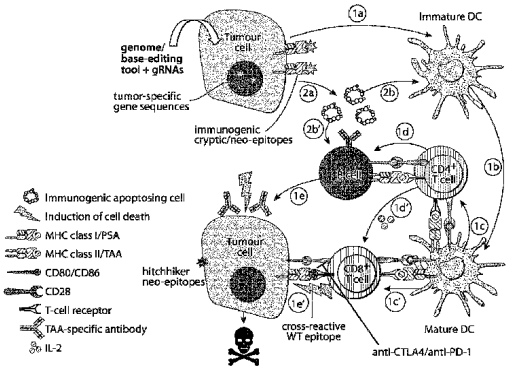


Figure 3

【特許請求の範囲】
【請求項１】
腫瘍特異的免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、該方法は、対象に、以下：
（ｉ）（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメイン、を含む融合タンパク質；および（ｉｉ）ガイドヌクレオチド配列、
を含む組成物の治療有効量を投与することを含み、
ここで（ｉｉ）のガイドヌクレオチド配列は、（ｉ）の融合タンパク質を、腫瘍細胞中の腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化し、ここで融合タンパク質は、標的シトシン（Ｃ）塩基を、脱アミノ化を介してチミン（Ｔ）塩基に変更する、前記方法。
【請求項２】
ポリヌクレオチドが、コード鎖および相補鎖を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ポリヌクレオチドが、コード領域および非コード領域を含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドが、腫瘍細胞のゲノムに位置する、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｃ－Ｇ塩基対からチミン－アデニン（Ｔ－Ａ）塩基対への変更をもたらす、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインが、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Ｃｐｆ１ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型アルゴノートドメイン、およびそのバリアントからなる群より選択される、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインが、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）ドメインである、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
ｄＣａｓ９ドメインのアミノ酸配列が、配列番号１におけるＤ１０Ａおよび／またはＨ８４０Ａ変異に対応する変異を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
ｄＣａｓ９ドメインのアミノ酸配列が、配列番号１におけるＤ１０Ａ変異に対応する変異を含み、およびここでｄＣａｓ９ドメインは、配列番号１のアミノ酸８４０に対応する位置においてヒスチジンを含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインが、ヌクレアーゼ不活性型Ｃｐｆ１（ｄＣｐｆ１）ドメインを含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
ｄＣｐｆ１ドメインが、AcidaminococcusまたはLachnospiraceaeの種からのものである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインが、ヌクレアーゼ不活性型アルゴノート（ｄＡｇｏ）ドメインを含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】

ｄＡｇｏドメインが、Natronobacterium gregoryiからのものである（ｄＮｇＡｇｏ）、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

シトシンデアミナーゼドメインが、アポリポタンパク質Ｂ－ｍＲＮＡ編集複合体（ＡＰＯＢＥＣ）ファミリーデアミナーゼを含む、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５】

シトシンデアミナーゼが、ＡＰＯＢＥＣ１、ＡＰＯＢＥＣ２、ＡＰＯＢＥＣ３Ａ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｂ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｃ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｄ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｆ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｇデアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｈデアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ４デアミナーゼ、および活性化誘導デアミナーゼ（ＡＩＤ）からなる群より選択される、請求項１～１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】

シトシンデアミナーゼが、配列番号２７１～２９２、３０３、および１０７２～１０８３のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１７】

（ｉ）の融合タンパク質が、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤（ＵＧＩ）ドメインをさらに含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８】

シトシンデアミナーゼドメインが、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのＮ末端に融合している、請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】

ＵＧＩドメインが、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのＣ末端に融合している、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】

シトシンデアミナーゼおよびガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインが、任意のリンカーを介して融合している、請求項１～１９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２１】

ＵＧＩドメインが、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインに任意のリンカーを介して融合している、請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】

融合タンパク質が、構造NH_2－［シトシンデアミナーゼドメイン］－［任意のリンカー配列］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン］－［任意のリンカー配列］－［ＵＧＩドメイン］－ＣＯＯＨを含む、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】

融合タンパク質が、構造NH_2－［ＵＧＩドメイン］－［任意のリンカー配列］－［シトシンデアミナーゼドメイン］－［任意のリンカー配列］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン］－ＣＯＯＨを有する、請求項２１に記載の方法。

【請求項２４】

融合タンパク質が、構造NH_2－［シトシンデアミナーゼドメイン］－［任意のリンカー配列］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン］－ＣＯＯＨを有する、請求項２０に記載の方法。

【請求項２５】

任意のリンカーが、$(GGGS)_n$（配列番号３３７）、$(GGGGS)_n$（配列番号３０８）、$(G)_n$（配列番号７８３）、$(EAAAK)_n$（配列番号３０９）、$(GGS)_n$（配列番号７８４）、ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）、または$(XP)_n$（配列番号７８５）モチーフ、またはこれらのいずれかの組み合わせを含

み、ここで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、請求項２０～２４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６】

リンカーが、アミノ酸配列ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）を含む、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

リンカーが（ＧＧＳ）$_n$（配列番号７８４）であり、ここでｎは、１、３、または７である、請求項２５に記載の方法。

【請求項２８】

融合タンパク質が、配列番号２９３～３０２、１０７１、および１０８４のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、請求項１～２７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２９】

腫瘍特異的抗原が以下からなる群より選択される、請求項１～２８のいずれか一項に記載の方法：ＣＥＡ；ｇｐ１００；Ｐｍｅｌ１７；マンマグロビン－Ａ；メラン－Ａ；ＭＡＲＴ－１；ＮＹ－ＢＲ－１；ＥＲＢＢ２；ＯＡ１；ＰＡＰ；ＰＳＡ；ＲＡＢ３８；ＮＹ－ＭＥＬ－１；ＴＲＰ－１；ｇｐ７５；ＴＲＰ－２；チロシナーゼ；ＷＴ１；ＣＤ３３；ＢＡＧＥ－１；Ｄ３９３－ＣＤ２０ｎ；サイクリン－Ａ１；ＧＡＧＥ－１，２，８；ＧＡＧＥ－３，４，５，６，７；ＧｎＴＶｆ；ＨＥＲＶ－Ｋ－ＭＥＬ；ＫＫ－ＬＣ－１；ＫＭ－ＨＮ－１；ＬＡＧＥ－１；ＬＹ６Ｋ；ＭＡＧＥ－Ａ１；ＭＡＧＥ－Ａ２；ＭＡＧＥ－Ａ３；ＭＡＧＥ－Ａ４；ＭＡＧＥ－Ａ６；ＭＡＧＥ－Ａ９；ＭＡＧＥ－Ａ１０；ＭＡＧＥ－Ａ１２ｍ；ＭＡＧＥ－Ｃ１；ＭＡＧＥ－Ｃ２；ムチンク；ＮＡ８８－Ａ；ＮＹ－ＥＳＯ－１；ＬＡＧＥ－２；ＳＡＧＥ；Ｓｐ１７；ＳＳＸ－２；ＳＳＸ－４；サバイビン；ＢＩＲＣ５；ＴＡＧ－１；ＴＡＧ－２；ＴＲＡＧ－３；ＴＲＰ２－ＩＮＴ２ｇ；ＸＡＧＥ－１ｂ；ＧＡＧＥＤ２ａ；ＢＣＲ－ＡＢＬ（ｂ３ａ２）；アジポフィリン；ＡＩＭ－２；ＡＬＤＨ１Ａ１；ＢＣＬＸ（Ｌ）；ＢＩＮＧ－４；ＣＡＬＣＡ；ＣＤ４５；ＣＤ２７４；ＣＰＳＦ；サイクリンＤ１；ＤＫＫ１；ＥＮＡＨ（ｈＭｅｎａ）；ＥｐＣＡＭ；ＥｐｈＡ３；ＥＺＨ２；ＦＧＦ５；グリピカン－３；Ｇ２５０；ＭＮ；ＣＡＩＸ；ＨＥＲ－２；ｎｅｕ；ＨＬＡ－ＤＯＢ；ヘプシン；ＩＤＯ１；ＩＧＦ２Ｂ３；ＩＬ１３Ｒα２；腸のカルボキシルエステラーゼ；α－フェトプロテイン；カリクレイン４；ＫＩＦ２０Ａ；Lengsin；Ｍ－ＣＳＦ；ＭＣＳＰ；ｍｄｍ－２；Ｍｅｌｏｅ；ミッドカイン；ＭＭＰ－２；ＭＭＰ－７；ＭＵＣ１；ＭＵＣ５ＡＣ；ｐ５３；ＰＡＸ５；ＰＢＦ；ＰＲＡＭＥ；ＰＳＭＡ；ＲＡＧＥ－１；ＲＧＳ５；ＲｈｏＣ；ＲＮＦ４３；ＲＵ２ＡＳ；セセルニン１（secernin 1）；ＳＯＸ１０；ＳＴＥＡＰ１；テロメラーゼ；ＴＰＢＧ；およびＶＥＧＦ。

【請求項３０】

標的Ｃ塩基が、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドのコード領域に位置する標的コドンにある、請求項１～２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３１】

標的コドンが、表４および表８の標的コドンのいずれか１つである、請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】

標的コドンが、表４の修飾コドンのいずれか１つから選択される修飾コドンに変換される、請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】

標的Ｃ塩基が、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドの非コード領域に位置する、請求項１～２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４】

標的Ｃ塩基が、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチド中のイントロンに位置する、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

免疫原性ペプチドを腫瘍特異的抗原から生成することをさらに含む、請求項１～３４の

いずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
免疫原性ペプチドが、ヘテロクリティックエピトープである、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
ヘテロクリティックエピトープが、腫瘍特異的抗原からの天然エピトープよりも、少なくとも２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、またはそれ以上、免疫原性である、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
免疫原性ペプチドが、クリプティックエピトープである、請求項３５に記載の方法。
【請求項３９】
クリプティックエピトープが、腫瘍特異的抗原からの天然エピトープよりも、少なくとも２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、またはそれ以上、免疫原性である、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
免疫原性ペプチドが、ＭＨＣクラスＩ抗原提示経路を介して、腫瘍細胞の表面に提示される、請求項３５～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１】
免疫原性ペプチドが、ＭＨＣクラスＩＩ抗原提示経路を介して、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面に提示される、請求項３５～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
方法がin vivoで実施される、請求項３５～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
方法がex vivoで実施される、請求項３５～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
ＡＰＣが、腫瘍細胞、樹状細胞、単核食細胞、胸腺上皮細胞、およびＢ細胞からなる群より選択される、請求項４１に記載の方法。
【請求項４５】
免疫原性ペプチドが、腫瘍特異的抗原に対する適応免疫応答を誘導する、請求項３５～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
適応免疫応答が、樹状細胞の成熟、ＣＤ４＋ Ｔリンパ球の活性化、ＣＤ８＋Ｔリンパ球の活性化、Ｂリンパ球の活性化と成熟、および／または腫瘍抗原特異的抗体の生産を、促進することを含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
適応免疫応答が腫瘍細胞を殺傷し、腫瘍サイズを低減し、および／または転移を防止する、請求項４５または４６に記載の方法。
【請求項４８】
ガイドヌクレオチド配列がＲＮＡである、請求項１に記載の方法。
【請求項４９】
ＲＮＡが化学修飾されている、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
ガイドヌクレオチド配列が、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）である、請求項１に記載の方法。
【請求項５１】
腫瘍特異的抗原がｇｐ１００である、請求項３０に記載の方法。

【請求項５２】
ｇｐ１００が黒色腫由来である、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
ｇｐ１００のコドンＴ２１０における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｔ２１０Ｉ変異をもたらす、請求項５１または５２に記載の方法。
【請求項５４】
アミノ酸配列ＩＩＤＱＶＰＦＳＶ（配列番号７８６）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＩがＴ２１０Ｉ変異に対応する、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７２４および８７０～８８８からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
ｇｐ１００のコドンＡ２８８における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ａ２８８Ｖ変異をもたらす、請求項５１または５２に記載の方法。
【請求項５７】
アミノ酸配列ＹＬＥＰＧＰＶＴＶ（配列番号８１８）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置７のＶがＡ２８８Ｖ変異に対応する、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７２５および８８９からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
ｇｐ１００のコドンＴ１５５における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｔ１５５Ｉ変異をもたらす、請求項５１または５２に記載の方法。
【請求項６０】
アミノ酸配列ＫＩＷＧＱＹＷＱＶ（配列番号７８７）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＩがＴ１５５Ｉ変異に対応する、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
腫瘍特異的抗原が、Ｔ細胞１によって認識される黒色腫抗原（ＭＡＲＴ－１）である、請求項３０に記載の方法。
【請求項６２】
ＭＡＲＴ－１抗原が、黒色腫由来である、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
ＭＡＲＴ－１のコドンＡ２７における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ａ２７Ｖ変異をもたらす、請求項６１または６２に記載の方法。
【請求項６４】
アミノ酸配列ＥＶＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号８１９）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＶがＡ２７Ｖ変異に対応する、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７２７および８９３～８９６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
腫瘍特異的抗原が、がん／精巣抗原１Ｂ（ＮＹ－ＥＳＯ－１）である、請求項３０に記載の方法。
【請求項６７】
ＮＹ－ＥＳＯ－１抗原が、黒色腫または乳がん由来である、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
ＮＹ－ＥＳＯ－１のコドンＣ１６５における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｃ１６５Ｙ変異をもたらす、請求項６６または６７に記載の方法。
【請求項６９】
アミノ酸配列ＳＬＬＭＷＩＴＱＹ（配列番号７８８）を含むヘテロクリティックエピト

ープが生成され、位置９のＣがＣ１６５Ｙ変異に対応する、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７２８および８９７からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
腫瘍特異的抗原が、チロシナーゼ（ＴＹＲ）である、請求項３０に記載の方法。
【請求項７２】
ＴＹＲ抗原が、黒色腫由来である、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
ＴＹＲのコドンＴ３７３における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｔ３７３Ｉ変異をもたらす、請求項７１または７２に記載の方法。
【請求項７４】
アミノ酸配列ＹＭＮＧＩＭＳＱＶ（配列番号７８９）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置５のＩがＴ３７３Ｉ変異に対応する、請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７２９および８９８～９０１からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
腫瘍特異的抗原が、チロシナーゼ関連タンパク質１（ＴｙＲＰ１）である、請求項３０に記載の方法。
【請求項７７】
ＴｙＲＰ１抗原が、黒色腫由来である、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
ＴｙＲＰ１のコドンＣ２４４における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｃ２４４Ｙ変異をもたらす、請求項７６または７７に記載の方法。
【請求項７９】
アミノ酸配列ＤＡＥＫＹＤＩＣＴＤＥＹ（配列番号７９０）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置５のＹがＣ２４４Ｙ変異に対応する、請求項７８に記載の方法。
【請求項８０】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７３０および９０２からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
腫瘍特異的抗原が、サバイビンである、請求項３０に記載の方法。
【請求項８２】
サバイビンが、黒色腫、乳がん、または白血病に由来する、請求項８１に記載の方法。
【請求項８３】
サバイビンのコドンＴ９７における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｔ９７Ｉ変異をもたらす、請求項８１または８２に記載の方法。
【請求項８４】
アミノ酸配列ＥＬＩＬＧＥＦＬＫＬ（配列番号７９１）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置３のＩがＴ９７Ｉ変異に対応する、請求項８３に記載の方法。
【請求項８５】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７３１および９０３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項８４に記載の方法。
【請求項８６】
腫瘍特異的抗原が、テロメラーゼ逆転写酵素（ｈＴＥＲＴ）である、請求項３０に記載の方法。
【請求項８７】
ｈＴＥＲＴが、乳がん由来である、請求項８６に記載の方法。

【請求項８８】
ｈＴＥＲＴのコドンＭ５４９における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｍ５４９Ｉ変異をもたらす、請求項８６または８７に記載の方法。
【請求項８９】
アミノ酸配列ＩＬＡＫＦＬＨＷＬＩ（配列番号７９２）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置１０のＩがＭ５４９Ｉ変異に対応する、請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７３５および９１６～９２０からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項８９に記載の方法。
【請求項９１】
腫瘍特異的抗原が、ヒト上皮成長因子受容体２（ＨＥＲ２）である、請求項３０に記載の方法。
【請求項９２】
ＨＥＲ２が、乳がん由来である、請求項９１に記載の方法。
【請求項９３】
ＨＥＲ２のコドンＶ６５８における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｖ６５８Ｍ変異をもたらす、請求項９１または９２に記載の方法。
【請求項９４】
アミノ酸配列ＡＭＶＧＩＬＬＶＶＶ（配列番号７９３）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＭがＶ６５８Ｍ変異に対応する、請求項９３に記載の方法。
【請求項９５】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７３２および９０４～９０９からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項９４に記載の方法。
【請求項９６】
ＨＥＲ２のコドンＴ９１２における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｔ９１２Ｉ変異をもたらす、請求項９１または９２に記載の方法。
【請求項９７】
アミノ酸配列ＩＩＷＥＬＭＴＦＧＡ（配列番号７９４）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＩがＴ９１２Ｉ変異に対応する、請求項９６に記載の方法。
【請求項９８】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７３３および９１０～９１２からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項９７に記載の方法。
【請求項９９】
ＨＥＲ２のコドンＡ９２０における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ａ９２０Ｖ変異をもたらす、請求項９１または９２に記載の方法。
【請求項１００】
アミノ酸配列ＩＴＷＥＬＭＴＦＧＶ（配列番号７９５）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置１０のＶがＡ９２０Ｖ変異に対応する、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０１】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７３４および９１３～９１５からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０２】
腫瘍特異的抗原が、ＣＤ３３である、請求項３０に記載の方法。
【請求項１０３】
ＣＤ３３が、白血病由来である、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１０４】
ＣＤ３３のコドンＡ６５における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ａ６５Ｖ変異をもたらす、請求項１０２または１０３に記載の方法。

【請求項１０５】
アミノ酸配列ＶＩＩＳＧＤＳＰＶ（配列番号７９６）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置１のＶがＡ６５Ｖ変異に対応する、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７４０および９３０～９３２からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
腫瘍特異的抗原が、滑膜肉腫Ｘブレークポイント２（ＳＳＸ２）である、請求項３０に記載の方法。
【請求項１０８】
ＳＳＸ２のコドンＡ４２における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ａ４２Ｖ変異をもたらす、請求項１０７に記載の方法。
【請求項１０９】
アミノ酸配列ＫＶＳＥＫＩＦＹＶ（配列番号７９７）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＶがＡ４２Ｖ変異に対応する、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７３７および９２１からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項１０９に記載の方法。
【請求項１１１】
腫瘍特異的抗原が、ウィルムス腫瘍１（ＷＴ１）タンパク質である、請求項３０に記載の方法。
【請求項１１２】
ＷＴ１が、白血病由来である、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
ＷＴ１のコドンＣ２３５における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｃ２３５Ｙ変異をもたらす、請求項１１１または１１２に記載の方法。
【請求項１１４】
アミノ酸配列ＹＭＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号７９８）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置１のＹがＣ２３５Ｙ変異に対応する、請求項１１３に記載の方法。
【請求項１１５】
ＷＴ１のコドンＭ２３６における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｍ２３６Ｉ変異をもたらす、請求項１１１または１１２に記載の方法。
【請求項１１６】
アミノ酸配列ＣＩＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号７９９）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＩがＭ２３６Ｉ変異に対応する、請求項１１５に記載の方法。
【請求項１１７】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７３９および９２６～９２９からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項１１４または１１６に記載の方法。
【請求項１１８】
腫瘍特異的抗原が、上皮細胞接着分子前駆体（ＥｐＣＡＭ）である、請求項３０に記載の方法。
【請求項１１９】
ＥｐＣＡＭのコドンＴ１９２における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｔ１９２Ｉ変異をもたらす、請求項１１８に記載の方法。
【請求項１２０】
アミノ酸配列ＩＬＹＥＮＮＶＩＩ（配列番号８００）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置９のＩがＴ１９２Ｉ変異に対応する、請求項１１８または１１９に記載の方法。
【請求項１２１】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７４１および９３３～９３４からなる群より選択

されるヌクレオチド配列を含む、請求項１２０に記載の方法。
【請求項１２２】
腫瘍特異的抗原が、癌胎児性抗原関連細胞接着分子（ＣＥＡ－ＣＡＭ）である、請求項３０に記載の方法。
【請求項１２３】
ＣＥＡ－ＣＡＭが、大腸がん、肺がん、または乳がんに由来する、請求項１２２に記載の方法。
【請求項１２４】
ＣＥＡ－ＣＡＭのコドンＴ３１における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｔ３１４Ｉ変異をもたらす、請求項１２２または１２３に記載の方法。
【請求項１２５】
アミノ酸配列ＬＬＴＦＷＮＰＰＩ（配列番号８０１）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置９のＩがＴ３１４Ｉ変異に対応する、請求項１２４に記載の方法。
【請求項１２６】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７４２および９３５～９３６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項１２５に記載の方法。
【請求項１２７】
ＣＥＡ－ＣＡＭのコドンＴ３１１における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｔ３１１Ｉ変異をもたらす、請求項１２２または１２３に記載の方法。
【請求項１２８】
アミノ酸配列ＲＩＴＶＴＴＩＴＶ（配列番号８０２）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＶがＴ３１１Ｉ変異に対応する、請求項１２７に記載の方法。
【請求項１２９】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７４３および９３７～９４０からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３０】
ＣＥＡ－ＣＡＭのコドンＴ６８８における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｔ６８８Ｖ変異をもたらす、請求項１２２または１２３に記載の方法。
【請求項１３１】
アミノ酸配列ＡＶＶＧＩＭＩＧＶ（配列番号８０３）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＶがＴ６８８Ｖ変異に対応する、請求項１３０に記載の方法。
【請求項１３２】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７４４および９４１～９４７からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項１３１に記載の方法。
【請求項１３３】
ＣＥＡ－ＣＡＭのコドンＶ６９５における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｖ６９５Ｍ変異をもたらす、請求項１２２または１２３に記載の方法。
【請求項１３４】
アミノ酸配列ＩＭＩＧＭＬＶＧＶ（配列番号８０４）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置５のＭがＶ６９５Ｍ変異に対応する、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１３５】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７４５および９４８～９５３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項１３４に記載の方法。
【請求項１３６】
腫瘍特異的抗原が、黒色腫関連抗原Ａ３（ＭＡＧＥＡ３）である、請求項３０に記載の方法。
【請求項１３７】
ＭＡＧＥＡ３のコドンＨ１１８における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｈ１１８Ｙ変異をもたらす、請求項１３６に記載の方法。
【請求項１３８】

アミノ酸配列ＫＶＡＥＬＶＹＦＬ（配列番号８０５）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置７のＹがＨ１１８Ｙ変異に対応する、請求項１３６または１３７に記載の方法。

【請求項１３９】

ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７４６および９５４からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項１３８に記載の方法。

【請求項１４０】

腫瘍特異的抗原が、黒色腫関連抗原（ＭＡＧＥ）共通抗原Ａ３、Ａ１、Ａ４、Ａ２、またはＡ１２である、請求項３０に記載の方法。

【請求項１４１】

ＭＡＧＥ共通抗原Ａ３、Ａ１、Ａ４、Ａ２、またはＡ１２のコドンＣ１８１における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｃ１８１Ｙ変異をもたらす、請求項１４０に記載の方法。

【請求項１４２】

アミノ酸配列ＹＬＧＬＳＹＤＧＬＬ（配列番号８０６）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置１のＹがＣ１８１Ｙ変異に対応する、請求項１４１に記載の方法。

【請求項１４３】

ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７４７～７５０および９５５～９８３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項１４２に記載の方法。

【請求項１４４】

腫瘍特異的抗原が、ＭＵＣ－１である、請求項３０に記載の方法。

【請求項１４５】

ＭＵＣ－１のコドンＴ９３における標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｔ９３Ｉ変異をもたらす、請求項１４４に記載の方法。

【請求項１４６】

アミノ酸配列ＡＩＷＧＱＤＶＴＳＶ（配列番号８０７）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＩがＴ９３Ｉ変異に対応する、請求項１４５に記載の方法。

【請求項１４７】

ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７５１および９８４～９８５からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項１４６に記載の方法。

【請求項１４８】

標的Ｃ塩基が、プレメラノソームタンパク質（ＰＭＥＬ）遺伝子のイントロン４に位置する、請求項３３に記載の方法。

【請求項１４９】

標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、アミノ酸配列ＶＹＦＦＬＰＤＨＬ（配列番号８０８）を含むクリプティックペプチドをもたらす、請求項１４８に記載の方法。

【請求項１５０】

ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７５２～７５３および９８６～９９８からなる群より選択されるヌクレオチドを含む、請求項１４９に記載の方法。

【請求項１５１】

標的Ｃ塩基が、ＴＹＲＰ１遺伝子のオープンリーディングフレーム１（ＯＲＦ１）の相補鎖上に位置する、請求項３３に記載の方法。

【請求項１５２】

標的Ｃ塩基が、ＴＹＲＰ１遺伝子のＯＲＦ１の第１の開始コドン（ＡＴＧ）の相補株に位置する、請求項１５１に記載の方法。

【請求項１５３】

標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、アミノ酸配列ＭＳＬＱＲＱＦＬＲ（配列番号８０９）を含むクリプティックペプチドをもたらす、請求項１５１または１５２に記載の方法。

【請求項１５４】

ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７５４および９９９～１００５からなる群より選

択されるヌクレオチドを含む、請求項１５３に記載の方法。
【請求項１５５】
標的Ｃ塩基が、マンノシル（アルファ－１，６－）－糖タンパク質ベーター１，６－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（ＭＧＡＴ５）遺伝子のイントロン２の最後の塩基の相補鎖上に位置する、請求項３３に記載の方法。
【請求項１５６】
標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、アミノ酸配列ＶＬＰＤＶＦＩＲＣＶ（配列番号８１０）を含むクリプティックペプチドをもたらす、請求項１５５に記載の方法。
【請求項１５７】
クリプティックペプチドが、ＭＧＡＴ５遺伝子のエクソン３から翻訳される、請求項１５６に記載の方法。
【請求項１５８】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７５５および１００６～１００８からなる群より選択されるヌクレオチドを含む、請求項１５６または１５７に記載の方法。
【請求項１５９】
標的Ｃ塩基が、がん／精巣抗原２（ＬＡＧＥ－１）遺伝子のオープンリーディングフレーム１（ＯＲＦ１）に位置する、請求項３３に記載の方法。
【請求項１６０】
標的Ｃ塩基が、ＬＡＧＥ－１遺伝子のＯＲＦ１の第１の開始コドンの相補鎖に位置する、請求項１５９に記載の方法。
【請求項１６１】
標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、ＭＬＭＡＱＥＡＬＡＦＬ（配列番号８１１）、ＬＡＡＱＥＲＲＶＰＲ（配列番号８１２）、ＡＰＲＧＶＲＭＡＶ（配列番号８１３）、ＱＧＡＭＬＡＡＱＥＲＲＶＰＲＡＡＥＶＰＲ（配列番号８１４）、およびＣＬＳＲＲＰＷＫＲＳＷＳＡＧＳＣＰＧＭＰＨＬ（配列番号８１５）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むクリプティックペプチドをもたらす、請求項１５９または１６０に記載の方法。
【請求項１６２】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７５６および１００９～１０１４からなる群より選択されるヌクレオチドを含む、請求項１６１に記載の方法。
【請求項１６３】
標的Ｃ塩基が、チロシナーゼ関連タンパク質２（ＴＲＰ－２）遺伝子のイントロン２に位置する、請求項３３に記載の方法。
【請求項１６４】
標的Ｃ塩基が、ＴＲＰ－２遺伝子のイントロン２の第１の塩基の相補鎖上に位置する、請求項１６３に記載の方法。
【請求項１６５】
標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、アミノ酸配列ＥＶＩＳＣＫＬＩＫＲ（配列番号８１６）を含むクリプティックペプチドをもたらす、請求項１６３または１６４に記載の方法。
【請求項１６６】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７５７～７５８および１０１５～１０２３からなる群より選択されるヌクレオチドを含む、請求項１６５に記載の方法。
【請求項１６７】
標的Ｃ塩基が、バキュロウイルスＩＡＰリピート含有５（ＢＩＲＣ５）遺伝子のイントロン２に位置する、請求項３３に記載の方法。
【請求項１６８】
標的Ｃ塩基が、ＢＩＲＣ５遺伝子のイントロン２のスプライソソーム分岐部位に位置する、請求項１６７に記載の方法。
【請求項１６９】
標的Ｃ塩基が、ＢＩＲＣ５遺伝子のイントロン２の最後の塩基の相補鎖に位置する、請求項１６７または１６８に記載の方法。

【請求項１７０】
標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、アミノ酸配列ＡＹＡＣＮＴＳＴＬ（配列番号８１７）を含むクリプティックペプチドをもたらす、請求項Ａ１５０～Ａ１５０．２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７１】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７５９～７６０および１０２４～１０３１からなる群より選択されるヌクレオチドを含む、請求項１７０に記載の方法。
【請求項１７２】
標的Ｃ塩基が、ＢＣＲ／ＡＢＬ融合タンパク質（ＢＣＲ／ＡＢＬ－ＯＯＦ）遺伝子のイントロン１アクセプター部位に位置する、請求項３３に記載の方法。
【請求項１７３】
標的Ｃ塩基が、ＢＣＲ／ＡＢＬ融合タンパク質（ＢＣＲ／ＡＢＬ－ＯＯＦ）遺伝子のイントロン２アクセプター部位に位置する、請求項３３に記載の方法。
【請求項１７４】
標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、ＳＳＫＡＬＱＲＰＶ（配列番号６０３）、ＧＦＫＱＳＳＫＡＬ（配列番号６０４）、およびＡＴＧＦＫＱＳＳＫＡＬＱＲＰＶＡＳ（配列番号６０５）のいずれか１つのアミノ酸配列を含むクリプティックペプチドをもたらす、請求項１７２または１７３に記載の方法。
【請求項１７５】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７６１および１０３２～１０４５からなる群より選択されるヌクレオチドを含む、請求項１７２に記載の方法。
【請求項１７６】
ガイドヌクレオチド配列が、配列番号７６２および１０４６～１０５６からなる群より選択されるヌクレオチドを含む、請求項１７２に記載の方法。
【請求項１７７】
方法がさらに、免疫チェックポイント阻害剤の治療有効量を対象に投与することを含む、請求項１～１７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７８】
免疫チェックポイント阻害剤が、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＢＴＬＡ、ＧＡＬ９、Ｃｈｋ１、またはＡ２ａＲの、同族結合パートナーへの結合を阻害する、請求項１７７に記載の方法。
【請求項１７９】
免疫チェックポイント阻害剤が、抗体またはそのフラグメントである、請求項１７７または１７８に記載の方法。
【請求項１８０】
抗体が、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＴＩＭ３抗体、抗ＬＡＧ３抗体、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗Ｂ７－Ｈ４抗体、抗ＢＴＬＡ抗体、抗ＧＡＬ９抗体、抗Ｃｈｋ１抗体、および抗Ａ２ａＲ抗体から選択される、請求項１７９に記載の方法。
【請求項１８１】
抗体が、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、およびイピリムマブから選択される、請求項１８０に記載の方法。
【請求項１８２】
免疫チェックポイント阻害剤が小分子である、請求項１７７または１７８に記載の方法。
【請求項１８３】
免疫チェックポイント阻害剤が組換えタンパク質である、請求項１７７または１７８に記載の方法。
【請求項１８４】
免疫チェックポイント阻害剤が核酸アプタマーである、請求項１７７または１７８に記

載の方法。
【請求項１８５】
免疫チェックポイント阻害が、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＢＴＬＡ、ＧＡＬ９、Ｃｈｋ１、またはＡ２ａＲからなる群より選択される遺伝子のゲノム編集によって行われる、請求項１７７または１７８に記載の方法。
【請求項１８６】
がんを処置する方法であって、該方法は、それを必要とする対象に、以下：
（ｉ）（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメイン、を含む融合タンパク質；および
（ｉｉ）ガイドヌクレオチド配列、
を含む組成物の治療有効量を投与することを含み、
ここで（ｉ）の融合タンパク質および（ｉｉ）のガイドヌクレオチド配列は腫瘍細胞に入り、およびここでガイドヌクレオチド配列は、（ｉ）の融合タンパク質を腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化し、ここで融合タンパク質は、ポリヌクレオチドの標的シトシン（Ｃ）残基を（Ｔ）残基に変更する、前記方法。
【請求項１８７】
対象に免疫チェックポイント阻害剤の治療有効量を投与することをさらに含む、請求項１８６に記載の方法。
【請求項１８８】
腫瘍特異的免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、該方法は、対象に、以下：
（ｉ）（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）ヌクレアーゼドメイン、を含む融合タンパク質；および
（ｉｉ）ガイドヌクレオチド配列、
を含む組成物の治療有効量を投与することを含み、
ここで（ｉ）の融合タンパク質および（ｉｉ）のガイドヌクレオチド配列は腫瘍細胞に入り、およびここでガイドヌクレオチド配列は、（ｉ）の融合タンパク質を腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化し、ここで融合タンパク質は、ポリヌクレオチドにインデルを導入する、前記方法。
【請求項１８９】
ヌクレアーゼが、ＦｏｋＩヌクレアーゼである、請求項１８８に記載の方法。
【請求項１９０】
腫瘍特異的免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、該方法は、対象に、以下：
（ｉ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なヌクレアーゼ；および
（ｉｉ）ガイドヌクレオチド配列；
を含む組成物の治療有効量を投与することを含み、
ここで（ｉ）の融合タンパク質および（ｉｉ）のガイドヌクレオチド配列は腫瘍細胞に入り、およびここでガイドヌクレオチド配列は、（ｉ）の融合タンパク質を腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化し、ここでガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なヌクレアーゼは、ポリヌクレオチドにインデルを導入する、前記方法。
【請求項１９１】
ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なヌクレアーゼが、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、アルゴノート、またはそのバリアントを含む、請求項１８６～１９０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９２】
インデルが、変異またはフレームシフトを引き起こす、請求項１８８～１９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９３】

腫瘍特異的免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、該方法は、それを必要とする対象に、（ａ）プログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）デアミナーゼドメインを含む融合タンパク質を含む組成物の治療有効量を投与することを含み；
ここで、融合タンパク質は腫瘍細胞に入り、ポリヌクレオチドの標的塩基を脱アミノ化を介して変更する、前記方法。
【請求項１９４】
デアミナーゼドメインがシトシンデアミナーゼを含み、標的塩基がシトシン（Ｃ）塩基である、請求項１９３に記載の方法。
【請求項１９５】
プログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を含む、請求項１９３～１９４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９６】
プログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインが、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）を含む、請求項１９３～１９４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９７】
プログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインが、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインである、請求項１９３～１９４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９８】
プログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインが、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Ｃｐｆ１ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型アルゴノートドメイン、およびそれらのバリアントからなる群より選択される、請求項１９７に記載の方法。
【請求項１９９】
プログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインが、ガイドヌクレオチド配列に会合している、請求項１９７または１９８に記載の方法。
【請求項２００】
標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、Ｃからチミン（Ｔ）への変更をもたらす、請求項１９４に記載の方法。
【請求項２０１】
標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、翻訳コドンにおいてＣ－Ｇ塩基対からチミン－アデニン（Ｔ－Ａ）への変更をもたらし、免疫原性ペプチドまたはヘテロクリティックペプチドに異なるアミノ酸の取り込みをもたらす、請求項２００に記載の方法。
【請求項２０２】
標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、遺伝子の非コードイントロン領域においてＣ－Ｇ塩基対からチミン－アデニン（Ｔ－Ａ）への変更をもたらし、免疫原性ペプチド配列またはクリプティックペプチド配列の選択的スプライシングおよび翻訳をもたらす、請求項２００に記載の方法。
【請求項２０３】
標的Ｃ塩基の脱アミノ化が、遺伝子のオープンリーディングフレームの開始（Ｍｅｔ）コドンにおいてＣ－Ｇ塩基対からチミン－アデニン（Ｔ－Ａ）への変更をもたらし、免疫原性ペプチド配列またはクリプティックペプチド配列を含む代替オープンリーディングフレームの翻訳をもたらす、請求項２００に記載の方法。
【請求項２０４】
以下を含む組成物：
（ｉ）（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメイン、を含む融合タンパク質；および（ｉｉ）（ｉ）の融合タンパク質を、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化する、ガイドヌクレオチド配列。
【請求項２０５】

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびガイドヌクレオチド配列を含む組成物であって、ここで融合タンパク質は、（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメインを含み、およびここでガイドヌクレオチド配列は、融合タンパク質を、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化する、前記組成物。

【請求項２０６】

以下を含むがんワクチン：

（ｉ）（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメイン、を含む融合タンパク質；および（ｉｉ）（ｉ）の融合タンパク質を、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化する、ガイドヌクレオチド配列。

【請求項２０７】

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびガイドヌクレオチド配列を含むがんワクチンであって、ここで融合タンパク質は、（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメインを含み、およびここでガイドヌクレオチド配列は、融合タンパク質を腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化する、前記がんワクチン。

【請求項２０８】

請求項２０４もしくは２０５に記載の組成物、または請求項２０６もしくは２０７に記載のがんワクチンを含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本出願は、２０１７年３月９日出願の米国仮出願U.S.S.N. 62/469,219に対する35 U.S.C § 119(e)の下における優先権を主張し、当該仮出願は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００２】

発明の背景

腫瘍特異的免疫応答は、腫瘍細胞内または腫瘍細胞表面で発現されたタンパク質から生成されるペプチド（例えば、腫瘍特異的抗原）により、誘導され得る。腫瘍特異的抗原に由来する天然ペプチドは、免疫系により「自己」として耐容され、腫瘍特異的抗原に対する強い免疫応答を誘導しない。腫瘍特異的抗原に由来する天然ペプチドの変更バージョン（例えば、ヘテロクリティックペプチドまたはクリプティックペプチド）は、ＭＨＣ－ＩおよびＭＨＣ－ＩＩ抗原提示経路を介して強力な免疫反応を誘導するように操作され得、これはまた、天然の腫瘍特異的抗原配列に対する交差反応性応答を生成する。

【０００３】

免疫系は、原発性および転移性がん細胞の両方を含む腫瘍細胞を殺すよう機能できることが十分に確立されている。実際、免疫系が腫瘍性がん細胞の存在を認識するという証拠が、腫瘍組織における浸潤リンパ球の存在によって裏付けられている（Haskill et al., 1978, Contemp. Top. Immunobiol. 8: 107-170；Vose and Moore, 1985., Semin。Hematol. 22: 27-40）。しかし、完全には明らかではない理由により、免疫細胞の存在にもかかわらず、腫瘍はしばしば広がり、生き延びるだけでなく無制限の成長を伴って遠隔部位に転移する。Ｔ細胞活性化の理解および標的細胞の認識における最近の進歩により、Ｔ細胞媒介性がん免疫療法の開発に、ある程度の進歩が可能となり始めている（Schwartz., 1992, Cell 71:1065-1068；Pardoll, 1992, Curr. Opin. Immunol. 4: 619-623）。

【発明の概要】

【０００４】

本明細書に記載されるのは、in vivoまたはex vivoでがんワクチンとして使用され得る

、腫瘍特異的抗原に由来する免疫原性ペプチド（例えば、ヘテロクリティックエピトープまたはクリプティックエピトープ）を生産するための、システム、方法、組成物、およびキットである。標的変異は、遺伝子編集剤、例えばシトシンデアミナーゼに融合したプログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインを含む核酸塩基エディター（例えば、触媒的に不活性なＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼ）を使用して、腫瘍特異的抗原に導入され、腫瘍特異的抗原から生じるペプチド（ヘテロクリティックエピトープ）、または腫瘍特異的抗原遺伝子の通常非翻訳領域から生じるペプチド（クリプティックペプチド）の変更バージョンを生成する。ヘテロクリティックペプチドまたはクリプティックペプチドは、in vivoで対象（例えば、がんを有する対象）で生成され、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩ経路を介して適応免疫系に提示され、これは次に、強い適応免疫応答を、例えばＴ細胞応答およびＢ細胞応答を誘導する。かかる適応免疫応答は抗原特異的であり、腫瘍の成長を抑え転移を防ぐのに効果的である。

【０００５】

本開示のいくつかの側面は、それを必要とする対象において腫瘍特異的免疫応答を誘導する方法を提供し、この方法は、対象に、（ｉ）（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメイン、を含む融合タンパク質；および（ｉｉ）ガイドヌクレオチド配列、を含む組成物の治療有効量を投与することを含み、ここで（ｉｉ）のガイドヌクレオチド配列は、（ｉ）の融合タンパク質を腫瘍細胞中の腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化し、ここで融合タンパク質は、標的シトシン（Ｃ）塩基をチミン（Ｔ）塩基へと脱アミノ化を介して変更する。

【０００６】

いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、コード鎖および相補鎖を含む。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、コード領域および非コード領域を含む。いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドは、腫瘍細胞のゲノムに位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｃ－Ｇ塩基対からチミン－アデニン（Ｔ－Ａ）塩基対への変更をもたらす。

【０００７】

いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Ｃｐｆ１ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型アルゴノートドメイン、およびそれらのバリアントからなる群より選択される。

【０００８】

いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）ドメインである。いくつかの態様において、ｄＣａｓ９ドメインのアミノ酸配列は、配列番号１のＤ１０Ａおよび／またはＨ８４０Ａ変異に対応する変異を含む。いくつかの態様において、ｄＣａｓ９ドメインのアミノ酸配列は、配列番号１のＤ１０Ａ変異に対応する変異を含み、ここでｄＣａｓ９ドメインは、配列番号１のアミノ酸８４０に対応する位置に、ヒスチジンを含む。

【０００９】

いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、ヌクレアーゼ不活性型Ｃｐｆ１（ｄＣｐｆ１）ドメインを含む。いくつかの態様において、ｄＣｐｆ１ドメインは、AcidaminococcusまたはLachnospiraceaeの種からである。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、ヌクレアーゼ不活性型アルゴノート（ｄＡｇｏ）ドメインを含む。いくつかの態様において、（ｄＡｇｏ）ドメインは、Natronobacterium gregoryiからである（ｄＮｇＡｇｏ）。

【００１０】

いくつかの態様において、シトシンデアミナーゼドメインは、アポリポタンパク質Ｂ－

ｍＲＮＡ編集複合体（ＡＰＯＢＥＣ）ファミリーデアミナーゼを含む。いくつかの態様において、シトシンデアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ１、ＡＰＯＢＥＣ２、ＡＰＯＢＥＣ３Ａ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｂ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｃ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｄ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｆ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｇデアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｈデアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ４デアミナーゼ、および活性化誘導デアミナーゼ（ＡＩＤ）からなる群より選択される。いくつかの態様において、シトシンデアミナーゼは、配列番号２７～２９２、３０３、および１０７２～１０８３のいずれかのアミノ酸配列を含む。

【００１１】

いくつかの態様において、（ａ）の融合タンパク質はさらに、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤（ＵＧＩ）ドメインを含む。いくつかの態様において、シトシンデアミナーゼドメインは、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのＮ末端に融合している。いくつかの態様において、ＵＧＩドメインは、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのＣ末端に融合している。いくつかの態様において、シトシンデアミナーゼとガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、任意のリンカーを介して融合している。いくつかの態様において、ＵＧＩドメインは、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインに、任意のリンカーを介して融合している。

【００１２】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、構造NH_2－［シトシンデアミナーゼドメイン］－［任意のリンカー配列］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン］－［任意のリンカー配列］－［ＵＧＩドメイン］－ＣＯＯＨを含む。

【００１３】

いくつかの態様において、任意のリンカーは、$(GGGS)_n$（配列番号３３７）、$(GGGGS)_n$（配列番号３０８）、$(G)_n$（配列番号７８３）、$(EAAAK)_n$（配列番号３０９）、$(GGS)_n$（配列番号７８４）、ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）、または$(XP)_n$（配列番号７８５）モチーフ、またはこれらのいずれかの組み合わせを含み、ここで、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。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）を含む。いくつかの態様において、リンカーは$(GGS)_n$（配列番号７８４）であり、ｎは１、３、または７である。

【００１４】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、配列番号２９３～３０２、１０７１、および１０８４のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【００１５】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、以下からなる群より選択される：ＣＥＡ；ｇｐ１００；Ｐｍｅｌ１７；マンマグロビン－Ａ；メラン－Ａ；ＭＡＲＴ－１；ＮＹ－ＢＲ－１；ＥＲＢＢ２；ＯＡ１；ＰＡＰ；ＰＳＡ；ＲＡＢ３８；ＮＹ－ＭＥＬ－１；ＴＲＰ－１；ｇｐ７５；ＴＲＰ－２；チロシナーゼ；ＷＴ１；ＣＤ３３；ＢＡＧＥ－１；Ｄ３９３－ＣＤ２０ｎ；サイクリン－Ａ１；ＧＡＧＥ－１，２，８；ＧＡＧＥ－３，４，５，６，７；ＧｎＴＶｆ；ＨＥＲＶ－Ｋ－ＭＥＬ；ＫＫ－ＬＣ－１；ＫＭ－ＨＮ－１；ＬＡＧＥ－１；ＬＹ６Ｋ；ＭＡＧＥ－Ａ１；ＭＡＧＥ－Ａ２；ＭＡＧＥ－Ａ３；ＭＡＧＥ－Ａ４；ＭＡＧＥ－Ａ６；ＭＡＧＥ－Ａ９；ＭＡＧＥ－Ａ１０；ＭＡＧＥ－Ａ１２ｍ；ＭＡＧＥ－Ｃ１；ＭＡＧＥ－Ｃ２；ムチンク；ＮＡ８８－Ａ；ＮＹ－ＥＳＯ－１；ＬＡＧＥ－２；ＳＡＧＥ；Ｓｐ１７；ＳＳＸ－２；ＳＳＸ－４；サバイビン；ＢＩＲＣ５；ＴＡＧ－１；ＴＡＧ－２；ＴＲＡＧ－３；ＴＲＰ２－ＩＮＴ２ｇ；ＸＡＧＥ－１ｂ；ＧＡＧＥＤ２ａ；ＢＣＲ－ＡＢＬ（ｂ３ａ２）；アジポフィリン；ＡＩＭ－２；ＡＬＤＨ１Ａ１；ＢＣＬＸ（Ｌ）；ＢＩＮＧ－４；ＣＡＬＣＡ；ＣＤ４５；ＣＤ２７４；ＣＰＳＦ；サイクリンＤ１；ＤＫＫ１；ＥＮＡＨ（ｈＭｅｎａ）；ＥｐＣＡＭ；ＥｐｈＡ３；ＥＺＨ２；ＦＧＦ５；

グリピカン－３；Ｇ２５０；ＭＮ；ＣＡＩＸ；ＨＥＲ－２；ｎｅｕ；ＨＬＡ－ＤＯＢ；ヘプシン；ＩＤＯ１；ＩＧＦ２Ｂ３；ＩＬ１３Ｒα２；腸のカルボキシルエステラーゼ；α－フェトプロテイン；カリクレイン４；ＫＩＦ２０Ａ；Lengsin；Ｍ－ＣＳＦ；ＭＣＳＰ；ｍｄｍ－２；Ｍｅｌｏｅ；ミッドカイン；ＭＭＰ－２；ＭＭＰ－７；ＭＵＣ１；ＭＵＣ５ＡＣ；ｐ５３；ＰＡＸ５；ＰＢＦ；ＰＲＡＭＥ；ＰＳＭＡ；ＲＡＧＥ－１；ＲＧＳ５；ＲｈｏＣ；ＲＮＦ４３；ＲＵ２ＡＳ；セセルニン１（secernin 1）；ＳＯＸ１０；ＳＴＥＡＰ１；テロメラーゼ；ＴＰＢＧ；およびＶＥＧＦ。

【００１６】

いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドのコード領域に位置する標的コドンにある。いくつかの態様において、標的コドンは、表４および８の標的コドンのいずれか１つである。

【００１７】

いくつかの態様において、標的コドンは、表４の修飾コドンのいずれか１つから選択される修飾コドンに変換される。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドの非コード領域に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドのイントロンに位置する。

【００１８】

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法はさらに、腫瘍特異的抗原から免疫原性ペプチドを生成することを含む。いくつかの態様において、免疫原性ペプチドは、ヘテロクリティックエピトープである。いくつかの態様において、ヘテロクリティックエピトープは、腫瘍特異的抗原からの天然エピトープより少なくとも２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、またはそれ以上、免疫原性である。いくつかの態様において、免疫原性ペプチドは、クリプティックエピトープである。いくつかの態様において、クリプティックエピトープは、腫瘍特異的抗原からの天然エピトープより少なくとも２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、またはそれ以上、免疫原性である。

【００１９】

いくつかの態様において、免疫原性ペプチドは、ＭＨＣクラスＩ抗原提示経路を介して、腫瘍細胞の表面に提示される。いくつかの態様において、免疫原性ペプチドは、ＭＨＣクラスＩＩ抗原提示経路を介して、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面に提示される。

【００２０】

いくつかの態様において、方法はin vivoで実施される。いくつかの態様において、方法はex vivoで実施される。

【００２１】

いくつかの態様において、ＡＰＣは、腫瘍細胞、樹状細胞、単核食細胞、胸腺上皮細胞、およびＢ細胞からなる群より選択される。

【００２２】

いくつかの態様において、免疫原性ペプチドは、腫瘍特異的抗原に対する適応免疫応答を誘導する。いくつかの態様において、適応免疫応答は、樹状細胞の成熟、ＣＤ４＋ Ｔリンパ球の活性化、ＣＤ８＋ Ｔリンパ球の活性化、Ｂリンパ球の活性化および成熟、および／または腫瘍抗原特異的抗体の生産を、促進することを含む。いくつかの態様において、適応免疫応答は腫瘍細胞を殺傷し、腫瘍サイズを低減し、および／または転移を防ぐ。

【００２３】

いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列はＲＮＡである。いくつかの態様において、ＲＮＡは化学的に修飾されている。

【００２４】

いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）である。

【００２５】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原はｇｐ１００である。いくつかの態様において、ｇｐ１００は黒色腫由来である。いくつかの態様において、ｇｐ１００のコドンＴ２１０における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｔ２１０Ｉ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＩＩＤＱＶＰＦＳＶ（配列番号７８６）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＩはＴ２１０Ｉ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７２４および８７０～８８８からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００２６】

いくつかの態様において、ｇｐ１００のコドンＡ２８８における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ａ２８８Ｖ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＹＬＥＰＧＰＶＴＶ（配列番号８１８）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置７のＶはＡ２８８Ｖ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７２５および８８９からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００２７】

いくつかの態様において、ｇｐ１００のコドンＴ１５５における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｔ１５５Ｉ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＫＩＷＧＱＹＷＱＶ（配列番号７８７）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＩはＴ１５５Ｉ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７２６および８９０～８９２からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００２８】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、Ｔ細胞１によって認識される黒色腫抗原（ＭＡＲＴ－１）である。いくつかの態様において、ＭＡＲＴ－１抗原は黒色腫に由来する。いくつかの態様において、ＭＡＲＴ－１のコドンＡ２７における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ａ２７Ｖ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＥＶＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号８１９）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＶはＡ２７Ｖ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７２７および８９３～８９６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００２９】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、がん／精巣抗原１Ｂ（ＮＹ－ＥＳＯ－１）である。いくつかの態様において、ＮＹ－ＥＳＯ－１抗原は黒色腫または乳がん由来である。いくつかの態様において、ＮＹ－ＥＳＯ－１のコドンＣ１６５における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｃ１６５Ｙ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＳＬＬＭＷＩＴＱＹ（配列番号７８８）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置９のＣはＣ１６５Ｙ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７２８および８９７からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００３０】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、チロシナーゼ（ＴＹＲ）である。いくつかの態様において、ＴＹＲ抗原は黒色腫に由来する。いくつかの態様において、ＴＹＲのコドンＴ３７３における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｔ３７３Ｉ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＹＭＮＧＩＭＳＱＶ（配列番号７８９）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置５のＩはＴ３７３Ｉ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７２９および８９８～９０１からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００３１】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、チロシナーゼ関連タンパク質１（ＴｙＲＰ１）である。いくつかの態様において、ＴｙＲＰ１抗原は黒色腫に由来する。いくつか

の態様において、ＴｙＲＰ１のコドンＣ２４４における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｃ２４４Ｙ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＤＡＥＫＹＤＩＣＴＤＥＹ（配列番号７９０）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置５のＹはＣ２４４Ｙ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７３０および９０２からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００３２】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原はサバイビンである。いくつかの態様において、サバイビンは黒色腫、乳がん、または白血病に由来する。いくつかの態様において、サバイビンのコドンＴ９７における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｔ９７Ｉ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＥＬＩＬＧＥＦＬＫＬ（配列番号７９１）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置３のＩはＴ９７Ｉ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７３１および９０３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００３３】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、テロメラーゼ逆転写酵素（ｈＴＥＲＴ）である。いくつかの態様において、ｈＴＥＲＴは乳がん由来である。いくつかの態様において、ｈＴＥＲＴのコドンＭ５４９における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｍ５４９Ｉ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＩＬＡＫＦＬＨＷＬＩ（配列番号７９２）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置１０のＩはＭ５４９Ｉ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７３５および９１６～９２０からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００３４】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、ヒト上皮成長因子受容体２（ＨＥＲ２）である。いくつかの態様において、ＨＥＲ２は乳がん由来である。いくつかの態様において、ＨＥＲ２のコドンＶ６５８における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｖ６５８Ｍ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＡＭＶＧＩＬＬＶＶＶ（配列番号７９３）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＭはＶ６５８Ｍ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７３２および９０４～９０９からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００３５】

いくつかの態様において、ＨＥＲ２のコドンＴ９１２における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｔ９１２Ｉ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＩＩＷＥＬＭＴＦＧＡ（配列番号７９４）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＶはＴ９１２Ｉ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７３３および９１０～９１２からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００３６】

いくつかの態様において、ＨＥＲ２のコドンＡ９２０における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ａ９２０Ｖ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＩＴＷＥＬＭＴＦＧＶ（配列番号７９５）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置１０のＶはＡ９２０Ｖ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７３４および９１３～９１５からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００３７】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、ＣＤ３３である。いくつかの態様において、ＣＤ３３は白血病由来である。いくつかの態様において、ＣＤ３３のコドンＡ６５における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ａ６５Ｖ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＶＩＩＳＧＤＳＰＶ（配列番号７９６）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置１のＶはＡ６５Ｖ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７４０および９３０～９３２からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００３８】
いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、滑膜肉腫Ｘブレークポイント２（ＳＳＸ２）である。いくつかの態様において、ＳＳＸ２のコドンＡ４２における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ａ４２Ｖ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＫＶＳＥＫＩＦＹＶ（配列番号７９７）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＶはＡ４２Ｖ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７３７および９２１からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。
【００３９】
いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、ウィルムス腫瘍１（ＷＴ１）タンパク質である。いくつかの態様において、ＷＴ１は白血病由来である。いくつかの態様において、ＷＴ１のコドンＣ２３５における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｃ２３５Ｙ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＹＭＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号７９８）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置１のＹはＣ２３５Ｙ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７３８および９２２～９２５からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。
【００４０】
いくつかの態様において、ＷＴ１のコドンＭ２３６における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｍ２３６Ｉ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＣＩＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号７９９）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＩはＭ２３６Ｉ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７３９および９２６～９２９からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。
【００４１】
いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、上皮細胞接着分子前駆体（ＥｐＣＡＭ）である。いくつかの態様において、ＥｐＣＡＭのコドンＴ１９２における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｔ１９２Ｉ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＩＬＹＥＮＮＶＩＩ（配列番号８００）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置９のＩはＴ１９２Ｉ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７４１および９３３～９３４からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。
【００４２】
いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、癌胎児性抗原関連細胞接着分子（ＣＥＡ－ＣＡＭ）である。いくつかの態様において、ＣＥＡ－ＣＡＭは大腸がん、肺がん、または乳がんに由来する。いくつかの態様において、ＣＥＡ－ＣＡＭのコドンＴ３１４における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｔ３１４Ｉ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＬＬＴＦＷＮＰＰＩ（配列番号８０１）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置９のＩはＴ３１４Ｉ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７４２および９３５～９３６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。
【００４３】
いくつかの態様において、ＣＥＡ－ＣＡＭのコドンＴ３１１における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｔ３１１Ｉ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＲＩＴＶＴＴＩＴＶ（配列番号８０２）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＶはＴ３１１Ｉ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７４３および９３７～９４０からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。
【００４４】
いくつかの態様において、ＣＥＡ－ＣＡＭのコドンＴ６８８における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｔ６８８Ｖ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＡＶＶＧＩＭＩＧＶ（配列番号８０３）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＶはＴ６８８Ｖ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は

、配列番号７４４および９４１～９４７からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００４５】

いくつかの態様において、ＣＥＡ－ＣＡＭのコドンＶ６９５における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｖ６９５Ｍ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＩＭＩＧＭＬＶＧＶ（配列番号８０４）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置５のＭはＶ６９５Ｍ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７４５および９４８～９５３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００４６】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、黒色腫関連抗原Ａ３（ＭＡＧＥＡ３）である。いくつかの態様において、ＭＡＧＥＡ３のコドンＨ１１８における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｈ１１８Ｙ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＫＶＡＥＬＶＹＦＬ（配列番号８０５）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置７のＹはＨ１１８Ｙ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７４６および９５４からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００４７】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、黒色腫関連抗原（ＭＡＧＥ）共通抗原Ａ３、Ａ１、Ａ４、Ａ２、またはＡ１２である。いくつかの態様において、ＭＡＧＥ共通抗原Ａ３、Ａ１、Ａ４、Ａ２、またはＡ１２のコドンＣ１８１における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｃ１８１Ｙ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＹＬＧＬＳＹＤＧＬＬ（配列番号８０６）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置１のＹはＣ１８１Ｙ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７４７～７５０および９５５～９８３からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００４８】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、ＭＵＣ－１である。いくつかの態様において、ＭＵＣ－１のコドンＴ９３における標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｔ９３Ｉ変異をもたらす。いくつかの態様において、アミノ酸配列ＡＩＷＧＱＤＶＴＳＶ（配列番号８０７）を含むヘテロクリティックエピトープが生成され、位置２のＩはＴ９３Ｉ変異に対応する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７５１および９８４～９８５からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００４９】

いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、プレメラノソームタンパク質（ＰＭＥＬ）遺伝子のイントロン４に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、アミノ酸配列ＶＹＦＦＬＰＤＨＬ（配列番号８０８）を含むクリプティックペプチドをもたらす。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７５２～７５３および９８６～９９８からなる群より選択されるヌクレオチドを含む。

【００５０】

いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、ＴＹＲＰ１遺伝子のオープンリーディングフレーム１（ＯＲＦ１）の相補鎖上に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、ＴＹＲＰ１遺伝子のＯＲＦ１の第１の開始コドン（ＡＴＧ）の相補株に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、アミノ酸配列ＭＳＬＱＲＱＦＬＲ（配列番号８０９）を含むクリプティックペプチドをもたらす。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７５４および９９９～１００５からなる群より選択されるヌクレオチドを含む。

【００５１】

いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、マンノシル（アルファ－１，６－）－糖タンパク質ベーター１，６－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（ＭＧＡＴ５）遺伝子のイントロン２の最後の塩基の相補鎖上に位置する。いくつかの態様において、標

的Ｃ塩基の脱アミノ化は、アミノ酸配列ＶＬＰＤＶＦＩＲＣＶ（配列番号８１０）を含むクリプティックペプチドをもたらす。いくつかの態様において、クリプティックペプチドは、ＭＧＡＴ５遺伝子のエクソン３から翻訳される。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７５５および１００６～１００８からなる群より選択されるヌクレオチドを含む。

【００５２】

いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、がん／精巣抗原２（ＬＡＧＥ－１）遺伝子のオープンリーディングフレーム１（ＯＲＦ１）に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、ＬＡＧＥ－１遺伝子のＯＲＦ１の第１の開始コドンの相補鎖に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、ＭＬＭＡＱＥＡＬＡＦＬ（配列番号８１１）、ＬＡＡＱＥＲＲＶＰＲ（配列番号８１２）、ＡＰＲＧＶＲＭＡＶ（配列番号８１３）、ＱＧＡＭＬＡＡＱＥＲＲＶＰＲＡＡＥＶＰＲ（配列番号８１４）、およびＣＬＳＲＲＰＷＫＲＳＷＳＡＧＳＣＰＧＭＰＨＬ（配列番号８１５）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むクリプティックペプチドをもたらす。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７５６および１００９～１０１４からなる群より選択されるヌクレオチドを含む。

【００５３】

いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、チロシナーゼ関連タンパク質２（ＴＲＰ－２）遺伝子のイントロン２に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、ＴＲＰ－２遺伝子のイントロン２の第１塩基の相補鎖上に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、アミノ酸配列ＥＶＩＳＣＫＬＩＫＲ（配列番号８１６）を含むクリプティックペプチドをもたらす。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７５７～７５８および１０１５～１０２３からなる群より選択されるヌクレオチドを含む。

【００５４】

いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、バキュロウイルスＩＡＰリピート含有５（ＢＩＲＣ５）遺伝子のイントロン２に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、ＢＩＲＣ５遺伝子のイントロン２のスプライソソーム分岐部位に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、ＢＩＲＣ５遺伝子のイントロン２の最後の塩基の相補鎖に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、アミノ酸配列ＡＹＡＣＮＴＳＴＬ（配列番号８１７）を含むクリプティックペプチドをもたらす。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７５９および１０２４～１０２９からなる群より選択されるヌクレオチドを含む。

【００５５】

いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、ＢＣＲ／ＡＢＬ融合タンパク質（ＢＣＲ／ＡＢＬ－ＯＯＦ）遺伝子のイントロン１アクセプター部位に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基は、ＢＣＲ／ＡＢＬ融合タンパク質（ＢＣＲ／ＡＢＬ－ＯＯＦ）遺伝子のイントロン２アクセプター部位に位置する。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、ＳＳＫＡＬＱＲＰＶ（配列番号６０３）、ＧＦＫＱＳＳＫＡＬ（配列番号６０４）、およびＡＴＧＦＫＱＳＳＫＡＬＱＲＰＶＡＳ（配列番号６０５）のいずれか１つのアミノ酸配列を含むクリプティックペプチドをもたらす。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７６１および１０３２～１０４５からなる群より選択されるヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、配列番号７６２および１０４６～１０５６からなる群より選択されるヌクレオチドを含む。

【００５６】

いくつかの態様において、方法はさらに、免疫チェックポイント阻害剤の治療有効量を対象に投与することを含む。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＢＴＬＡ、ＧＡＬ９、Ｃｈｋ１、またはＡ２ａＲの、同族結合パートナーへの結合を阻害する。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、抗体またはそのフラグ

メントである。いくつかの態様において、抗体は、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＴＩＭ３抗体、抗ＬＡＧ３抗体、抗Ｂ７－Ｈ３抗体、抗Ｂ７－Ｈ４抗体、抗ＢＴＬＡ抗体、抗ＧＡＬ９抗体、抗Ｃｈｋ１抗体、および抗Ａ２ａＲ抗体から選択される。いくつかの態様において、抗体は、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、およびイピリムマブから選択される。

【００５７】

いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、小分子である。

【００５８】

いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、組換えタンパク質である。

【００５９】

いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、核酸アプタマーである。

【００６０】

いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害は、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＢＴＬＡ、ＧＡＬ９、Ｃｈｋ１、またはＡ２ａＲからなる群より選択される遺伝子のゲノム編集によって実行される。

【００６１】

本開示の他の側面は、がんを処置する方法を提供し、該方法は、それを必要とする対象に、（ｉ）（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメインを含む融合タンパク質；および（ｉｉ）ガイドヌクレオチド配列、を含む組成物の治療有効量を投与することを含み；ここで（ｉ）の融合タンパク質および（ｉｉ）のガイドヌクレオチド配列は腫瘍細胞に入り、およびここでガイドヌクレオチド配列は、（ｉ）の融合タンパク質を腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化し、ここで融合タンパク質は、ポリヌクレオチドの標的シトシン（Ｃ）残基を（Ｔ）残基に変更する。

【００６２】

いくつかの態様において、方法は、免疫チェックポイント阻害剤の治療有効量を対象に投与することを含む。

【００６３】

本明細書においてさらに提供されるのは、腫瘍特異的免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であり、該方法は、対象に、（ｉ）（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）ヌクレアーゼドメインを含む融合タンパク質；および（ｉｉ）ガイドヌクレオチド配列、を含む組成物の治療有効量を投与することを含み、ここで（ｉ）の融合タンパク質および（ｉｉ）のガイドヌクレオチド配列は腫瘍細胞に入り、およびここでガイドヌクレオチド配列は、（ｉ）の融合タンパク質を腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化し、ここで融合タンパク質は、ポリヌクレオチドにインデルを導入する。いくつかの態様において、ヌクレアーゼはＦｏｋＩヌクレアーゼである。

【００６４】

本明細書においてさらに提供されるのは、腫瘍特異的免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であり、該方法は、対象に、（ｉ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なヌクレアーゼ；および（ｉｉ）ガイドヌクレオチド配列；を含む組成物の治療有効量を投与することを含み、ここで（ｉ）の融合タンパク質および（ｉｉ）のガイドヌクレオチド配列は腫瘍細胞に入り、およびここでガイドヌクレオチド配列は、（ｉ）の融合タンパク質を腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化し、ここでガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なヌクレアーゼは、ポリヌクレオチドにインデルを導入する。

【００６５】

いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なヌクレアーゼは、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、アルゴノート、またはそのバリアントを含む。いくつかの態様において、インデルは、変異またはフレームシフトを引き起こす。

【００６６】
腫瘍特異的免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法もまた提供され、該方法は、それを必要とする対象に、（ａ）プログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）デアミナーゼドメインを含む融合タンパク質を含む組成物の治療有効量を投与することを含み、ここで、融合タンパク質は腫瘍細胞に入り、ポリヌクレオチドの標的塩基を脱アミノ化を介して変更する。
【００６７】
いくつかの態様において、デアミナーゼドメインはシトシンデアミナーゼを含み、標的塩基はシトシン（Ｃ）塩基である。いくつかの態様において、プログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を含む。いくつかの態様において、プログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインは、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）を含む。
【００６８】
いくつかの態様において、プログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインは、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインである。いくつかの態様において、プログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインは、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Ｃｐｆ１ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型アルゴノートドメイン、およびそれらのバリアントからなる群より選択される。いくつかの態様において、プログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインは、ガイドヌクレオチド配列に会合している。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｃからチミン（Ｔ）への変更をもたらす。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、翻訳されたコドンにおいてＣ－Ｇ塩基対からチミン－アデニン（Ｔ－Ａ）への変更をもたらし、免疫原性またはヘテロクリティックペプチドにおける、異なるアミノ酸の取り込みをもたらす。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、遺伝子の非コードイントロン領域における、Ｃ－Ｇ塩基対からチミン－アデニン（Ｔ－Ａ）への変更をもたらし、免疫原性またはクリプティックペプチド配列の選択的スプライシングおよび翻訳をもたらす。いくつかの態様において、標的Ｃ塩基の脱アミノ化は、遺伝子のオープンリーディングフレームの開始（Ｍｅｔ）コドンにおける、Ｃ－Ｇ塩基対からチミン－アデニン（Ｔ－Ａ）への変更をもたらし、免疫原性またはクリプティックペプチド配列を含む代替オープンリーディングフレームの翻訳をもたらす。
【００６９】
本開示の他の側面は、以下を含む組成物を提供する：（ｉ）（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメインを含む融合タンパク質；および、（ｉｉ）（ｉ）の融合タンパク質を、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化する、ガイドヌクレオチド配列。
【００７０】
本開示のさらに他の側面は、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびガイドヌクレオチド配列を含む組成物を提供し、ここで融合タンパク質は、（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメインを含み、およびここでガイドヌクレオチド配列は、融合タンパク質を腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化する。
【００７１】
本開示のさらに他の側面は、以下を含むがんワクチンを提供する：（ｉ）（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメインを含む融合タンパク質；および、（ｉｉ）（ｉ）の融合タンパク質を、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化する、ガイドヌクレオチド配列。
【００７２】
本明細書でさらに提供されるのは、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、お

よびガイドヌクレオチド配列を含むがんワクチンであり、ここで融合タンパク質は、（ａ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｂ）シトシンデアミナーゼドメインを含み、ここでガイドヌクレオチド配列は、融合タンパク質を腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化する。

【００７３】

本明細書に記載のがんワクチンを含むキットもまた、提供される。

【００７４】

本開示の特定の態様の詳細は、以下に説明するように、特定の態様の詳細な説明に記載されている。本開示の他の特徴、目的、および利点は、定義、実施例、図、および特許請求の範囲から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【００７５】

本明細書の一部を構成する添付図面は、本開示のいくつかの態様を例示し、説明と共に本開示の原理を説明するのに役立つ。

【００７６】

【図１】図１は、ゲノム塩基編集を使用してヘテロクリティックエピトープおよびクリプティックエピトープを操作する戦略を示す。

【００７７】

【図２Ａ】図２Ａは、保存アンカー残基を編集して主要なＨＬＡアレルスーパータイプの結合選好に一致させることにより、免疫原性ヘテロクリティックエピトープを導入する戦略を示す。この例は、弱免疫原性ペプチドエピトープのアンカー位置９のアラニン残基を、ＨＬＡ－Ａ２の結合に好ましいバリン残基に変える、塩基編集反応を示す。

【００７８】

【図２Ｂ】図２Ｂは、主要なＨＬＡアレルスーパータイプ（ＭＨＣ－Ｉ経路）の、アンカー残基結合選好および集団での適用範囲を示す。図２Ｂのペプチドは次のとおりである：ＨＬＡ Ａ１、Ａ２、Ａ３、およびＡ２４（配列番号８７８～８８１）およびＨＬＡ Ｂ７、Ｂ２７、Ｂ４４、Ｂ５８、およびＢ６２（配列番号８８２～８８６）。

【００７９】

【図３】図３は、ガイドＲＮＡによってプログラミングされたゲノム塩基編集反応により導入されたヘテロクリティック／クリプティックエピトープによる抗がんワクチン接種についての、提案されたメカニズムを示す。編集された腫瘍細胞は、がん特異的遺伝子にヘテロクリティックおよびクリプティックエピトープを産生し、これらは未成熟樹状細胞（ＤＣ）を走化的に誘引し（１ａ）、ＤＣ成熟を誘導する（１ｂ）。編集された腫瘍細胞は、ＤＣに取り込まれるアポトーシス体（２ａ）を産生し（２ｂ）、ＤＣ（１ｂ）およびＢ細胞（２ｂ’）の成熟に寄与する。成熟ＤＣは、ＣＤ４＋ Ｔリンパ球（１ｃ）およびＣＤ８＋ Ｔリンパ球（１ｃ’）を活性化する。活性化されたＣＤ４＋ Ｔリンパ球はさらにＢリンパ球の活性化を刺激し（１ｄ）、ＣＤ８＋ Ｔリンパ球にＩＬ－２を提供する（１ｄ’）。Ｂリンパ球は、細胞表面タンパク質に対するＴＡＡ特異的抗体を産生し、抗体依存性細胞媒介性の細胞傷害作用または補体媒介性の腫瘍細胞死をもたらす（１ｅ）。活性化されたＣＤ８＋ Ｔリンパ球は次に、ＴＡＡエピトープに関連するＭＨＣクラスＩ分子の認識を介して、腫瘍細胞を殺傷する（１ｅ’）。

【００８０】

【図４】図４は、高頻度の変異誘発を示すがん系統の比較を示し、これは、非同義（non-synonymous）ヒッチハイカー変異および「ネオエピトープ」を含む可能性がある。

【００８１】

定義

本明細書においておよび請求の範囲において用いられる場合、文脈が明らかに別を示さない限り、単数形「a」、「an」、および「the」は、単数および複数の参照を含む。したがって、例えば「剤（an agent）」についての参照は、単一の剤および複数のかかる剤を含む。

【００８２】
「免疫原性ペプチド」または「抗原性ペプチド」は、免疫系によって認識され、免疫応答を誘導することができるペプチドまたはエピトープである。免疫原性ペプチドまたは抗原性ペプチドは、ペプチドがＭＨＣ分子に結合してＴ細胞応答を誘導するか、またはＢ細胞上のＢ細胞受容体によって認識されて抗体産生を誘導するように、モチーフを含んでもよい。これらの用語は、本書では交換可能に使用される。
【００８３】
「免疫原性エピトープ」または「抗原性エピトープ」とは、免疫系、例えば抗体、Ｂ細胞、またはＴ細胞によって認識される抗原の一部を指す。いくつかの態様において、エピトープは、抗体が結合する抗原の特定のフラグメントである。エピトープは通常非自己タンパク質であるが、いくつかの場合においては、宿主由来の配列を認識することができる。
【００８４】
「免疫応答」とは、細菌、ウイルス、および身体に異物であり有害であると思われる物質に対して、身体がそれ自体を認識し、防御する方法である。一般的な形態では、免疫応答は、抗原フラグメント（すなわち、細胞表面での提示のためにＭＨＣ　Ｉおよび／またはＭＨＣ　ＩＩに結合する抗原由来の特定のアミノ酸配列）に会合する主要組織適合性（ＭＨＣ）クラスＩまたはクラスＩＩ分子を発現する抗原提示細胞（ＡＰＣ）との相互作用を通した、ヘルパー（ＴＨ、ＣＤ４＋）および細胞傷害性（ＣＤ８＋）Ｔ細胞サブセットの感作から開始する。感作またはプライミングされたＣＤ４＋　Ｔ細胞は、Ｂ細胞および様々なＴ細胞サブセットの活性化に関与するリンホカインを産生する。感作されたＣＤ８＋　Ｔ細胞はリンホカインに応答して数が増加し、一致するＭＨＣがコードされるクラスＩ分子に会合した特定の抗原性フラグメントを発現する任意の細胞を、破壊することができる。したがって、がん性腫瘍の過程で、ＣＴＬはがん関連抗原またはがん特異的抗原を発現している細胞を根絶し、それによって腫瘍の広がりと疾患の発達の進行を制限する。
【００８５】
獲得免疫系としても知られる「適応免疫系」は、病原体の成長を排除または防止する、高度に特殊化された全身の細胞およびプロセスで構成される免疫系全体のサブシステムである。適応免疫系は、脊椎動物に見られる２つの主要な免疫戦略の１つである（もう１つは自然免疫系である）。適応免疫は、特定の病原体に対する初期応答後に免疫記憶を作成し、その病原体とのその後の遭遇に対する応答を強化する。獲得免疫のこのプロセスは、予防接種の基礎である。自然系と同様に、適応系には体液性免疫成分と細胞媒介性免疫成分の両方が含まれる。
【００８６】
自然免疫系とは異なり、適応免疫系は、特定の病原体または抗原に高度に特異的である。適応免疫はまた、長期にわたる保護も提供することができる。適応系応答は、侵入病原体とそれらが生産する任意の毒性分子を破壊する。本開示によれば、適応免疫系応答は、腫瘍またはがん細胞を破壊する。適応系では、有害な異物分子を無害な異物分子から区別できない場合がある。適応免疫応答を実行する細胞は、リンパ球として知られる白血球である。抗体反応と細胞性免疫反応という２つの主要な広範なクラスも、２つの異なるリンパ球（Ｂ細胞とＴ細胞）が保有する。抗体反応では、Ｂ細胞が活性化されて抗体を分泌し、抗体は免疫グロブリンとしても知られるタンパク質である。抗体は血流を介して移動し、外来抗原に結合してこれを不活性化し、抗原が宿主に結合できなくする。
【００８７】
適応免疫において、病原体特異的受容体は、生物の寿命の間に「獲得」される（一方自然免疫では、病原体特異的受容体は生殖系列にすでにコードされている）。獲得した反応は、将来の課題に備えて体の免疫系を準備するため、「適応的」と呼ばれる（ただし実際には、自己免疫が生じると不適応になることもあり得る）。
【００８８】
免疫系は、体細胞超変異（加速された体細胞変異のプロセス）、およびＶ（Ｄ）Ｊ組換

え（抗原受容体遺伝子セグメントの不可逆的な遺伝子組換え）のために、高度に適応可能である。このメカニズムにより、少数の遺伝子が膨大な数の異なる抗原受容体を生成し、次にこれらは、個々のリンパ球上で一意に発現される。遺伝子の再配列は、各細胞のＤＮＡに不可逆的な変化をもたらすため、その細胞のすべての後代（子孫）は、同じ受容体特異性をコードする遺伝子を継承し、これには、長寿命の特定の免疫の鍵であるメモリーＢ細胞およびメモリーＴ細胞が含まれる。

【００８９】

「Ｔ細胞」または「Ｔリンパ球」は、細胞性免疫において中心的な役割を果たすリンパ球の一種（白血球のサブタイプ）である。Ｔ細胞は、細胞表面にＴ細胞受容体が存在することにより、Ｂ細胞やナチュラルキラー細胞などの他のリンパ球と区別することができる。それらは胸腺において胸腺細胞から成熟するため、Ｔ細胞と呼ばれる。Ｔ細胞のいくつかのサブセットは、それぞれ異なる機能を有する。ヒトＴ細胞の大部分は、細胞受容体上でそのアルファおよびベータ鎖を再配列し、アルファベータＴ細胞（αβＴ細胞）と呼ばれ、適応免疫系の一部である。特殊なガンマデルタＴ細胞（人体における少数派のＴ細胞、反すう動物でより頻度が高い）は、多様性が制限された不変のＴ細胞受容体を有し、他のＴ細胞に効果的に抗原を提示でき、自然免疫系の一部であると考えられる。エフェクターＴ細胞には、共刺激などの刺激に積極的に反応するさまざまなＴ細胞型が広く含まれる。これには、ヘルパー、キラー、調節、および潜在的に他の、Ｔ細胞型が含まれる。当業者は、異なる種類のＴ細胞および、適応免疫応答におけるそれぞれの役割に精通している。

【００９０】

「ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）システム」は、ヒトの主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）タンパク質をコードする遺伝子複合体である。これらの細胞表面タンパク質は、ヒトの免疫系の調節に関与している。ＨＬＡ遺伝子複合体は、染色体６ｐ２１内の３Ｍｂｐのストレッチに存在する。ＨＬＡ遺伝子は多型性が高く、これは、それらが多くの異なるアレルを有し、それによって適応免疫系を微調整できることを意味する。特定の遺伝子によってコードされるタンパク質は、臓器移植における因子としての歴史的な発見の結果として、抗原としても知られている。異なるクラスは、異なる機能を有する。

【００９１】

主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩ ＭＨＣクラスＩ（Ａ、Ｂ、およびＣ）分子をコードするＨＬＡは、細胞内からペプチドを提示する。「主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩ」または「ＭＨＣクラスＩ」分子は、体内のすべての有核細胞の細胞表面に見出される。それらの機能は、抗原のペプチドフラグメントを細胞内から細胞傷害性Ｔ細胞に提示することである；これにより、ＭＨＣクラスＩタンパク質の助けを借りて提示される特定の非自己抗原に対する免疫系からの即時応答がトリガーされる。ＭＨＣクラスＩ分子は細胞質ゾルタンパク質由来のペプチドを提示するため、ＭＨＣクラスＩ提示の経路はしばしば、細胞質ゾル経路または内在性経路と呼ばれる。

【００９２】

クラスＩ ＭＨＣ分子は、プロテアソームによる細胞質ゾルタンパク質の分解から主に生成されたペプチドに結合する。次にＭＨＣ Ｉペプチド複合体を、小胞体を介して細胞の外部原形質膜に挿入する。エピトープペプチドは、クラスＩ ＭＨＣ分子の細胞外部分に結合している。したがって、クラスＩ ＭＨＣの機能は、細胞内タンパク質を細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）に提示することである。ただし、クラスＩ ＭＨＣは、交差提示として知られるプロセスにおいて、外因性タンパク質から生成されたペプチドを提示することもできる。

【００９３】

正常細胞は、そのクラスＩ ＭＨＣでの正常細胞タンパク質ターンオーバーからのペプチドを提示し、ＣＴＬは、中枢性および末梢性寛容機構のために、それらに応答して活性化されることはない。例えばウイルス感染の後などに、細胞が外来タンパク質を発現すると、クラスＩ ＭＨＣの一部がこれらのペプチドを細胞表面に提示する。その結果、ＭＨ

Ｃ：ペプチド複合体に特異的なＣＴＬは、提示細胞を認識して殺傷する。代替的に、クラスＩ ＭＨＣ自体が、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ）の阻害リガンドとして機能する。免疫回避中または特定の腫瘍において一部のウイルスによって使用されるメカニズムである表面クラスＩ ＭＨＣの正常レベルの低下により、ＮＫ細胞の殺傷が活性化される。ＭＨＣクラスＩＩ分子によって提示される抗原または抗原エピトープは、細胞傷害性Ｔ細胞によって認識される。

【００９４】

ＭＨＣクラスＩＩ（ＤＰ、ＤＭ、ＤＯＡ、ＤＯＢ、ＤＱ、およびＤＲ）分子をコードするＨＬＡは、抗原を、細胞の外側からＴリンパ球に提示する。「主要組織適合性複合体クラスＩＩ」または「ＭＨＣクラスＩＩ」分子は、樹状細胞、単核食細胞、一部の内皮細胞、胸腺上皮細胞、およびＢ細胞などの抗原提示細胞にのみ通常見られる分子ファミリーである。クラスＩＩペプチドによって提示される抗原は、通常、細胞外タンパク質に由来する（クラスＩのような細胞質ゾルではない）；したがって、抗原提示のＭＨＣクラスＩＩ依存経路は、エンドサイトーシスまたは外因性経路と呼ばれる。ＭＨＣクラスＩＩ分子の負荷は、ファゴサイトーシスによって発生する。細胞外タンパク質はエンドサイトーシスされ、リソソームで消化され、得られたエピトープペプチドフラグメントは、細胞表面への移動前にＭＨＣクラスＩＩ分子に負荷される。ＭＨＣクラスＩＩ分子によって提示される抗原または抗原エピトープは、Ｔヘルパー細胞によって認識され、Ｔヘルパー細胞の増殖を刺激し、次にＴヘルパー細胞は、抗体産生Ｂ細胞を刺激して、この特定の抗原に対する抗体を産生する。自己抗原は、制御性Ｔ細胞によって抑制される。

【００９５】

「抗原提示細胞（ＡＰＣ）」とは、その表面に主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）と複合体化した抗原を提示する細胞である；このプロセスは抗原提示として知られている。Ｔ細胞は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を用いてこれらの複合体を認識し得る。これらの細胞は抗原をプロセシングし、Ｔ細胞に提示する。抗原提示細胞は、プロフェッショナルとノンプロフェッショナルの２つのカテゴリに分類される。ＭＨＣクラスＩＩ分子を共刺激分子およびパターン認識受容体とともに発現するものは、しばしばプロフェッショナル抗原提示細胞と呼ばれる。ノンプロフェッショナルＡＰＣは、ＭＨＣクラスＩ分子を発現する。

【００９６】

プロフェッショナルＡＰＣは、抗原をＴ細胞に提示することに特化する。これは、ファゴサイトーシス（マクロファージおよび樹状細胞）または受容体を介したエンドサイトーシス（Ｂ細胞）のいずれかによって抗原を内在化するのに非常に効率的であり、抗原をペプチドフラグメントにプロセシングした後、クラスＩＩ ＭＨＣ分子に結合したこれらのペプチドを、その膜に表示する［１］。Ｔ細胞は、抗原提示細胞の膜上の抗原－クラスＩＩ ＭＨＣ分子複合体を認識して相互作用する。次に追加の共刺激シグナルが抗原提示細胞によって生産され、Ｔ細胞の活性化につながる。共刺激分子とＭＨＣクラスＩＩの発現は、プロフェッショナルＡＰＣの特徴を定義する。

【００９７】

ほぼすべての細胞型は、ノンプロフェッショナルＡＰＣとして機能することができる。それらはさまざまな種類の組織に見出される。樹状細胞、単核食細胞、胸腺上皮細胞、およびＢ細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞は、外来抗原をヘルパーＴ細胞に提示するが、他の細胞型は、細胞内で生じる抗原を、細胞傷害性Ｔ細胞に提示することができる。ＭＨＣファミリーのタンパク質に加えて、抗原提示は、ＡＰＣおよびＴ細胞両方の表面にある他の特殊なシグナル伝達分子に依存する。

【００９８】

「Ｂリンパ球」または「Ｂ細胞」は、リンパ球サブタイプの白血球の一種である。Ｂ細胞は、抗体を分泌することにより、適応免疫系の体液性免疫成分において機能する。さらに、Ｂ細胞は抗原を提示し（プロフェッショナル抗原提示細胞（ＡＰＣ）としても分類される）、サイトカインを分泌する。哺乳動物において、Ｂ細胞は、ほとんどの骨の中心にある骨髄で成熟する。Ｂ細胞は、細胞膜上にＢ細胞受容体（ＢＣＲ）を発現する。ＢＣＲ

は、Ｂ細胞が特定の抗原に結合することを可能にし、それに対して抗体応答を開始する。

【００９９】

「がん免疫療法」とは、がんと戦うために身体の自然な防御を高めるよう設計されたがんの処置の種類を指す。これは、体内または研究室で作られた物質を使用して、免疫系機能を改善または回復する。

【０１００】

「腫瘍特異的抗原（ＴＳＡ）」または「腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）」は、同じ起源の非がん性細胞と比較して、それぞれの腫瘍の細胞で特異的に発現されるか、または上方制御されるタンパク質を指す。腫瘍特異的抗原、またはそれに由来するエピトープは、免疫系によって認識されて、免疫応答を誘導することができる。本明細書において、用語「腫瘍関連抗原」および「腫瘍特異的抗原」は互換的に使用される。腫瘍特異的抗原は、すべてのタンパク質クラス、例えば、酵素、受容体、転写因子などからのものであり得る。

【０１０１】

「ヘテロクリティックエピトープ」または「ヘテロクリティックアナログ」とは、強力な免疫反応を誘導するように操作された、内在性ペプチド配列（すなわち、アナログ）の変更バージョンを指す。ヘテロクリティックエピトープは、所与の用量に対する応答の増加、または同じ応答を達成するためのより少ない量の要件によって測定された場合に、特定のＴ細胞に対する増強された刺激能力または効力を有し、したがってこれらのエピトープは、天然のエピトープによって誘導されるものよりも強いＴ細胞応答を誘導するため、ワクチン成分としての利点を提供する。

【０１０２】

「自己抗原」とは、体内から生じる抗原を指す。免疫系は通常、正常な恒常性条件下では自己抗原に反応しない。自己抗原からのエピトープ（すなわち、自己エピトープ）は、その主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）との会合により、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面に高濃度で存在し、優性エピトープとして知られている。これらは、潜在的に自己破壊的な自己反応性Ｔ細胞を除去するための、負の選択メカニズムの刺激剤である。それらの「自己」抗原は発達中のＴ細胞に提示され、その「自己反応性」Ｔ細胞に対して、プログラムされた細胞死（アポトーシス）により死滅するように信号を送り、それによってＴ細胞レパートリーから削除され、自己免疫を防ぐ。

【０１０３】

「クリプティックエピトープ」とは、抗原プロセシング／提示を必ずしも受ける必要がなく、かつ免疫認識から「隠される」自己抗原に由来するエピトープを指す。クリプティックエピトープは通常、非常に低い濃度でＡＰＣに現れ、自己反応性Ｔ細胞を削除しない。クリプティックエピトープは、異常に高い濃度で産生されるか、または天然抗原の構成から解放されない限り、Ｔ細胞による認識のために提示されない。腫瘍特異的抗原に由来するクリプティックエピトープを使用して、腫瘍に対するＴ細胞の寛容を破り、腫瘍に対する強力な免疫応答を誘導することができる。かかる原理は、Pardoll, et al., PNAS, Vol. 96, pp. 5340-5342 (1999)に記載されており、その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【０１０４】

「ネオエピトープ」とは、腫瘍細胞で生じるランダムな体細胞変異を介して生成される、抗原性エピトープを指す。ネオエピトープは通常、個々に特異的な腫瘍抗原または固有の抗原に由来し、したがって、それが由来する腫瘍細胞の系統に特異的である。ネオエピトープは、当技術分野では腫瘍の免疫原性の原因であると見なされており（（Srivastava et al., 1993, Duan et al., 2009; van der Bruggen et al., 2013）、数学モデリングにより、個々のヒト腫瘍における数十から数百のネオエピトープの存在が予測されている（Srivastava 2009）。ハイスループットＤＮＡ配列決定とそれに伴うバイオインフォマティクスアプローチの最近の革命により、個々のがんにおける個々に特異的なネオエピトープを実際に同定することが可能となっている。

【０１０５】

本明細書で使用される「がんワクチン」は、腫瘍または腫瘍特異的抗原に対する腫瘍特異的免疫応答を誘導する組成物を指す。かかる免疫応答は、腫瘍成長の阻害および／または腫瘍の再発防止に効果的である。

【０１０６】

「イントロン」とは、最終的なＲＮＡ生成物の成熟化の間にＲＮＡスプライシングにより取り除かれる、遺伝子中の任意のヌクレオチド配列を指す。用語、イントロンとは、遺伝子中のＤＮＡ配列、およびＲＮＡ転写物中の対応する配列の両方を指す。ＲＮＡスプライシングの後で最終的な成熟ＲＮＡ中で一緒に連結される配列は、エクソンである。イントロンは、ほとんどの生物および多くのウイルスの遺伝子中で見出され、タンパク質を生成するもの、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、およびトランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）を含む広範な遺伝子において位置を特定することができる。イントロンを含む遺伝子からタンパク質が生成される場合、転写の後かつ翻訳の前のＲＮＡのプロセシング経路の一部として、ＲＮＡスプライシングが起こる。

【０１０７】

「エクソン」とは、ＲＮＡスプライシングによりイントロンが取り除かれた後にその遺伝子により産生される最終的な成熟ＲＮＡの一部となるであろう、遺伝子の任意の部分を指す。用語、エクソンとは、遺伝子中のＤＮＡ配列、およびＲＮＡ転写物中の対応する配列の両方を指す。ＲＮＡスプライシングにおいて、イントロンは取り除かれ、エクソンは、成熟メッセンジャーＲＮＡを生成することの一部として、共有結合により互いに連結される。

【０１０８】

「ＲＮＡスプライシング」とは、新たに合成されたメッセンジャーＲＮＡ転写物（また一次ｍＲＮＡ転写物としても言及される）のプロセシングを指す。スプライシングの後で、イントロンは取り除かれて、エクソンは、デコードされてタンパク質に翻訳される完全なオープンリーディングフレームを含む成熟ｍＲＮＡ分子を形成するために、一緒に連結される（ライゲーションされる）。核でコードされる遺伝子について、スプライシングは、核内において、転写と同時に、または転写の直後に起こる。ＲＮＡスプライシングの分子機構は、例えば、Pagani et al., Nature Reviews Genetics 5, 389-396, 2004；Clancy et al., Nature Education 1（1）：31, 2011；Cheng et al., Molecular Genetics and Genomics 286（5-6）：395-410, 2014；Taggart et al., Nature Structural & Molecular Biology 19（7）：719-2, 2012において広範に記載されており、これらの各々の内容は、本明細書において参考として援用される。当業者は、ＲＮＡスプライシングの機構に精通している。

【０１０９】

「選択的スプライシング」とは、複数のタンパク質をコードする単一の遺伝子をもたらす遺伝子発現の間の制御されたプロセスを指す。このプロセスにおいて、遺伝子の特定のエクソンを、その遺伝子から産生される最終的なプロセシングされたメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）中に含めるかまたはこれから除外することができる。その結果、選択的にスプライシングされたｍＲＮＡから翻訳されるタンパク質は、それらのアミノ酸配列において、およびしばしばそれらの生物学的機能において差異を含む。注目すべきことに、選択的スプライシングは、ヒトゲノムが、その２０，０００個のタンパク質をコードする遺伝子から予測されるよりも多くのタンパク質の合成を指揮することを可能にする。選択的スプライシングは、ときにまた、ディファレンシャルスプライシングとも称される。選択的スプライシングは、真核生物における正常な現象として起こり、ここでそれは、ゲノムによりコードされ得るタンパク質の生物多様性を著しく増大する；ヒトにおいては、多重エクソン遺伝子のうちの約９５％は、選択的にスプライシングされる。選択的スプライシングの多数の様式が観察され、そのうち最も一般的なものは、エクソンスキッピングである。この様式において、特定のエクソンを、いくつかの条件下において、または特定の組織において、ｍＲＮＡ中に含めることができ、他のものにおいては除外することができる。スプライシングにおける異常なバリエーションもまた、疾患に関連付けられる；ヒトの

遺伝子障害の大部分が、スプライシングバリアントから生じる。異常なスプライシングバリアントはまた、がんの発症の原因となると考えられ、スプライシング因子の遺伝子は、異なる型のがんにおいて、しばしば変異する。選択的スプライシングの制御はまた、当該分野において、例えば、Douglas et al., Annual Review of Biochemistry 72（1）：291-336, 2003；Pan et al., Nature Genetics 40（12）：1413-1415, 2008；Martin et al., Nature Reviews 6（5）：386-398, 2005；Skotheim et al., The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39（7-8）：1432-49, 2007において記載され、これらの各々の全内容は、本明細書に参照により組み込まれる。

【０１１０】

「コードフレーム（coding frame）」または「オープンリーディングフレーム」とは、ポリペプチドをコードするコドンの区間を指す。ＤＮＡは、３つのヌクレオチドのグループ（コドン）において解釈されるので、ＤＮＡ鎖は、３つの異なる読み枠を有する。ＤＮＡ分子の二重らせんは、２本の逆平行鎖を有し、したがって、各々が３つの読み枠を有する２本の鎖により、６つの可能な読み枠の翻訳が存在する。機能的なタンパク質は、翻訳が正しいコードフレームにおいて進行した場合に産生され得る。オープンリーディングフレームにおける１つまたは２つの塩基の挿入または欠失は、コードフレームのシフトを引き起こし、これはまた、「フレームシフト変異」としても言及される。フレームシフト変異は、典型的には、未成熟な翻訳終了および／または短縮化された、または非機能的なタンパク質をもたらす。

【０１１１】

用語「プロテオーム」とは、一定の時間において、ゲノム、細胞、組織、または生物によって発現されるタンパク質のセット全体を指す。より具体的には、所与の種類の細胞または生物において、所与の時間に一定の条件下で発現されるタンパク質のセットである。この用語は、タンパク質とゲノムのブレンドである。「プロテオーム全体」とは、バイアスなしのプロテオーム内のすべてのそれぞれのタンパク質を指す。

【０１１２】

用語「ゲノム」とは、細胞または生物の遺伝子材料を指す。これは典型的には、ＤＮＡ（またはＲＮＡウイルスの場合はＲＮＡ）を含む。ゲノムは、遺伝子、コード領域、非コードＤＮＡ、およびミトコンドリアと葉緑体のゲノムを含む。ゲノムは典型的には、細胞または生物に人工的に導入される遺伝子材料は含まず、例えば、細菌に形質転換されるプラスミドは、細菌ゲノムの一部ではない。

【０１１３】

本明細書で使用される「プログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質」とは、ゲノム内の任意の所望の標的ヌクレオチド配列にナビゲートするようにプログラミングすることができる、ＤＮＡ結合タンパク質を指す。ＤＮＡ結合タンパク質を目的のヌクレオチド配列に結合するようにプログラミングするには、ＤＮＡ結合タンパク質を修飾して、その結合特異性、例えばジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）または転写活性化因子様エフェクタータンパク質（ＴＡＬＥ）を変更する。ＺＦＮは、ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメインをＤＮＡ切断ドメインに融合することにより生成された、人工制限酵素である。ジンクフィンガードメインは、特定の所望のＤＮＡ配列を標的とするように操作することができ、これによりジンクフィンガーヌクレアーゼを、複雑なゲノム内のユニークな配列に標的化することができる。転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）は、ＤＮＡの特定の配列を切断するように操作できる制限酵素である。それらは、ＴＡＬエフェクターＤＮＡ結合ドメインをＤＮＡ切断ドメイン（ＤＮＡ鎖を切断するヌクレアーゼ）に融合することにより、作製される。転写アクチベーター様エフェクター（ＴＡＬＥ）は、実際的に任意の所望のＤＮＡ配列に結合するように操作できるため、ヌクレアーゼと組み合わせると、ＤＮＡを特定の位置で切断可能である。制限酵素は、遺伝子編集で使用するため、またはin situでゲノム編集するために、細胞に導入することができる。ＺＦＮおよびＴＡＬＥをプログラミングする方法は、当業者によく知られている。例えばかかる方法は、以下：Maeder, et al., Mol. Cell 31 (2): 294-301, 2008；Carroll et al., G

enetics Society of America, 188 (4): 773-782, 2011；Miller et al., Nature Biotechnology 25 (7): 778-785, 2007；Christian et al., Genetics 186 (2): 757-61, 2008；Li et al., Nucleic Acids Res 39 (1): 359-372, 2010；およびMoscou et al., Science 326 (5959): 1501, 2009に記載されており、これらの各々の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１１４】

本明細書で使用される「ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質」とは、ＤＮＡに結合することができるタンパク質、ポリペプチド、またはドメインを指し、その標的ＤＮＡ配列への結合は、ガイドヌクレオチド配列によって媒介される。したがって、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、ガイドヌクレオチド配列に結合することが理解される。「ガイドヌクレオチド」は、標的配列に相補的であり、ＤＮＡ結合タンパク質を標的配列に誘導できる、ＲＮＡ分子またはＤＮＡ分子（例えば、一本鎖ＤＮＡまたはｓｓＤＮＡ分子）であり得る。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、オリゴヌクレオチド配列である。したがって、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、ＲＮＡによりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質（例えばＣａｓ９タンパク質）、またはｓｓＤＮＡによりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質（例えばアルゴノートタンパク質）であってもよい。「プログラミング可能な」とは、ＤＮＡ結合タンパク質を、ガイドヌクレオチドが標的とする任意のＤＮＡ配列に結合するようにプログラミングできることを意味する。

【０１１５】

いくつかの態様において、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、以下の２つのドメインを含む：（１）標的核酸に対する相同性を共有するドメイン（例えば、そしてガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質の標的への結合を指揮する）；および（２）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質に結合するドメイン。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチドは、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）である。いくつかの態様において、ｇＲＮＡのドメイン（２）は、ｔｒａｃｒＲＮＡとして知られる配列に対応し、ステムループ構造を含む。例えば、いくつかの態様において、ドメイン（２）は、Jinek et al., Science 337:816-821(2012)において提供されるようなｔｒａｃｒＲＮＡと同一であるかまたはこれと相同であり、これは本明細書において参考として援用される。ｇＲＮＡの他の例（例えば、ドメイン２を含むもの）は、以下に見出すことができる：２０１３年９月６日提出の米国仮特許出願U.S.S.N. 61/874,682、表題「Switchable Cas9 Nucleases And Uses Thereof」、および２０１３年９月６日提出の米国仮特許出願U.S.S.N. 61/874,746、表題「Delivery System For Functional Nucleases」、これらの各々の全内容は、本明細書に参照によりその全体が組み込まれる。

【０１１６】

ガイドヌクレオチド配列は標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズするため、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、原則として、ガイドヌクレオチド配列により特定される任意の配列により、標的化することができる。Ｃａｓ９などの、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質を、部位特異的切断に（例えば、ゲノムを修飾するために）使用する方法は、当技術分野で知られている（例えば、以下を参照：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)；それぞれの内容全体は、本明細書に参照により組み込まれる）。

【０１１７】

ガイドヌクレオチド配列によってプログラミング可能な任意のＤＮＡ結合ドメインを、本開示に従って使用できることを理解されたい。例えばいくつかの態様において、ガイド

ヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質またはそのバリアントであってよい。当業者は、本開示が、ガイドヌクレオチド配列プログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質としてのＣａｓ９の使用には限定されず、標的配列結合の同様のメカニズムを採用する他のＤＮＡ結合タンパク質もまた使用できることを、理解するであろう。

【０１１８】

本明細書において用いられる場合、用語「Ｃａｓ９」または「Ｃａｓ９ヌクレアーゼ」とは、Ｃａｓ９タンパク質、そのフラグメント、またはバリアントを含む、ＲＮＡガイド型ヌクレアーゼを指す。Ｃａｓ９ヌクレアーゼはまた、ときにｃａｓｎ１ヌクレアーゼまたはＣＲＩＳＰＲ（clustered regularly interspaced short palindromic repeat）関連ヌクレアーゼとも言及される。ＣＲＩＳＰＲは、可動性（mobile）遺伝子エレメント（ウイルス、転位性エレメント、および接合型プラスミド）に対する防御を提供する適応免疫系である。ＣＲＩＳＰＲクラスターは、スペーサー、前駆（antecedent）可動性エレメントに相補的な配列、および核酸に侵入する標的（target invading nucleic acids）を含有する。ＣＲＩＳＰＲクラスターは、転写されプロセシングされてＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）になる。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムにおいて、プレｃｒＲＮＡ（ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡ）の正しいプロセシングは、トランスにコードされた小型ＲＮＡ（trans-encoded small RNA）（ｔｒａｃｒＲＮＡ）、内在性リボヌクレアーゼ３（ｒｎｃ）、およびＣａｓ９タンパク質を要求する。ｔｒａｃｒＲＮＡは、リボヌクレアーゼ３に補助される（aided）プレｃｒＲＮＡのプロセシングのためのガイドとして働く。その後、Ｃａｓ９／ｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡは、スペーサーに相補的な直鎖状または環状のｄｓＤＮＡ標的を、エンドヌクレアーゼにより（endonucleolytically）切断する。ｃｒＲＮＡに相補的ではない標的鎖は、先ずエンドヌクレアーゼにより切られ、次いで３’－５’エキソヌクレアーゼにより（exonucleolytically）トリミングされる。自然界において、ＤＮＡ結合およびＤＮＡ切断は、典型的には、タンパク質および両方のＲＮＡを要求する。しかしながら、単一のガイドＲＮＡ（「ｓｇＲＮＡ」または単に「ｇＲＮＡ」）は、ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡの両方を単一のＲＮＡ種に組み込むように操作され得る。例えば、Jinek et al., Science 337：816-821（2012）を参照；この全内容は、本明細書において参考として援用される。

【０１１９】

Ｃａｓ９ヌクレアーゼの配列および構造は、当業者に周知である（例えば、Ferretti et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 98：4658-4663（2001）；Deltcheva E. et al., Nature 471：602-607（2011）；およびJinek et al., Science 337：816-821（2012）を参照；これらの各々の全内容は、本明細書において参考として援用される）。Ｃａｓ９のオルソログは、限定されないがS. pyogenesおよびS. thermophilusを含む多様な種において記載されている。さらなる好適なＣａｓ９ヌクレアーゼおよび配列は、本開示に基づいて当業者に明らかとなり、かかるＣａｓ９ヌクレアーゼおよび配列は、Chylinski et al.,（2013）RNA Biology 10：5, 726-737において開示される生物および遺伝子座からのＣａｓ９配列を含む；これらの全内容は、本明細書において参考として援用される。いくつかの態様において、野生型Ｃａｓ９は、Streptococcus pyogenesからのＣａｓ９に対応する（NCBI参照配列：NC_002737.2、配列番号５（ヌクレオチド）；およびUniport参照配列：Q99ZW2、配列番号１（アミノ酸）。

【数１－１】

ATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCACAAATAGCGTCGGATGGGCGGTGATCAC
TGATGAATATAAGGTTCCGTCTAAAAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACAGACCGCCACAGTATCA
AAAAAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGACAGTGGAGAGACAGCGGAAGCGACTCGTCTCAAA
CGGACAGCTCGTAGAAGGTATACACGTCGGAAGAATCGTATTTGTTATCTACAGGAGATTTTTTCA
AATGAGATGGCGAAAGTAGATGATAGTTTCTTTCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTGGTGGAAGAA
GACAAGAAGCATGAACGTCATCCTATTTTTGGAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAA
TATCCAACTATCTATCATCTGCGAAAAAAATTGGTAGATTCTACTGATAAAGCGGATTTGCGCTTA
ATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTAAGTTTCGTGGTCATTTTTTGATTGAGGGAGATTTAAATC
CTGATAATAGTGATGTGGACAAACTATTTATCCAGTTGGTACAAACCTACAATCAATTATTTGAAG
AAAACCCTATTAACGCAAGTGGAGTAGATGCTAAAGCGATTCTTTCTGCACGATTGAGTAAATCAA
GACGATTAGAAAATCTCATTGCTCAGCTCCCCGGTGAGAAGAAAAATGGCTTATTTGGGAATCTCA
TTGCTTTGTCATTGGGTTTGACCCCTAATTTTAAATCAAATTTTGATTTGGCAGAAGATGCTAAATT
ACAGCTTTCAAAAGATACTTACGATGATGATTTAGATAATTTATTGGCGCAAATTGGAGATCAATA
TGCTGATTTGTTTTTGGCAGCTAAGAATTTATCAGATGCTATTTTACTTTCAGATATCCTAAGAGTA
AATACTGAAATAACTAAGGCTCCCCTATCAGCTTCAATGATTAAACGCTACGATGAACATCATCAA
GACTTGACTCTTTTAAAAGCTTTAGTTCGACAACAACTTCCAGAAAAGTATAAAGAAATCTTTTTT
GATCAATCAAAAAACGGATATGCAGGTTATATTGATGGGGGAGCTAGCCAAGAAGAATTTTATAA
ATTTATCAAACCAATTTTAGAAAAAATGGATGGTACTGAGGAATTATTGGTGAAACTAAATCGTGA
AGATTTGCTGCGCAAGCAACGGACCTTTGACAACGGCTCTATTCCCCATCAAATTCACTTGGGTGA
GCTGCATGCTATTTTGAGAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTAAAAGACAATCGTGAGAAGAT
TGAAAAAATCTTGACTTTTCGAATTCCTTATTATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTT
GCATGGATGACTCGGAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAATTTTGAAGAAGTTGTCGATAA
AGGTGCTTCAGCTCAATCATTTATTGAACGCATGACAAACTTTGATAAAAATCTTCCAAATGAAAA
AGTACTACCAAAACATAGTTTGCTTTATGAGTATTTTACGGTTTATAACGAATTGACAAAGGTCAA
ATATGTTACTGAAGGAATGCGAAAACCAGCATTTCTTTCAGGTGAACAGAAGAAAGCCATTGTTG

【数１－２】

ATTTACTCTTCAAAACAAATCGAAAAGTAACCGTTAAGCAATTAAAAGAAGATTATTTCAAAAAA
ATAGAATGTTTTGATAGTGTTGAAATTTCAGGAGTTGAAGATAGATTTAATGCTTCATTAGGTACC
TACCATGATTTGCTAAAAATTATTAAAGATAAAGATTTTTTGGATAATGAAGAAAATGAAGATATC
TTAGAGGATATTGTTTTAACATTGACCTTATTTGAAGATAGGGAGATGATTGAGGAAAGACTTAAA
ACATATGCTCACCTCTTTGATGATAAGGTGATGAAACAGCTTAAACGTCGCCGTTATACTGGTTGG
GGACGTTTGTCTCGAAAATTGATTAATGGTATTAGGGATAAGCAATCTGGCAAAACAATATTAGAT
TTTTTGAAATCAGATGGTTTTGCCAATCGCAATTTTATGCAGCTGATCCATGATGATAGTTTGACAT
TTAAAGAAGACATTCAAAAAGCACAAGTGTCTGGACAAGGCGATAGTTTACATGAACATATTGCA
AATTTAGCTGGTAGCCCTGCTATTAAAAAAGGTATTTTACAGACTGTAAAAGTTGTTGATGAATTG
GTCAAAGTAATGGGGCGGCATAAGCCAGAAAATATCGTTATTGAAATGGCACGTGAAAATCAGAC
AACTCAAAAGGGCCAGAAAAATTCGCGAGAGCGTATGAAACGAATCGAAGAAGGTATCAAAGAA
TTAGGAAGTCAGATTCTTAAAGAGCATCCTGTTGAAAATACTCAATTGCAAAATGAAAAGCTCTAT
CTCTATTATCTCCAAAATGGAAGAGACATGTATGTGGACCAAGAATTAGATATTAATCGTTTAAGT
GATTATGATGTCGATCACATTGTTCCACAAAGTTTCCTTAAAGACGATTCAATAGACAATAAGGTC
TTAACGCGTTCTGATAAAAATCGTGGTAAATCGGATAACGTTCCAAGTGAAGAAGTAGTCAAAAA
GATGAAAAACTATTGGAGACAACTTCTAAACGCCAAGTTAATCACTCAACGTAAGTTTGATAATTT
AACGAAAGCTGAACGTGGAGGTTTGAGTGAACTTGATAAAGCTGGTTTTATCAAACGCCAATTGG
TTGAAACTCGCCAAATCACTAAGCATGTGGCACAAATTTTGGATAGTCGCATGAATACTAAATACG
ATGAAAATGATAAACTTATTCGAGAGGTTAAAGTGATTACCTTAAAATCTAAATTAGTTTCTGACT
TCCGAAAAGATTTCCAATTCTATAAAGTACGTGAGATTAACAATTACCATCATGCCCATGATGCGT
ATCTAAATGCCGTCGTTGGAACTGCTTTGATTAAGAAATATCCAAAACTTGAATCGGAGTTTGTCT
ATGGTGATTATAAAGTTTATGATGTTCGTAAAATGATTGCTAAGTCTGAGCAAGAAATAGGCAAA
GCAACCGCAAAATATTTCTTTTACTCTAATATCATGAACTTCTTCAAAACAGAAATTACACTTGCA
AATGGAGAGATTCGCAAACGCCCTCTAATCGAAACTAATGGGGAAACTGGAGAAATTGTCTGGGA
TAAAGGGCGAGATTTTGCCACAGTGCGCAAAGTATTGTCCATGCCCCAAGTCAATATTGTCAAGAA
AACAGAAGTACAGACAGGCGGATTCTCCAAGGAGTCAATTTTACCAAAAAGAAATTCGGACAAGC
TTATTGCTCGTAAAAAAGACTGGGATCCAAAAAAATATGGTGGTTTTGATAGTCCAACGGTAGCTT
ATTCAGTCCTAGTGGTTGCTAAGGTGGAAAAAGGGAAATCGAAGAAGTTAAAATCCGTTAAAGAG
TTACTAGGGATCACAATTATGGAAAGAAGTTCCTTTGAAAAAAATCCGATTGACTTTTTAGAAGCT
AAAGGATATAAGGAAGTTAAAAAAGACTTAATCATTAAACTACCTAAATATAGTCTTTTTGAGTTA
GAAAACGGTCGTAAACGGATGCTGGCTAGTGCCGGAGAATTACAAAAAGGAAATGAGCTGGCTCT
GCCAAGCAAATATGTGAATTTTTTATATTTAGCTAGTCATTATGAAAAGTTGAAGGGTAGTCCAGA
AGATAACGAACAAAAACAATTGTTTGTGGAGCAGCATAAGCATTATTTAGATGAGATTATTGAGC
AAATCAGTGAATTTTCTAAGCGTGTTATTTTAGCAGATGCCAATTTAGATAAAGTTCTTAGTGCAT
ATAACAAACATAGAGACAAACCAATACGTGAACAAGCAGAAAATATTATTCATTTATTTACGTTG
ACGAATCTTGGAGCTCCCGCTGCTTTTAAATATTTTGATACAACAATTGATCGTAAACGATATACG
TCTACAAAAGAAGTTTTAGATGCCACTCTTATCCATCAATCCATCACTGGTCTTTATGAAACACGC
ATTGATTTGAGTCAGCTAGGAGGTGACTGA (配列番号 4)

【数２】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR
KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA
KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN
LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK
YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL
GELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGA
SAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFK
TNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT
LFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVI
EMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQEL
DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK
FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD
FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKA
TAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQ
TGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME
RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLA
SHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENI
IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号
1) (一重下線：HNHドメイン；二重下線：RuvCドメイン)

【０１２０】

いくつかの態様において、野生型Ｃａｓ９は、Streptococcus aureus．S．aureusＣａｓ９野生型に対応する（配列番号６）

【数３】

MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKK
LLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQI
SRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLE
TRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENE
KLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIEN
AELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIA
IFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQK
MINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIP
RSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEER
DINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGY
KHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFK
DYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDP
QTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSR
NKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYNN
DLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYE
VKSKKHPQIIKKG

【０１２１】

いくつかの態様において、野生型Ｃａｓ９は、Streptococcus thermophilusからのＣａｓ９に対応する。

Streptococcus thermophilus 野生型ＣＲＩＳＰＲ３ Ｃａｓ９（Ｓｔ３Ｃａｓ９）

【数４】

MTKPYSIGLDIGTNSVGWAVITDNYKVPSKKMKVLGNTSKKYIKKNLLGVLLFDSGITAEGRRLKRTA
RRRYTRRRNRILYLQEIFSTEMATLDDAFFQRLDDSFLVPDDKRDSKYPIFGNLVEEKVYHDEFPTIYHL
RKYLADSTKKADLRLVYLALAHMIKYRGHFLIEGEFNSKNNDIQKNFQDFLDTYNAIFESDLSLENSKQ
LEEIVKDKISKLEKKDRILKLFPGEKNSGIFSEFLKLIVGNQADFRKCFNLDEKASLHFSKESYDEDLETL
LGYIGDDYSDVFLKAKKLYDAILLSGFLTVTDNETEAPLSSAMIKRYNEHKEDLALLKEYIRNISLKTYN
EVFKDDTKNGYAGYIDGKTNQEDFYVYLKNLLAEFEGADYFLEKIDREDFLRKQRTFDNGSIPYQIHLQ
EMRAILDKQAKFYPFLAKNKERIEKILTFRIPYYVGPLARGNSDFAWSIRKRNEKITPWNFEDVIDKESS
AEAFINRMTSFDLYLPEEKVLPKHSLLYETFNVYNELTKVRFIAESMRDYQFLDSKQKKDIVRLYFKDK
RKVTDKDIIEYLHAIYGYDGIELKGIEKQFNSSLSTYHDLLNIINDKEFLDDSSNEAIIEEIIHTLTIFEDRE
MIKQRLSKFENIFDKSVLKKLSRRHYTGWGKLSAKLINGIRDEKSGNTILDYLIDDGISNRNFMQLIHDD
ALSFKKKIQKAQIIGDEDKGNIKEVVKSLPGSPAIKKGILQSIKIVDELVKVMGGRKPESIVVEMARENQ
YTNQGKSNSQQRLKRLEKSLKELGSKILKENIPAKLSKIDNNALQNDRLYLYYLQNGKDMYTGDDLDI
DRLSNYDIDHIIPQAFLKDNSIDNKVLVSSASNRGKSDDFPSLEVVKKRKTFWYQLLKSKLISQRKFDNL
TKAERGGLLPEDKAGFIQRQLVETRQITKHVARLLDEKFNNKKDENNRAVRTVKIITLKSTLVSQFRKD
FELYKVREINDFHHAHDAYLNAVIASALLKKYPKLEPEFVYGDYPKYNSFRERKSATEKVYFYSNIMNI
FKKSISLADGRVIERPLIEVNEETGESVWNKESDLATVRRVLSYPQVNVVKKVEEQNHGLDRGKPKGL
FNANLSSKPKPNSNENLVGAKEYLDPKKYGGYAGISNSFAVLVKGTIEKGAKKKITNVLEFQGISILDRI
NYRKDKLNFLLEKGYKDIELIIELPKYSLFELSDGSRRMLASILSTNNKRGEIHKGNQIFLSQKFVKLLYH
AKRISNTINENHRKYVENHKKEFEELFYYILEFNENYVGAKKNGKLLNSAFQSWQNHSIDELCSSFIGPT
GSERKGLFELTSRGSAADFEFLGVKIPRYRDYTPSSLLKDATLIHQSVTGLYETRIDLAKLGEG (配列番号7)

Streptococcus thermophilus ＣＲＩＳＰＲ１ Ｃａｓ９野生型（Ｓｔ１Ｃａｓ９）

【数５】

MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQGRRLTRRKKHRRVRLNRL
FEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFIALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSIGDYAQIVK
ENSKQLETKTPGQIQLERYQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDE
FINRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEFRAAKASYTAQEFNL
LNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAKLFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHT
FEAYRKMKTLETLDIEQMDRETLDKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANS
SIFGKGWHNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIYNPVVAKSVR
QAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKANKDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSV
FHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYTGKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQE
KGQRTPYQALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLVDTRYASR
VVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYHHHAVDALIIAASSQLNLWKKQKN
TLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVFKAPYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYAT
RQAKVGKDKADETYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPNKQI
NEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLGNHIDITPKDSNNKVVLQSVSPWR
ADVYFNKTTGKYEILGLKYADLQFEKGTGTYKISQEKYNDIKKKEGVDSDSEFKFTLYKNDLLLVKDT
ETKEQQLFRFLSRTMPKQKHYVELKPYDKQKFEGGEALIKVLGNVANSGQCKKGLGKSNISIYKVRTD
VLGNQHIIKNEGDKPKLDF (配列番号 8)

【０１２２】

いくつかの態様において、本明細書で提供される融合タンパク質のいずれかのＣａｓ９ドメインは、単細胞原核微生物のドメインおよび界を構成する古細菌（例えば、ナノ古細菌）からのＣａｓ９である。いくつかの態様において、Ｃａｓ９ドメインはＣａｓＸまたはＣａｓＹであり、これらは例えば、Burstein et al., “New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes.” Cell Res. 2017 Feb 21. doi: 10.1038/cr.2017.21に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。ゲノム解析されたメタゲノミクスを使用して、生命の古細菌ドメインで最初に報告されたＣａｓ９を含む、多くのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムが特定された。この分岐（divergent）Ｃａｓ９タンパク質は、活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの一部としてナノ古細菌で発見された。細菌では、ＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓＸとＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓＹという以前には知られていなかった２つのシステムが発見され、これらは、これまでに発見された中で最もコンパクトなシステムである。いくつかの態様において、Ｃａｓ９は、ＣａｓＸまたはＣａｓＸのバリアントを指す。いくつかの態様において、Ｃａｓ９は、ＣａｓＹまたはＣａｓＹのバリアントを指す。他のＲＮＡガイドＤＮＡ結合タンパク質も、核酸によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質（ｎａｐＤＮＡｂｐ）として使用することができ、本開示の範囲内であることが、理解されるべきである。

【０１２３】

いくつかの態様において、Ｃａｓ９ドメインは、天然のＣａｓＸまたはＣａｓＹタンパク質と少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも９９．５％同一の、アミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、Ｃａｓ９ドメインは、天然に存在するＣａｓＸまたはＣａｓＹタンパク質である。いくつかの態様において、Ｃａｓ９ドメインは、配列番号３３６～３３７または３０００のいずれか１つと、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも９９．５％同一の、アミノ酸配列を含む。いくつかの態様

において、Ｃａｓ９ドメインは、配列番号３３６～３３７または３０００のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の細菌種からのＣａｓＸおよびＣａｓＹもまた、本開示に従って使用し得ることが理解されるべきである。

【０１２４】

いくつかの態様において、野生型Ｃａｓ９は、Sulfolobus islandicusからのＣａｓＸを指す(REY15A株)。

【数６】

MEVPLYNIFGDNYIIQVATEAENSTIYNNKVEIDDEELRNVLNLAYKIAKNNEDAAAE
RRGKAKKKKGEEGETTTSNIILPLSGNDKNPWTETLKCYNFPTTVALSEVFKNFSQV
KECEEVSAPSFVKPEFYKFGRSPGMVERTRRVKLEVEPHYLIMAAAGWVLTRLGKA
KVSEGDYVGVNVFTPTRGILYSLIQNVNGIVPGIKPETAFGLWIARKVVSSVTNPNVS
VVSIYTISDAVGQNPTTINGGFSIDLTKLLEKRDLLSERLEAIARNALSISSNMRERYIV
LANYIYEYLTGSKRLEDLLYFANRDLIMNLNSDDGKVRDLKLISAYVNGELIRGEG
(　　配列番号 338)

【０１２５】

いくつかの態様において、野生型Ｃａｓ９は、Sulfolobus islandicusからのＣａｓＸを指す(REY15A株)。

【数７】

MEVPLYNIFGDNYIIQVATEAENSTIYNNKVEIDDEELRNVLNLAYKIAKNNEDAAAE
RRGKAKKKKGEEGETTTSNIILPLSGNDKNPWTETLKCYNFPTTVALSEVFKNFSQV
KECEEVSAPSFVKPEFYEFGRSPGMVERTRRVKLEVEPHYLIIAAAGWVLTRLGKAK
VSEGDYVGVNVFTPTRGILYSLIQNVNGIVPGIKPETAFGLWIARKVVSSVTNPNVSV
VRIYTISDAVGQNPTTINGGFSIDLTKLLEKRYLLSERLEAIARNALSISSNMRERYIVL
ANYIYEYLTGSKRLEDLLYFANRDLIMNLNSDDGKVRDLKLISAYVNGELIRGEG
(　　配列番号 339)

【０１２６】

いくつかの態様において、野生型Ｃａｓ９は、Parcubacteria群の細菌からのＣａｓＹを指す。

ＣａｓＹ(ncbi.nlm.nih.gov/protein/APG80656.1)

>APG80656.1 ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質Ｃａｓ９［未培養のParcubacteria群細菌］

【数８】

MSKRHPRISGVKGYRLHAQRLEYTGKSGAMRTIKYPLYSSPSGGRTVPREIVSAINDDYVGLYGLSNFD
DLYNAEKRNEEKVYSVLDFWYDCVQYGAVFSYTAPGLLKNVAEVRGGSYELTKTLKGSHLYDELQID
KVIKFLNKKEISRANGSLDKLKKDIIDCFKAEYRERHKDQCNKLADDIKNAKKDAGASLGERQKKLFR
DFFGISEQSENDKPSFTNPLNLTCCLLPFDTVNNNRNRGEVLFNKLKEYAQKLDKNEGSLEMWEYIGIG
NSGTAFSNFLGEGFLGRLRENKITELKKAMMDITDAWRGQEQEEELEKRLRILAALTIKLREPKFDNHW
GGYRSDINGKLSSWLQNYINQTVKIKEDLKGHKKDLKKAKEMINRFGESDTKEEAVVSSLLESIEKIVP
DDSADDEKPDIPAIAIYRRFLSDGRLTLNRFVQREDVQEALIKERLEAEKKKKPKKRKKKSDAEDEKETI
DFKELFPHLAKPLKLVPNFYGDSKRELYKKYKNAAIYTDALWKAVEKIYKSAFSSSLKNSFFDTDFDK
DFFIKRLQKIFSVYRRFNTDKWKPIVKNSFAPYCDIVSLAENEVLYKPKQSRSRKSAAIDKNRVRLPSTE
NIAKAGIALARELSVAGFDWKDLLKKEEHEEYIDLIELHKTALALLLAVTETQLDISALDFVENGTVKD
FMKTRDGNLVLEGRFLEMFSQSIVFSELRGLAGLMSRKEFITRSAIQTMNGKQAELLYIPHEFQSAKITT
PKEMSRAFLDLAPAEFATSLEPESLSEKSLLKLKQMRYYPHYFGYELTRTGQGIDGGVAENALRLEKSP
VKKREIKCKQYKTLGRGQNKIVLYVRSSYYQTQFLEWFLHRPKNVQTDVAVSGSFLIDEKKVKTRWN
YDALTVALEPVSGSERVFVSQPFTIFPEKSAEEEGQRYLGIDIGEYGIAYTALEITGDSAKILDQNFISDPQ
LKTLREEVKGLKLDQRRGTFAMPSTKIARIRESLVHSLRNRIHHLALKHKAKIVYELEVSRFEEGKQKIK
KVYATLKKADVYSEIDADKNLQTTVWGKLAVASEISASYTSQFCGACKKLWRAEMQVDETITTQELIG
TVRVIKGGTLIDAIKDFMRPPIFDENDTPFPKYRDFCDKHHISKKMRGNSCLFICPFCRANADADIQASQ
TIALLRYVKEEKKVEDYFERFRKLKNIKVLGQMKKI (配列番号 3000)

【０１２７】

いくつかの態様において、Ｃａｓ９は：Corynebacterium ulcerans（NCBI Refs：NC_015683.1、NC_017317.1）；Corynebacterium diphtheria（NCBI Refs：NC_016782.1、NC_016786.1）；Spiroplasma syrphidicola（NCBI Ref：NC_021284.1）；Prevotella intermedia（NCBI Ref：NC_017861.1）；Spiroplasma taiwanense（NCBI Ref：NC_021846.1）；Streptococcus iniae（NCBI Ref：NC_021314.1）；Belliella baltica（NCBI Ref：NC_018010.1）；Psychroflexus torquisl（NCBI Ref：NC_018721.1）；Listeria innocua（NCBI Ref：NP_472073.1）、Campylobacter jejuni（NCBI Ref：YP_002344900.1）、もしくはNeisseria meningitidis（NCBI Ref：YP_002342100.1）からのＣａｓ９、または例１（配列番号１１～２６０）において列記される任意の他の生物からのＣａｓ９を言う。

【０１２８】

本開示の融合タンパク質においてガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインとして用いられるためには、Ｃａｓ９タンパク質は、ヌクレアーゼ不活性である必要がある。ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９タンパク質は、交換可能に「ｄＣａｓ９」タンパク質として言及され得る（ヌクレアーゼ「不活性型（dead）」Ｃａｓ９であるため）。不活性なＤＮＡ切断ドメインを有するＣａｓ９タンパク質（またはそのフラグメント）を作製するための方法は、公知である（例えば、Jinek et al., Science. 337：816-821（2012）；Qi et al.,（2013）Cell. 28；152（5）：1173-83を参照；これらの各々の全内容は、本明細書において参考として援用される）。例えば、Ｃａｓ９のＤＮＡ切断ドメインは、２つのサブドメイン、ＨＮＨヌクレアーゼサブドメインおよびＲｕｖＣ１サブドメインを含むことが知られている。ＨＮＨサブドメインは、ｇＲＮＡに対して相補的な鎖を切断し、一方、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中の変異により、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およびＨ８４０Ａは、S. pyogenes Ｃａｓ９のヌクレアーゼ活性を完全に不活化する（Jinek et al., Science. 337：816-821（2012）；Qi et al., Cell. 28；152（5）：1173-83（2013））。

ｄＣａｓ９（Ｄ１０ＡおよびＨ８４０Ａ）

【数９】

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR
KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA
KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN
LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK
YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL
GELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGA
SAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFK
TNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT
LFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVI
EMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQEL
DINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK
FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD
FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKA
TAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQ
TGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME
RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLA
SHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENI
IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号
2) (一重下線：HNHドメイン；二重下線：RuvCドメイン)

【０１２９】

本開示のｄＣａｓ９は、完全に不活性なＣａｓ９または部分的に不活性なＣａｓ９を包含する。例えば、ｄＣａｓ９が、不活化された２つのヌクレアーゼドメインのうちの一方を有する一方で、他方のヌクレアーゼドメインは活性なままであってもよい。かかる部分的に活性なＣａｓ９はまた、ターゲティングされたＤＮＡ配列の一方の鎖を切断するその能力に起因して、「Ｃａｓ９ニッカーゼ」としても言及され得る。本開示による使用のために好適なＣａｓ９ニッカーゼは、活性なＨＮＨドメインおよび不活性なＲｕｖＣドメインを有し、標的ＤＮＡの鎖のうちｓｇＲＮＡにより結合されているもの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ドメインを不活化する変異、例えばＤ１０Ａ変異を含んでもよい。ＲｕｖＣドメインを不活化する任意の変異、例えば、ＲｕｖＣドメインにおける挿入、欠失、または単一もしくは複数のアミノ酸置換が、Ｃａｓ９ニッカーゼ中に含まれ得ることが理解されるべきである。本明細書において記載されるＣａｓ９ニッカーゼにおいて、ＲｕｖＣドメインが不活化されている一方で、ＨＮＨドメインは活性なままである。したがって、Ｃａｓ９ニッカーゼは、ＲｕｖＣドメインを不活化する変異（例えばＤ１０Ａ）以外の変異を含んでもよいが、一方で、それらの変異は、ＨＮＨドメインの活性に影響を及ぼさない。非限定的なＣａｓ９ニッカーゼの例において、位置８４０におけるヒスチジンは、不変のままである。本開示のために好適な例示的なＣａｓ９ニッカーゼの配列を、以下に提供する。

Ｃａｓ９ニッカーゼ（Ｄ１０Ａ）

【数１０】

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR
KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA
KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN
LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK
YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL
GELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGA
SAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFK
TNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT
LFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVI
EMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQEL
DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK
FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD
FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKA
TAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQ
TGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME
RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLA
SHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENI
IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD（配列番号
3)（一重下線：HNHドメイン；二重下線：RuvCドメイン）

S．aureus Ｃａｓ９ニッカーゼ（Ｄ１０Ａ）

【数１１】

MKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKK
LLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQI
SRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLE
TRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENE
KLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIEN
AELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIA
IFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQK
MINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIP
RSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEER
DINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGY
KHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFK
DYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDP
QTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSR
NKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYNN
DLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYE
VKSKKHPQIIKKG（配列番号 5)

【０１３０】

用語「ｄＣａｓ９」または「ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９」が本明細書において用いられる場合、それは、ＨＮＨおよびＲｕｖＣドメインの両方において不活性であるＣａｓ９バリアントならびにＣａｓ９ニッカーゼを指すことが理解される。例えば、本開示において用いられるｄＣａｓ９は、配列番号２または配列番号３において記載されるアミノ酸配列を含んでもよい。いくつかの態様において、ｄＣａｓ９は、ＲｕｖＣまたはＨＮＨド

メインを不活化する他の変異を含んでもよい。Ｃａｓ９を不活化するさらなる好適な変異は、本開示および当該分野における知識に基づいて当業者には明らかとなり、本開示の範囲内である。かかるさらなる例示的な好適なヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９ドメインとして、これらに限定されないが、Ｄ８３９Ａおよび／またはＮ８６３Ａ（例えば、Prashant et al., Nature Biotechnology. 2013；31（9）：833-838を参照；この全内容は、本明細書において参考として援用される）、またはＫ６０３Ｒ（例えば、Chavez et al., Nature Methods 12, 326-328, 2015を参照；この全内容は、本明細書において参考として援用される）が挙げられる。用語、Ｃａｓ９、ｄＣａｓ９、またはＣａｓ９のバリアントはまた、任意の生物からのＣａｓ９、ｄＣａｓ９、またはＣａｓ９のバリアントを包含する。また理解されるのは、任意の生物からのｄＣａｓ９、Ｃａｓ９ニッカーゼ、または他の適切なＣａｓ９バリアントを、本開示により用いることができることである。

【０１３１】

「デアミナーゼ」とは、分子からのアミン基の除去、または脱アミノ化を触媒する酵素を指す。いくつかの態様において、デアミナーゼは、シチジンまたはデオキシシチジンから、それぞれウリジンまたはデオキシウリジンへの加水分解性脱アミノ化を触媒する、シチジンデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、シトシンからウラシル（例えばＲＮＡにおいて）またはチミン（例えばＤＮＡにおいて）への加水分解性脱アミノ化を触媒する、シトシンデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、サル、ウシ、イヌ、ラットまたはマウスなどの生物からの天然に存在するデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、生物からの天然に存在するデアミナーゼのバリアントであって、これは天然には存在しない。例えば、いくつかの態様において、デアミナーゼまた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％、または少なくとも９９．５％同一である。

【０１３２】

「シトシンデアミナーゼ」とは、化学反応「シトシン＋H_2O→ウラシル＋NH_3」または「５－メチル－シトシン＋H_2O→チミン＋NH_3」を触媒する酵素を指す。反応式から明らかであり得るとおり、かかる化学反応は、ＣからＵ／Ｔへの核酸塩基変更をもたらす。遺伝子の文脈に関して、かかるヌクレオチド変更または変異は、次いで、タンパク質におけるアミノ酸残基の変更をもたらし得、これは、タンパク質の機能に、例えば、機能喪失型または機能獲得型の影響を及ぼし得る。

【０１３３】

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、制御された有益な様式において変異誘発を開始させるために役立つ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（apolipoprotein B mRNA-editing complex：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、ヒト細胞に、逆転写されたウイルスｓｓＤＮＡにおけるシトシンの脱アミノ化を介して、特定のＨＩＶ－１株に対する保護を提供する。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^{2+}配位モチーフ（Ｈｉｓ－Ｘ－Ｇｌｕ－X_{23-26}－Ｐｒｏ－Ｃｙｓ－X_{2-4}－Ｃｙｓ；配列番号８２０）および結合した水分子を必要とする。Ｇｌｕ残基は、脱アミノ化反応における求核攻撃のために、水分子を水酸化亜鉛に対して活性化するように作用する。各々のファミリーメンバーは、その特定の「ホットスポット（hotspot）」、ｈＡＩＤについてはＷＲＣ（ＷはＡまたはＴであり、ＲはＡまたはＧである）から、ｈＡＰＯＢＥＣ３Ｆについては ＴＴＣにわたる範囲において、優先的に脱アミノ化する。最近のＡＰＯＢＥＣ３Ｇの触媒ドメインの結晶構造は、６本のαヘリックスに挟まれた５本鎖βシートコアから構成される二次構造を明らかにし、これは、ファミリー全体にわたり保存されていると考えられる。活性な中心ループが、ｓ

ｓＤＮＡ結合および「ホットスポット」のアイデンティティーを決定することの両方の原因であることが示されている。これらの酵素の過剰発現は、ゲノム不安定性およびがんに関連付けられており、したがって、配列特異的なターゲティング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、転写依存的な、鎖に偏りがある様式においてｓｓＤＮＡにおけるシトシンをウラシルに変換することにより、抗体の成熟の原因となる。

【０１３４】

本明細書において、「核酸塩基エディター」とは、ヌクレオチド塩基を編集するタンパク質を指す。「編集」とは、あるヌクレオチド塩基から別のヌクレオチド塩基への変換を指す。例えば、核酸塩基は、核酸配列内のＣ塩基を標的として、Ｃ塩基をＴ塩基に変換し得る。いくつかの態様において、ＣからＴへの編集は、デアミナーゼ、例えばシトシンデアミナーゼによって行われる。他の種類の塩基変換も企図される。いくつかの態様において、核酸塩基エディターは、それを標的配列に導くＤＮＡ結合ドメインを含む。

【０１３５】

したがって、塩基エディターは、シトシンデアミナーゼ－ｄＣａｓ９融合タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、塩基エディターは、デアミナーゼ－ｄＣａｓ９－ＵＧＩ融合タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、塩基エディターは、ＡＰＯＢＥＣ１－ｄＣａｓ９－ＵＧＩ融合タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、塩基エディターは、ＡＰＯＢＥＣ１－Ｃａｓ９ニッカーゼ－ＵＧＩ融合タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、塩基エディターは、ＡＰＯＢＥＣ１－ｄＣｐｆ１－ＵＧＩ融合タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、塩基エディターは、ＡＰＯＢＥＣ１－ｄＮｇＡｇｏ－ＵＧＩ融合タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、塩基エディターは、ｐｍＣＤＡ１－Ｃａｓ９ニッカーゼ－ＵＧＩ融合タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、塩基エディターは、ヒトＡＰＯＢＥＣ３Ｇ－Ｃａｓ９ニッカーゼＵＧＩ融合タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、塩基エディターは、第２のＵＧＩドメインを含み得る。本明細書に記載の核酸塩基エディターの非限定的な例示的配列は、例１、配列番号２９３～３０２、１０７１、および１０８４に提供される。かかる核酸塩基エディターおよびそれらをゲノム編集のために使用する方法は、例えば、当分野において以下に記載されている：米国特許第9,068,179号、米国特許出願公開US 2015/0166980、US 2015/0166981、US 2015/0166982、US20150166984、およびUS20150165054、および米国特許仮出願U.S.S.N. 62/245,828（２０１５年１０月２３日出願）；62/279,346（２０１６年１月１５日出願）；62/311,763（２０１６年３月２２日出願）；62/322178（２０１６年４月１３日出願）；62/357,352（２０１６年６月３０日出願）；62,370,700（２０１６年８月３日出願）；62/398,490（２０１６年９月２２日出願）；62/408686（２０１６年１０月１４日出願）；ＰＣＴ出願 PCT/US2016/058344（２０１６年１０月２６日出願）；米国特許出願15/311,852（２０１６年１０月２２日出願）；Komor et al. (2017) Improved Base Excision Repair Inhibition and Bacteriophage Mu Gam Protein Yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. Sci Adv, 3: eaao4774；およびKomor et al., Nature, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, 533, 420-424 (2016)；それぞれの内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【０１３６】

用語「標的部位」または「標的配列」とは、核酸分子（例えばＤＮＡ分子）中の、本明細書において提供される融合タンパク質により脱アミノ化される配列を指す。いくつかの態様において、標的配列は、ポリヌクレオチド（例えばＤＮＡ）であり、ここで、ポリヌクレオチドは、コード鎖および相補鎖を含む。 「コード鎖」および「相補鎖」の意味は、当該分野における当該用語の一般的な意味である。いくつかの態様において、標的配列は、哺乳動物のゲノムにおける配列である。いくつかの態様において、標的配列は、ヒトのゲノムにおける配列である。用語「標的コドン」とは、塩基エディターにより編集され、Ｃ塩基の脱アミノ化を介して異なるコドンに変換される、アミノ酸コドンを指す。いく

つかの態様において、標的コドンはコード鎖中で編集される。いくつかの態様において、標的コドンは相補鎖中で編集される。

【０１３７】

用語「リンカー」とは、本明細書において用いられる場合、２つの分子または部分、例えば融合タンパク質の２つのドメイン、例えば、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９ドメインおよび核酸編集ドメイン（例えばデアミナーゼドメイン）などを連結する化学基または分子を指す。典型的には、リンカーは、２つの基、分子、または他の部分の間に位置するか、これらに隣接し、共有結合を介して各々に連結し、それにより２つを連結する。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸または複数のアミノ酸（例えば、ペプチドまたはタンパク質）である。いくつかの態様において、リンカーは、有機分子、基、ポリマー、または化学部分である。いくつかの態様において、リンカーは、２～１００アミノ酸長、例えば、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、３０～３５、３５～４０、４０～４５、４５～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１５０、または１５０～２００アミノ酸長である。より長いまたはより短いリンカーもまた、企図される。

【０１３８】

本明細書において用いられる用語「変異」は、配列、例えば核酸もしくはアミノ酸配列中の残基の、別の残基による置換、または配列中の１つ以上の残基の欠失もしくは挿入を言う。変異は、典型的には本明細書において、元々の残基、続いて配列中における残基の位置、および新たに置換された残基のアイデンティティーを同定することによって、記載される。本明細書において提供されるアミノ酸置換（変異）を作るための種々の方法は当分野において周知であり、例えばGreen and Sambrook, Molecular Cloning：A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012))によって提供されている。

【０１３９】

本明細書において用いられる用語「核酸」および「核酸分子」とは、核酸塩基と酸部分とを含む化合物、例えば、ヌクレオシド、ヌクレオチド、またはヌクレオチドのポリマーを言う。典型的には、ポリマー核酸、例えば３つ以上のヌクレオチドを含む核酸分子は直鎖状分子であり、その中の隣接するヌクレオチド同士はホスホジエステル結合によって互いにリンクされている。いくつかの態様において、「核酸」は、個々の核酸残基を言う（例えば、ヌクレオチドおよび／またはヌクレオシド）。いくつかの態様において、「核酸」は、３つ以上の個々のヌクレオチド残基を含むオリゴヌクレオチド鎖を言う。本明細書において用いられる用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドのポリマー（例えば、ひとつながりの少なくとも３ヌクレオチド）を指すために交換可能に用いられ得る。いくつかの態様において、「核酸」はＲＮＡならびに一本および／または二本鎖ＤＮＡを包摂する。核酸は、天然に、例えばゲノム、転写物、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、プラスミド、コスミド、染色体、染色分体、または他の天然に存在する核酸分子の文脈で存在し得る。他方で、核酸分子は、天然に存在しない分子、例えば、組換体ＤＮＡもしくはＲＮＡ、人工染色体、操作されたゲノム、またはそのフラグメント、あるいは合成ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドであり得、あるいは、天然に存在しないヌクレオチドまたはヌクレオシドを包含する。さらにその上に、用語「核酸」、「ＤＮＡ」、「ＲＮＡ」、および／または類似の用語は、核酸アナログ、例えばホスホジエステル骨格以外を有するアナログを包含する。核酸は、天然のソースから精製、組換発現システムを用いて産生および任意に精製、化学合成などされ得る。適切なところでは、例えば化学合成された分子のケースにおいては、核酸は、ヌクレオシドアナログ、例えば化学修飾された塩基または糖を有するアナログ、および骨格改変を含み得る。核酸配列は、別様に示されない限り５’から３’方向に提示される。いくつかの態様において、核酸は、天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシ

グアノシン、およびデオキシシチジン）；ヌクレオシドアナログ（例えば、２－アミノアデノシン、２－チオチミジン、イノシン、ピロロ－ピリミジン、３－メチルアデノシン、５－メチルシチジン、２－アミノアデノシン、Ｃ５－ブロモウリジン、Ｃ５－フルオロウリジン、Ｃ５－ヨードウリジン、Ｃ５－プロピニル－ウリジン、Ｃ５－プロピニル－シチジン、Ｃ５－メチルシチジン、２－アミノアデノシン、７－デアザアデノシン、７－デアザグアノシン、８－オキソアデノシン、８－オキソグアノシン、Ｏ（６）－メチルグアニン、および２－チオシチジン）；化学修飾された塩基；生物学的に改変された塩基（例えば、メチル化塩基）；インターカレーションされた塩基；修飾された糖（例えば、２’－フルオロリボース、リボース、２’－デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース）；および／または修飾されたリン酸基（例えば、ホスホロチオエートおよび５’－Ｎ－ホスホロアミダイト結合）であるか、またはそれを含む。

【０１４０】

用語「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」は本明細書においては交換可能に用いられ、ペプチド（アミド）結合によって一緒にリンクされたアミノ酸残基のポリマーを言う。用語は、任意のサイズ、構造、または機能のタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドを言う。典型的には、タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは少なくとも３アミノ酸の長さであろう。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、個々のタンパク質またはタンパク質の集合を言い得る。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチド中のアミノ酸の１つ以上は、例えば、化学的実体、例えば炭水化物基、ヒドロキシル基、リン酸基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基、コンジュゲーション、官能化、または他の改変のためのリンカーなどの追加によって改変され得る。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、単分子でもまたあり得、または多分子複合体であり得る。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、天然に存在するタンパク質またはペプチドの単にフラグメントであり得る。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、天然に存在、組換体、もしくは合成、またはそのいずれかの組み合わせであり得る。本明細書において用いられる用語「融合タンパク質」は、少なくとも２つの異なるタンパク質からのタンパク質ドメインを含むハイブリッドポリペプチドを言う。１つのタンパク質は、融合タンパク質のアミノ末端（Ｎ末端）部分またはカルボキシ末端（Ｃ末端）部分（protein）に位置し得、それゆえにそれぞれ「アミノ末端融合タンパク質」または「カルボキシ末端融合タンパク質」を形成する。タンパク質は、異なるドメイン、例えば、核酸編集タンパク質の核酸結合ドメイン（例えば、標的部位へのタンパク質の結合を導くＣａｓ９のｇＲＮＡ結合ドメイン）および核酸切断ドメインまたは触媒ドメインを含み得る。いくつかの態様において、タンパク質は、タンパク質部分、例えば核酸結合ドメインを構成するアミノ酸配列と、有機化合物、例えば核酸切断剤として作用し得る化合物とを含む。いくつかの態様において、タンパク質は、核酸、例えばＲＮＡとの複合体であるか、またはそれと会合している。本明細書において提供されるタンパク質のいずれかは、当分野において公知のいずれかの方法によって産生され得る。例えば、本明細書において提供されるタンパク質は組換体タンパク質発現および精製によって産生され得、これはペプチドリンカーを含む融合タンパク質に特に適している。組換体タンパク質発現および精製のための方法は周知であり、Green and Sambrook, Molecular Cloning：A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012))に記載されているものを包含し、この全内容は参照によって本明細書に組み込まれる。

【０１４１】

用語「対象」とは、本明細書において用いられる場合、個々の生物、例えば、個々の哺乳動物を指す。いくつかの態様において、対象は、ヒトである。いくつかの態様において、対象は、非ヒト哺乳動物である。いくつかの態様において、対象は、非ヒト霊長類である。いくつかの態様において、対象は、げっ歯類である。いくつかの態様において、対象は、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ネコまたはイヌである。いくつかの態様において、対象は、脊椎動物、両生類、爬虫類、魚、昆虫、ハエ、または線虫である。いくつかの態様において

、対象は、研究動物である。いくつかの態様において、対象は、遺伝子操作された、例えば、遺伝子操作された非ヒト対象である。対象は、いずれの性別であってもよく、発達の任意の段階であってよい。

【０１４２】

タンパク質または核酸の文脈において本明細書で用いられる用語「組換体」は、天然に存在せず、ヒトによる操作の産物であるタンパク質または核酸を言う。例えば、いくつかの態様において、組換体タンパク質または核酸分子は、いずれかの天然に存在する配列と比較して少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、または少なくとも７つの変異を含むアミノ酸またはヌクレオチド配列を含む。

【０１４３】

本発明の特定の態様の詳細な説明

免疫系はがんの成長の予防に重要であり、がんの発生に対する免疫学的耐性を提供するために「免疫監視」が存在する（例えばOld et al., Annu Rev Med 1964; 15: 167-186; Burnet et al., Prog Exp Tumor Res 1970; 13: 1-27；およびGraziano et al., Cancer Treat Res 2005; 123: 89-111に記載されている；それぞれは参照により本明細書に組み込まれる）。

【０１４４】

免疫監視の存在にもかかわらず、がん細胞の免疫監視を回避する能力のために、がんは明らかに免疫適格な動物およびヒトでも発生し得る（例えば、Hanahan et al., Cell 2000; 100: 57-70およびZitvogel et al., Nat Rev Immunol 2006; 6: 715-727に記載されている；それぞれは参照により本明細書に組み込まれる）。がん細胞の免疫監視の回避は、十分に特徴づけられたさまざまなメカニズムを介して発生し、これには以下が含まれる：自発性（autochthonous）腫瘍によるT細胞寛容の誘導（例えば、Willimsky et al., Nature 2005; 437: 141-146に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる）、がん免疫編集（例えば、Dunn et al., Nat Immunol 2002; 3: 991-998に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる）、および免疫抑制性のがん微小環境の発現（例えば、Zou et al., Nat Rev Cancer 2005; 5: 263-274に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる）。腫瘍の進行を遅らせ、再発を防ぐために、腫瘍の発生後に免疫応答を強化するための潜在的なアプローチとして、治療用がんワクチンまたは養子免疫療法が開発され、試験されている。免疫療法的アプローチ、例えば、がんワクチンが記載されたが、部分的にしか成功していない（例えば、Finn et al., Nat Rev Immunol 2003; 3: 630-641に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる）。

【０１４５】

本明細書に記載されるのは、in vivoまたはex vivoでがんワクチンとして使用され得る腫瘍特異的抗原に由来する免疫原性ペプチド（例えば、ヘテロクリティックエピトープまたはクリプティックエピトープ）を生産するためのシステム、方法、組成物、およびキットである。遺伝子編集剤、例えばシトシンデアミナーゼに融合したプログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインを含む核酸塩基エディター（例えば、触媒的に不活性なＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼ）を使用して、標的変異を腫瘍特異的抗原に導入し、腫瘍特異的抗原から生じるペプチド（ヘテロクリティックエピトープ）、または腫瘍特異的抗原遺伝子の通常は非翻訳領域から生じるペプチド（クリプティックペプチド）の、変更バージョンを生成する。ヘテロクリティックペプチドまたはクリプティックペプチドは、対象（例えば、がんを有する対象）においてin vivoで生成され、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩ経路を介して適応免疫系に提示され、これは次に、例えば、Ｔ細胞応答およびＢ細胞応答などの強い適応免疫応答を誘導する。かかる適応免疫応答は抗原特異的であり、腫瘍の成長を抑え、転移を防ぐのに効果的である。

【０１４６】

本開示のがんワクチンの利点は、ワクチン（例えば、腫瘍特異的抗原に由来する抗原性ペプチド）が、in vivoで悪性細胞のゲノムおよびプロテオームから生成され、高度に個

人化されていることである。本明細書に記載のがんワクチンはまた高度にがん特異的であり、免疫原性エピトープが腫瘍特異的抗原に由来するため、「自己」に対する望ましくない免疫応答を誘導しない。さらに、本明細書に記載のがんワクチンによって誘導される適応免疫応答は、免疫系に「メモリー」を与え、免疫系による、がんゲノムの変異原性が高いために生成される「ネオエピトープ」の効率的な認識を促進し、こうして転移を防ぎ、寛解を促進する。本明細書に記載のがんワクチンの効力を高めるために、腫瘍抗原特異的免疫応答を高めることを目的として、免疫チェックポイント阻害剤をがんワクチンと組み合わせて使用する併用療法もまた企図される。

【０１４７】

内在性がんワクチンをin vivoで生産する方法は、本明細書に記載の標的化核酸塩基編集技術により可能となる。かかる塩基編集技術は、当技術分野で例えば以下に記載されている：米国特許第9,068,179号、米国特許出願公開US 2015/0166980、US 2015/0166981、US 2015/0166982、US20150166984、およびUS20150165054、および米国特許仮出願U.S.S.N. 62/245,828（２０１５年１０月２３日出願）；62/279,346（２０１６年１月１５日出願）；62/311,763（２０１６年３月２２日出願）；62/322178（２０１６年４月１３日出願）；62/357,352（２０１６年６月３０日出願）；62,370,700（２０１６年８月３日出願）；62/398,490（２０１６年９月２２日出願）；62/408686（２０１６年１０月１４日出願）；ＰＣＴ出願 PCT/US2016/058344（２０１６年１０月２６日出願）；米国特許出願15/311,852（２０１６年１０月２２日出願）；およびKomor et al., Nature, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, 533, 420-424 (2016)；それぞれの内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【０１４８】

免疫原性ペプチドまたはエピトープ

本開示のいくつかの側面は、腫瘍特異的抗原由来の免疫原性ペプチドまたはエピトープ、およびこれらのペプチドまたはエピトープが、いかにして腫瘍特異的免疫応答を誘導するかを提供する。腫瘍細胞で特異的に発現する、または腫瘍細胞で上方制御される、多数のタンパク質が特定されている（Hassane et al., Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition）。既知の腫瘍特異的抗原は、異なるクラスに分類される。

【０１４９】

ａ）がん精巣抗原：Ｔ細胞により認識可能なこれまでに同定された最初のＴＡＡは、このクラスに属し、元々がん精巣（ＣＴ）抗原と呼ばれたが、その理由は、組織学的に異なるヒト腫瘍、および正常組織の中では精巣の精母細胞／精原細胞のみで、および場合によっては胎盤で発現されるためである。精巣の細胞はクラスＩおよびＩＩのＨＬＡ分子を発現しないため、これらの抗原は正常組織のＴ細胞によっては認識されず、したがって免疫学的に腫瘍特異的であるとみなすことができる。ＣＴ抗原のよく知られた例は、ＭＡＧＥファミリーメンバーまたはＮＹ－ＥＳＯ－１である。

【０１５０】

ｂ）分化抗原：これらのＴＡＡは、腫瘍および腫瘍が生じる正常組織の間で共有される；ほとんどが黒色腫および正常なメラニン細胞に見られる。これらのメラニン細胞系統関連タンパク質の多くはメラニンの生合成に関与しているため、腫瘍特異的ではないが、それでもがん免疫療法に広く使用されている。例としては、限定はされないが、黒色腫についてはチロシナーゼおよびメラン－Ａ／ＭＡＲＴ－１、前立腺がんについてはＰＳＡが含まれる。

【０１５１】

ｃ）過剰発現されたＴＡＡ：広く発現されたＴＳＡをコードする遺伝子は、組織学的に異なる種類の腫瘍ならびに多くの正常組織で検出されており、一般に発現レベルが低い。正常組織によってプロセシングされ、潜在的に提示されるエピトープの多くは、Ｔ細胞認識の閾値レベルを下回っている可能性があるが、腫瘍細胞でのそれらの過剰発現は、以前に確立された寛容を破ることによって抗がん反応を引き起こす可能性がある。このクラスのＴＡＡの例は、Ｈｅｒ－２／ｎｅｕ、サバイビン、テロメラーゼおよびＷＴ１である。

【０１５２】
ｄ）腫瘍特異的抗原：これらのユニークなＴＡＡは、正常遺伝子（βカテニン、ＣＤＫ４など）の変異から生じる。これらの分子変化の一部は、腫瘍性の形質転換および／または進行に関連している。腫瘍特異的抗原は一般に、正常組織に対する自己免疫反応のリスクを負うことなく、強い免疫応答を誘導することができる。一方、これらのＴＡＡはほとんどの場合、それらが特定されたまさにその腫瘍にのみ関連しており、通常、多くの個々の腫瘍間で共有されない。
【０１５３】
ｅ）異常な翻訳後修飾から生じるＴＡＡ：かかるＴＳＡは、腫瘍において特異的でも過剰発現されてもいないが、それでもなお腫瘍で主に活性な翻訳後プロセスによって腫瘍に関連する、タンパク質から生じ得る。このクラスの例は、腫瘍内の新規エピトープ（例、ＭＵＣ１）につながる変更されたグリコシル化パターンから生じる。
【０１５４】
ｆ）腫瘍ウイルスタンパク質：これらのＴＳＡは、腫瘍形成プロセスにおいて重要な役割を果たす可能性のあるウイルスタンパク質であり、それらは（ヒト起源ではなく）外来性であるため、Ｔ細胞応答を誘導することができる。かかるタンパク質の例は、子宮頸がんで発現される、ヒト乳頭腫１６型ウイルスタンパク質、Ｅ６およびＥ７である。
【０１５５】
ＴＡＡは、腫瘍ワクチン開発の出発点である。ＴＡＡを特定して特徴付ける方法は、患者もしくは健康な対象から単離できる細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）の使用に基づくか、または、腫瘍と正常組織の間の異なる転写プロファイルもしくは異なるペプチド発現パターンの生成に基づく。
【０１５６】
いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、広範囲の異なる種類のがんで発現される。いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原は、１つまたはいくつかの種類のがんでのみ発現される。本明細書に記載の抗がん免疫応答は、抗原特異的である。したがって、腫瘍特異的抗原によって誘導される免疫応答は、その抗原が発現されるがんの種類に特異的である。免疫原性エピトープを生成するために編集することができる、非限定的な例示的腫瘍特異的抗原を、表１～３に提供する。例は例示のみを目的とするものであり、本明細書に記載の方法は、任意の腫瘍特異的抗原に適用できることが理解される。
【０１５７】
いくつかの態様において、免疫原性ペプチドまたはエピトープは、腫瘍特異的抗原の一部である。例えば、免疫原性ペプチドまたはエピトープは、５～４０アミノ酸長の腫瘍特異的抗原の一部であり得る。いくつかの態様において、免疫原性ペプチドまたはエピトープは、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、または４０アミノ酸長である。いくつかの態様において、免疫原性ペプチドまたはエピトープは、腫瘍特異的抗原の天然配列と比較して、修飾、例えばアミノ酸置換を含む（「ヘテロクリティックエピトープ」とも呼ばれる）。いくつかの態様において、免疫原性ペプチドまたはエピトープは、それが由来する腫瘍特異的抗原の天然配列と比較して、２つ以上のアミノ酸置換（例えば、２、３、４、５、またはそれ以上）を含む。いくつかの態様において、ヘテロクリティックペプチドまたはエピトープは、それが由来する天然配列と少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であってもよい。いくつかの態様において、ヘテロクリティックペプチドまたはエピトープは、それが由来する天然配列と６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％同一である。
【０１５８】
いくつかの態様において、ヘテロクリティックペプチドまたはエピトープは、その天然配列のペプチドよりも免疫原性が高い。例えば、ヘテロクリティックエピトープは、その

対応する天然ペプチドよりも少なくとも３０％免疫原性が高い（すなわち、より強い免疫応答を誘導する）可能性がある。いくつかの態様において、ヘテロクリティックエピトープは、その対応する天然ペプチドよりも少なくとも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６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０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、またはそれ以上、免疫原性が高い。

【０１５９】

いくつかの態様において、免疫原性ペプチドまたはエピトープは、クリプティックペプチドまたはエピトープであり、例えば、腫瘍特異的抗原遺伝子の非コード領域の翻訳または腫瘍特異的抗原のコード領域の異なる読み枠の翻訳から、生成される。クリプティックペプチドまたはエピトープは、腫瘍関連抗原に由来する任意の天然ペプチドよりも免疫原性が高い（すなわち、より強い免疫応答を誘導する）可能性がある。例えば、クリプティックペプチドまたはエピトープは、腫瘍関連抗原に由来する任意の天然ペプチドよりも、少なくとも３０％免疫原性が高い場合がある。いくつかの態様において、クリプティックペプチドまたはエピトープは、腫瘍関連抗原に由来する任意の天然ペプチドよりも、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６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０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、またはそれ以上、免疫原性が高い。当業者は、抗原によって誘導される免疫応答を評価する方法、例えば抗体力価を測定することに、精通している。

【０１６０】

抗原性エピトープ（例えば、ヘテロクリティックエピトープおよびクリプティックエピトープ）が由来し得る腫瘍特異的抗原は、表１～３に提供される。（ＨＬＡ－ヒト白血球抗原タイプ）

表１．腫瘍関連抗原－分化

【表１－１】

遺伝子／タンパク質	腫瘍	HLA	HLA頻度(%)	ペプチド	配列番号	位置
CEA	腸管カルチノーマ	A2	44	YLSGANLNL	340	605-613
		A2	44	IMIGVLVGV	341	691-699
		A2	44	GVLVGVALI	342	694-702
		A2	44	LLTFWNPPT	343	24-33
		A3	22	HLFGYSWYK	344	61-69
		A24	20	QYSWFVNGTF	345	268-277
		A24	20	TYACFVSNL	346	652-660
		DR3	21	AYVCGIQNSVSANRS	347	568-582
		DR4	24	DTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRV	348	116-140
		DR4	24	YSWRINGIPQQHTQV	349	625-639
		DR7	25	TYYRPGVNLSLSC	350	425-437
		DR7	25	EIIYPNASLLIQN	351	99-111
		DR9	3	YACFVSNLATGRNNS	352	653-667
		DR11	25	LWWVNNQSLPVSP	353	177-189, 355-367
		DR13	19	LWWVNNQSLPVSP	354	177-189, 355-367
		DR14	6	LWWVNNQSLPVSP	355	177-189, 355-367
		DR14	6	EIIYPNASLLIQN	356	99-111
		DR14	6	NSIVKSITVSASG	357	666-678
gp100 / Pmel17	黒色腫	A2	44	KTWGQYWQV	358	154-162
		A2	44	(A)MLGTHTMEV	359	177(8)-186
		A2	44	ITDQVPFSV	360	209-217
		A2	44	YLEPGPVTA	361	280-288
		A2	44	LLDGTATLRL	362	457-466
		A2	44	VLYRYGSFSV	363	476-485
		A2	44	SLADTNSLAV	364	570-579
		A2	44	RLMKQDFSV	365	619-627
		A2	44	RLPRIFCSC	366	639-647
		A3	22	LIYRRRLMK	367	614-622
		A3	22	ALLAVGATK	368	17-25
		A3	22	IALNFPGSQK	369	86-95
		A3	22	RSYVPLAHR	370	195-202 および 191 または 192
		A3	22	ALNFPGSQK	371	87-95
		A11	13	ALNFPGSQK	372	87-95
		A24	20	VYFFLPDHL	373	イントロン4
		A32	8	RTKQLYPEW	374	40-42 および 47-52

【表１－２】

		A68	8	HTMEVTVYHR	375	182-191
		B7	17	SSPGCQPPA	376	529-537
		B35	20	VPLDCVLYRY	377	471-480
		B35	20	LPHSSSHWL	378	630-638
		Cw8	-	SNDGPTLI	379	71-78
		DQ6	63	GRAMLGTHTMEVTVY	380	175-189
		DR4	24	WNRQLYPEWTEAQRLD	381	44-59
		DR7	25	TTEWVETTARELPIPEPE	382	420-437
		DR7	25	TGRAMLGTHTMEVTVYH	383	174-190
		DR53	49	GRAMLGTHTMEVTVY	384	175-189
マンマグロビン-A	乳がん	A3	22	PLLENVISK	385	23-31
メラン-A / MART-1	黒色腫	A2	44	(E)AAGIGILTV	386	26(27)-35
		A2	44	ILTVILGVL	387	32-40
		B35	20	EAAGIGILTV	388	26-35
		B45	2	AEEAAGIGIL(T)	389	24-33(34)
		Cw7	41	RNGYRALMDKS	390	51-61
		DP5	3	YTTAEEAAGIGILTVILGVLLLIGCW YCRR	391	21-50
		DQ6	63	EEAAGIGILTVI	392	25-36
		DR1	18	AAGIGILTVILGVL	393	27-40
		DR1	18	APPAYEKLpSAEQf	394	100-111
		DR3	21	EEAAGIGILTVI	395	25-36
		DR4	24	RNGYRALMDKSLHVGTQCALTRR	396	51-73
		DR11	25	MPREDAHFIYGYPKKGHGHS	397	1-20
		DR52	41	KNCEPVVPNAPPAYEKLSAE	398	91-110
NY-BR-1	乳がん	A2	44	SLSKILDTV	399	904-912
ERBB2	乳がん	A2	44	IVWELMTFGA	400	911-921
OA1	黒色腫	A24	20	LYSACFWWL	401	126-134
PAP	前立腺がん	A2	44	FLFLLFFWL	402	18-26
		A2	44	TLMSAMTNL	403	112-120
		A2	44	ALDVYNGLL	404	299-307
PSA	前立腺カルチノーマ	A2	44	FLTPKKLQCV	405	165-174
		A2	44	VISNDVCAQV	406	178-187
RAB38 / NY-MEL-1	黒色腫	A2	44	VLHWDPETV	407	50-58
TRP-1 / gp75	黒色腫	A31	5	MSLQRQFLR	408	alt. ORF
		DR4	24	ISPNSVFSQWRVVCDSLEDYD	409	277-297
		DR15	20	SLPYWNFATG	410	245-254
		DR17	21	SQWRVVCDSLEDYDT	411	284-298
TRP-2	黒色腫	A2	44	SVYDFFVWL	412	180-188

【表１－３】

		A2	44	TLDSQVMSL	413	360-368
		A31	5	LLGPGRPYR	414	197-205
		A33	5	LLGPGRPYR	415	197-205
		Cw8	-	ANDPIFVVL	416	387-395
		DR3	21	QCTEVRADTRPWSGP	417	60-74
		DR15	20	ALPYWNFATG	418	241-250
チロシナーゼ	黒色腫	A1	26	KCDICTDEY	419	243-251
		A1	26	SSDYVIPIGTY	420	146-156
		A2	44	MLLAVLYCL	421	1-9
		A2	44	CLLWSFQTSA	422	8-17
		A2	44	YMDGTMSQV	423	369-377
		A24	20	AFLPWHRLF	424	206-214
		A24	20	IYMDGTADFSF	425	368-373 および 336-340e
		A26	8	QCSGNFMGF	426	90-98
		B35	20	TPRLPSSADVEF	427	309-320
		B35	20	LPSSADVEF	428	312-320
		B38	5	LHHAFVDSIF	429	388-397
		B44	21	SEIWRDIDFd	430	192-200
		DR4	24	QNILLSNAPLGPQFP	431	56-70
		DR4	24	SYLQDSDPDSFQD	432	450-462
		DR15	20	FLLHHAFVDSIFEQWLQRHRP	433	386-406
WT1	精巣,卵巣,骨髄,脾臓	A1	26	TSEKRPFMCAY	434	317-327
		A24	20	CMTWNQMNL	435	235-243
		DP5	3	LSHLQMHSRKH	436	337-347
		DP5	3	KRYFKLSHLQMHSRKH	437	332-347
		DR4	24	KRYFKLSHLQMHSRKH	438	332-347
CD33	白血病	A2	44	AIISGDSPV	439	65-73

表２．腫瘍特異的抗原－腫瘍特異性

【表２－１】

遺伝子／タンパク質	HLA	HLA頻度(%)	ペプチド	配列番号	位置
BAGE-1	Cw16	7	AARAVFLAL	440	1-10
D393-CD20n	DR4	24	KPLFRRMSSLELVIA	441	28-42
サイクリン-A1	A2	44	FLDRFLSCM	442	227-235
	A2	44	SLIAAAAFCLA	443	341-351
GAGE-1,2,8	Cw6	18	YRPRPRRY	444	9-16
GAGE-3,4,5,6,7	A29	6	YYWPRPRRY	445	10-18
GnTVf	A2	44	VLPDVFIRC(V)	446	イントロン
HERV-K-MEL	A2	44	MLAVISCAV	447	1-9
KK-LC-1	B15	13	RQKRILVNL	448	76-84
KM-HN-1	A24	20	NYNNFYRFL	449	196-204
	A24	20	EYSKECLKEF	450	499-508
	A24	20	EYLSLSDKI	451	770-778
LAGE-1	A2	44	MLMAQEALAFL	452	alt. ORF (1-11)
	A2	44	SLLMWITQC	453	157-165
	A31	5	LAAQERRVPR	454	alt. ORF (18-27)
	A68	8	ELVRRILSR	455	103-111
	B7	17	APRGVRMAV	456	alt. ORF (46-54)
	DP4	75	SLLMWITQCFLPVF	457	157-170
	DR3	21	QGAMLAAQERRVPRAAEVPR	458	alt. ORF (14-33)
	DR4	24	AADHRQLQLSISSCLQQL	459	139-156
	DR11	25	CLSRRPWKRSWSAGSCPGMPHL	460	alt. ORFT (81-102)
	DR12	5	CLSRRPWKRSWSAGSCPGMPHL	461	alt. ORFT (81-102)
	DR13	19	ILSRDAAPLPRPG	462	108-120
	DR15	20	AGATGGRGPRGAGA	463	37-50
LY6K	A24	20	RYCNLEGPPI	464	119-128
	DP5	3	KWTEPYCVIAAVKIFPRFFMVAKQ	465	61-84
	DR15	20	KCCKIRYCNLEGPPINSSVF	466	114-133
MAGE-A1	A1	26	EADPTGHSY	467	161-169
	A2	44	KVLEYVIKV	468	278-286
	A3	22	SLFRAVITK	469	96-104
	A68	8	EVYDGREHSA	470	222-231

【表２－２】

	B7	17	RVRFFFPSL	471	289-298
	B35	20	EADPTGHSY	472	161-169
	B37	3	REPVTKAEML	473	120-129
	B44	21	KEADPTGHSY	474	160-169
	B53	2	DPARYEFLW	475	258-266
	B57	8	ITKKVADLVGF	476	102-112
	Cw2	10	SAFPTTINF	477	62-70
	Cw3	17	SAYGEPRKL	478	230-238
	Cw7	41	RVRFFFPSL	479	289-298
	Cw16	7	SAYGEPRKL	480	230-238
	DP4	75	TSCILESLFRAVITK	481	90-104
	DP4	75	PRALAETSYVKVLEY	482	268-282
	DR13	19	FLLLKYRAREPVTKAE	483	112-127
	DR15	20	EYVIKVSARVRF	484	281-292
MAGE-A2	A2	44	YLQLVFGIEV	485	157-166
	A24	20	EYLQLVFGI	486	156-164
	B37	3	REPVTKAEML	487	127-136
	Cw7	41	EGDCAPEEK	488	212-220
	DR13	19	LLKYRAREPVTKAE	489	121-134
MAGE-A3	A1	26	EVDPIGHLY	490	168-176
	A2	44	FLWGPRALVd	491	271-279
	A2	44	KVAELVHFL	492	112-120
	A24	20	TFPDLESEF	493	97-105
	A24	20	VAELVHFLL	494	113-121
	B18	6	MEVDPIGHLY	495	167-176
	B35	20	EVDPIGHLY	496	168-176
	B37	3	REPVTKAEML	497	127-136
	B40	6	AELVHFLLL	498	114-122
	B44	21	MEVDPIGHLY	499	167-176
	B52	5	WQYFFPVIF	500	143-151
	Cw7	41	EGDCAPEEK	501	212-220
	DP4	75	KKLLTQHFVQENYLEY	502	243-258
	DP4	75	RKVAELVHFLLLKYR	503	111-125
	DQ6	63	KKLLTQHFVQENYLEY	504	243-258
	DR1	18	ACYEFLWGPRALVETS	505	267-282
	DR4	24	RKVAELVHFLLLKYR	506	111-125
	DR4	24	VIFSKASSSLQL	507	149-160
	DR7	25	VIFSKASSSLQL	508	149-160
	DR7	25	VFGIELMEVDPIGHL	509	161-175
	DR11	25	GDNQIMPKAGLLIIV	510	191-205
	DR11	25	TSYVKVLHHMVKISG	511	281-295
	DR13	19	RKVAELVHFLLLKYRA	512	111-126
	DR13	19	FLLLKYRAREPVTKAE	513	119-134

【表２－３】

MAGE-A4	A1	26	EVDPASNTY	514	169-177
	A2	44	GVYDGREHTV	515	230-239
	A24	20	NYKRCFPVI	516	143-151
	B37	3	SESLKMIF	517	156-163
MAGE-A6	A34	1	MVKISGGPR	518	290-298
	B35	20	EVDPIGHVY	519	168-176
	B37	3	REPVTKAEML	520	127-136
	Cw7	41	EGDCAPEEK	521	212-220
	Cw16	7	ISGGPRISY	522	293-301
	DR13	19	LLKYRAREPVTKAE	523	121-134
MAGE-A9	A2	44	ALSVMGVYV	524	223-231
MAGE-A10	A2	44	GLYDGMEHLI	525	254-262
	B53	2	DPARYEFLW	526	290-298
MAGE-A12 m	A2g	44	FLWGPRALV	527	271-279
	Cw7	41	VRIGHLYIL	528	170-178
	Cw7	41	EGDCAPEEK	529	212-220
	DP4	75	REPFTKAEMLGSVIR	530	127-141
	DR13	19	AELVHFLLLKYRAR	531	114-127
MAGE-C1	A2	44	ILFGISLREV	532	959-968
	A2	44	KVVEFLAML	533	1083-1091
	DQ6	63	SSALLSIFQSSPE	534	137-149
	DQ6	63	SFSYTLLSL	535	450-458
	DR15	20	VSSFFSYTL	536	779-787
MAGE-C2	A2	44	LLFGLALIEV	537	191-200
	A2	44	ALKDVEERV	538	336-344
	B44	21	SESIKKKVL	539	307-315
	B57	8	ASSTLYLVF	540	42-50
	DR15	20	SSTLYLVFSPSSFST	541	43-57
ムチンク			PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA	542	
NA88-A	B13	6	QGQHFLQKV	543	
	A2	44	SLLMWITQC	544	157-165
NY-ESO-1 / LAGE-2	A2	44	MLMAQEALAFL	545	alt. ORF (1-11)
	A24	20	YLAMPFATPME	546	91-101
	A31	5	ASGPGGGAPR	547	53-62
	A31	5	LAAQERRVPR	548	alt. ORF (18-27)
	A68	8	TVSGNILTIR	549	127-136
	B7	17	APRGPHGGAASGL	550	60-72
	B35	20	MPFATPMEAEL	551	94-104
	B49		KEFTVSGNILTI	552	124-135
	B51	12	MPFATPMEA	553	94-102
	B52	5	FATPMEAEL	554	96-104

【表２－４】

	C12	12	FATPMEAELAR	555	96-106
	Cw3	17	LAMPFATPM	556	92-100
	Cw6	18	ARGPESRLL	557	80-88
	DP4	75	SLLMWITQCFLPVF	558	157-170
	DP4	75	LLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQ	559	87-111
	DR1	18	LLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQ	560	87-111
	DR1	18	EFYLAMPFATPM	561	89-100
	DR1	18	PGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR	562	119-143
	DR2	25	RLLEFYLAMPFA	563	86-97
	DR3	21	QGAMLAAQERRVPRAAEVPR	564	alt. ORF (14-33)
	DR4	24	PFATPMEAELARR	565	95-107
	DR4	24	PGVLLKEFTVSGNILTIRLT	566	119-138
	DR4	24	VLLKEFTVSG	567	121-130
	DR4	24	AADHRQLQLSISSCLQQL	568	139-156
	DR4	24	LLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQ	569	87-111
	DR52b	25	LKEFTVSGNILTIRL	570	123-137
	DR7	25	PGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR	571	119-143
	DR7	25	LLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQ	572	87-111
	DR8	4	KEFTVSGNILT	573	124-134
	DR9	3	LLEFYLAMPFATPM	574	87-100
	DR15	20	AGATGGRGPRGAGA	575	37-50
SAGE	A24	20	LYATVIHDI	576	715-723
Sp17	A1	26	ILDSSEEDK	577	103-111
SSX-2	A2	44	KASEKIFYV	578	41-49
	DP1	14	EKIQKAFDDIAKYFSK	579	19-34
	DR1	18	FGRLQGISPKI	580	101-111
	DR3	21	WEKMKASEKIFYVYMKRK	581	37-54
	DR4	24	KIFYVYMKRKYEAMT	582	45-59
	DR11	25	KIFYVYMKRKYEAM	583	45-58
SSX-4	DP10	2	INKTSGPKRGKHAWTHRLRE	584	151-170
	DR3	21	YFSKKEWEKMKSSEKIVYVY	585	31-50
	DR8	4	MKLNYEVMTKLGFKVTLPPF	586	51-70
	DR8	4	KHAWTHRLRERKQLVVYEEI	587	161-180
	DR11	25	LGFKVTLPPFMRSKRAADFH	588	61-80
	DR15	20	KSSEKIVYVYMKLNYEVMTK	589	41-60
	DR52	41	KHAWTHRLRERKQLVVYEEI	590	161-180
サバイビン /BIRC5	A2	44	ELTLGEFLKL	591	96-106
	A24	20	AYACNTSTL	592	イントロン B2
TAG-1	A2	44	SLGWLFLLL	593	78-86
	B8	14	LSRLSNRLL	594	42-50
TAG-2	B8	14	LSRLSNRLL	595	42-50

【表２－５】

TRAG-3	DR1	18	CEFHACWPAFTVLGE	596	34-48
	DR4	24	CEFHACWPAFTVLGE	597	34-48
	DR7	25	CEFHACWPAFTVLGE	598	34-48
TRP2-INT2g	A68	8	EVISCKLIKR	599	イントロン2
XAGE-1b/GAGED2a	A2	44	RQKKIRIQL	600	21-29
	DR4	24	HLGSRQKKIRIQLRSQ	601	17-32
	DR9	3	CATWKVICKSCISQTPG	602	33-49
BCR-ABL (b3a2)	A2	44	SSKALQRPV	603	926-934
	B8	14	GFKQSSKAL	604	922-930
	DR4	24	ATGFKQSSKALQRPVAS	605	920-936
	DR9	3	ATGFKQSSKALQRPVAS	606	920-936

表３．過剰発現した腫瘍特異的抗原

【表３－１】

遺伝子／タンパク質	正常組織発現	HLAa	HLA 頻度(%)	ペプチド	配列番号	位置
アディポフィリン	脂肪細胞, マクロファージ	A2	44	SVASTITGV	607	129-137
AIM-2	ユビキタス（低レベル）	A1	26	RSDSGQQARY	608	イントロン
ALDH1A1	粘膜, ケラチノサイト	A2	44	LLYKLADLI	609	88-96
BCLX (L)	ユビキタス（低レベル）	A2	44	YLNDHLEPWI	610	173-182
BING-4	ユビキタス（低レベル）	A2	44	CQWGRLWQL	611	ORF2
CALCA	甲状腺	A2	44	VLLQAGSLHA	612	16-25
CD45	増殖性細胞, 精巣, 複数の組織（低レベル）	A24	20	KFLDALISL	613	556-564
CD274	複数の組織（肺, 心臓, 樹状細胞, *etc.*）および IFN-γ による誘導	A2	44	LLNAFTVTV	614	15-23
CPSF	ユビキタス（低レベル）	A2	44	KVHPVIWSL	615	250-258
		A2	44	LMLQNALTTM	616	1360-1369
サイクリン D1	ユビキタス（低レベル）	A2	44	LLGATCMFV	617	101-109
		DR4	24	NPPSMVAAGSVVAAV	618	198-212
DKK1	精巣, 前立腺, 間葉系幹細胞	A2	44	ALGGHPLLGV	619	20-29
ENAH (hMena)	乳房, 前立腺間質,および結腸直腸の上皮, 膵臓, 子宮内膜	A2	44	TMNGSKSPV	620	502-510
EpCAM	上皮細胞	A24	20	RYQLDPKFI	621	173-181
EphA3	多数	DR11	25	DVTFNIICKKCG	622	356-367
EZH2	ユビキタス（低レベル）	A2	44	FMVEDETVL	623	120-128
		A2	44	FINDEIFVEL	624	165-174
		A24	20	KYDCFLHPF	625	291-299
		A24	20	KYVGIEREM	626	735-743
FGF5	脳, 腎臓	A3	22	NTYASPRFKF	627	172-176 および 217-220
グリピカン 3	胎盤および複数の組織	A2	44	FVGEFFTDV	628	144-152
		A24	20	EYILSLEEL	629	298-306
G250 / MN / CAIX	胃, 肝臓, 膵臓	A2	44	HLSTAFARV	630	254-262
HER-2 / neu	ユビキタス（低レベル）	A2	44	KIFGSLAFL	631	369-377
		A2	44	IISAVVGIL	632	654-662
		A2	44	ALCRWGLLL	633	5-13
		A2	44	ILHNGAYSL	634	435-443
		A2	44	RLLQETELV	635	689-697
		A2	44	VVLGVVFGI	636	665-673
		A2	44	YMIMVKCWMI	637	952-961

【表３－２】

		A2	44	HLYQGCQVV	638	48-56
		A2	44	YLVPQQGFFC	639	1023-1032
		A2	44	PLQPEQLQV	640	391-399
		A2	44	TLEEITGYL	641	402-410
		A2	44	ALIHHNTHL	642	466-474
		A2	44	PLTSIISAV	643	650-658
		A3	22	VLRENTSPK	644	754-762
		A24	20	TYLPTNASL	645	63-71
HLA-DOB	Bリンパ球，単球血液細胞，副腎，…	A2	44	FLLGLIFLL	646	232-240
ヘプシン	腎臓，肝臓，皮膚，…	A2	44	SLLSGDWVL	647	191-199
		A2	44	GLQLGVQAV	648	229-237
		A2	44	PLTEYIQPV	649	268-276
IDO1	リンパ節，胎盤，および炎症反応の経過における多数の細胞型	A2	44	ALLEIASCL	650	199-207
IGF2B3	ユビキタス（低レベル）	A2	44	NLSSAEVVV	651	515-523
		A3	44	RLLVPTQFV	652	199-207
IL13Ralpha2		A2	44	WLPFGFILI	653	345-353
腸のカルボキシルエステラーゼ	肝臓，腸，腎臓	B7	17	SPRWWPTCL	654	alt. ORF
α－フェトプロテイン	肝臓	A2	44	GVALQTMKQ	655	542-550
		A2	44	FMNKFIYEI	656	158-166
		DR13	19	QLAVSVILRV	657	364-373
カリクレイン４	前立腺および卵巣がん，がん	A2	44	FLGYLILGV	658	11-19
		DP4	75	SVSESDTIRSISIAS	659	125-139
		DR4	24	LLANGRMPTVLQCVN	660	155-169
		DR7	25	RMPTVLQCVNVSVVS	661	160-174
KIF20A	ユビキタス（低レベル）	A2	44	LLSDDDVVV	662	12-20
		A2	44	AQPDTAPLPV	663	284-293
		A2	44	CIAEQYHTV	664	809-817
Lengsin	眼球水晶体および，低レベルで複数組織	A2	44	FLPEFGISSA	665	270-279
M-CSF	肝臓，腎臓	B35	20	LPAVVGLSPGEQEY	666	alt. ORF
MCSP	内皮細胞，軟骨細胞，平滑筋細胞	DR11	25	VGQDVSVLFRVTGALQ	667	693-708
mdm-2	ユビキタス（脳，筋肉，肺）	A2	44	VLFYLGQY	668	53-60
Meloe	ユビキタス（低レベル）	A2	44	TLNDECWPA	669	36-44
		DQ2	41	ERISSTLNDECWPA	670	31-44
		DQ6	63	FGRLQGISPKI	671	32-44
		DR1	18	TSREQFLPSEGAA	672	11-23
		DR11	25	CPPWHPSERISSTL	673	24-37

【表３－３】

ミッドカイン	ユビキタス（低レベル）	A2	44	ALLALTSAV	674	13-21
		A2	44	AQCQETIRV	675	114-122
		DR4	24	LTLLALLALTSAVAK	676	9-23
MMP-2	ユビキタス	A2	44	GLPPDVQRVH	677	560-568
MMP-7	ユビキタス（低レベル）	A3	22	SLFPNSPKWTSK	678	96-107
MUC1	腺上皮	A2	44	STAPPVHNV	679	950-958
		A2	44	LLLLTVLTV	680	12-20
		DR3	21	PGSTAPPAHGVT	681	反復領域
MUC5AC	表面粘膜細胞，気道，および胃上皮	A24	20	TCQPTCRSL	682	716-724
p53	ユビキタス（低レベル）	A2	44	LLGRNSFEV	683	264-272
		A2	44	RMPEAAPPV	684	65-73
		B46	0.1	SQKTYQGSY	685	99-107
		DP5	3	PGTRVRAMAIYKQ	686	153-165
		DR14	6	HLIRVEGNLRVE	687	193-204
PAX5	造血系	A2	44	TLPGYPPHV	688	311-319
PBF	卵巣，膵臓，脾臓，肝臓	B55	4	CTACRWKKACQR	689	499-510
PRAME	精巣，卵巣，子宮内膜，副腎	A2	44	VLDGLDVLL	690	100-108
		A2	44	SLYSFPEPEA	691	142-151
		A2	44	ALYVDSLFFL	692	300-309
		A2	44	SLLQHLIGL	693	425-433
		A24	20	LYVDSLFFLC	694	301-309
PSMA	前立腺，CNS，肝臓	A24	20	NYARTEDFF	695	178-186
RAGE-1	網膜	A2	44	LKLSGVVRL	696	352-360
		A2	44	PLPPARNGGLG	697	32-40
		B7	17	SPSSNRIRNT	698	11-20
RGS5	心臓，骨格筋，周皮細胞	A2	44	LAALPHSCL	699	5-13
		A3	22	GLASFKSFLK	700	74-83
RhoC	ユビキタス（低レベル）	A3	22	RAGLQVRKNK	701	176-185
RNF43		A2	44	ALWPWLLMA(T)	702	11-19(20)
		A24	20	NSQPVWLCL	703	721-729
RU2AS	精巣，腎臓，膀胱	B7	17	LPRWPPPQL	704	アンチセンス
セセルニン１	ユビキタス	A2	44	KMDAEHPEL	705	196-204
SOX10	ユビキタス（低レベル）	A2	44	AWISKPPGV	706	332-340
		A2	44	SAWISKPPGV	707	331-340
STEAP1	前立腺	A2	44	MIAVFLPIV	708	292-300
		A2	44	HQQYFYKIPILVINK	709	102-116
サバイビン	ユビキタス	A2	44	ELTLGEFLKL	710	95-104
	ユビキタス	DR1	18	TLGEFLKLDRERAKN	711	97-111

【表３－４】

テロメラーゼ	精巣, 胸腺, 骨髄, リンパ節	A2	44	ILAKFLHWLE	712	540-548
		A2	44	RLVDDFLLV	713	865-873
		DR7	25	RPGLLGASVLGLDDI	714	672-686
		DR11	25	LTDLQPYMRQFVAHL	715	766-780
		hTERT(572)		WLFFYRKSV(R)	716	572-581
TPBG	複数の組織（食道, 膀胱, etc.）	A2	44	RLARLALVL	717	17-25
VEGF	ユビキタス（低レベル）	B27	7	SRFGGAVVR	718	-i
WT1	精巣, 卵巣, 骨髄, 脾臓	A1	26	TSEKRPFMCAY	719	317-327
		A24	20	CMTWNQMNL	720	235-243
		DP5	3	LSHLQMHSRKH	721	337-347
		DP5	3	KRYFKLSHLQMHSRKH	722	332-347
		DR4	24	KRYFKLSHLQMHSRKH	723	332-347

【０１６１】

ヘテロクリティックペプチドの同定は、当分野で記載されている。例えば、以前の研究（Selby, et al., J. Immunol., 162(2):669 (1999), Skipper, et al., J. Exp. Med. 183:527 (1996)、それぞれの内容全体は参照により本明細書に組み込まれる）において、ヘテロクリティックエピトープは、黒色腫細胞から天然に存在する変異ペプチドを溶出することにより、またはエピトープのほぼすべての位置での置換からなる多数のエピトープを体系的にスクリーニングすることにより、幸運にも同定された（Zaremba, et al., Cancer Research, 57:4570 (1997), Loftus, et al., Cancer Research 58:2433 (1998), Blake, et al., J. Exp. Med. 18:121 (1996)、それぞれの内容全体は参照により本明細書に組み込まれる）。代替的に、ヘテロクリティックエピトープは、ランダムなコンビナトリアルペプチドライブラリをスクリーニングすることによって同定されたが、これも多数のペプチドの困難な合成とスクリーニングを必要とした（Pinilla, et al., Current Opinion in Immunology 11:193-202 (1999)、それぞれの内容全体は参照により本明細書に組み込まれる）。ＤＮＡ発現ライブラリーのスクリーニングなどの遺伝的アプローチは、ＣＴＬエピトープおよびアナログを生成する別の方法を提供した（Boon, et al., Annu. Rev. Immunol. 12:337-65 (1994), Gavin, et al., Eur. J. Immunol. 24(9):2124-33 (1994)、それぞれの内容全体は参照により本明細書に組み込まれる）。

【０１６２】

腫瘍細胞においてがんワクチンを生成する

本開示のいくつかの側面は、腫瘍特異的抗原をコードする遺伝子をin vivo（例えば、対象における腫瘍細胞）でまたはex vivo（例えば、単離された腫瘍細胞）で編集して、腫瘍特異的抗原をコードする遺伝子に変異を導入する、システム、組成物、および方法を提供する。いくつかの態様において、かかる変異は、腫瘍特異的抗原の天然ペプチドよりも免疫原性の高いヘテロクリティックペプチドの生産をもたらす。いくつかの態様において、かかる変異は、腫瘍特異的抗原の非コード領域の翻訳をもたらし、これは、腫瘍特異的抗原からの任意の天然ペプチドよりも免疫原性の高いクリプティックペプチドをもたらす。

【０１６３】

本明細書に記載の遺伝子編集方法は、以下に記載されている核酸塩基エディターに依存する：米国特許第9,068,179号、米国特許出願公開US 2015/0166980、US 2015/0166981、US 2015/0166982、US20150166984、およびUS20150165054、および米国特許仮出願U.S.S.N. 62/245,828（２０１５年１０月２３日出願）；62/279,346（２０１６年１月１５日出願

）；62/311,763（２０１６年３月２２日出願）；62/322178（２０１６年４月１３日出願）；62/357,352（２０１６年６月３０日出願）；62,370,700（２０１６年８月３日出願）；62/398,490（２０１６年９月２２日出願）；62/408686（２０１６年１０月１４日出願）；ＰＣＴ出願 PCT/US2016/058344（２０１６年１０月２６日出願）；米国特許出願15/311,852（２０１６年１０月２２日出願）；およびKomor et al., Nature, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, 533, 420-424 (2016)；それぞれの内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【０１６４】

核酸塩基エディターは、本明細書に記載の腫瘍関連抗原遺伝子のいずれかの標的塩基を正確に編集することにおいて高度に効率的であり、ＤＮＡ二本鎖切断は、遺伝子編集のために必要ではなく、それによりゲノム不安定性を低下させ、他のゲノム編集方法により引き起こされ得る、起こり得る発がん性修飾を防止する。本明細書において記載される核酸塩基エディターは、単一の塩基を標的としてこれを修飾するようにプログラミングすることができる。いくつかの態様において、標的塩基は、シトシン（Ｃ）塩基であり、核酸塩基エディターによる脱アミノ化を介してチミン（Ｔ）塩基に変換され得る。

【０１６５】

腫瘍関連抗原をコードするポリヌクレオチドを編集するために、ポリヌクレオチドを本明細書に記載の核酸塩基エディターと接触させる。いくつかの態様において、腫瘍関連抗原をコードするポリヌクレオチドは、核酸塩基エディターおよびガイドヌクレオチド配列と接触し、ここでガイドヌクレオチド配列は、核酸塩基エディターを、腫瘍関連抗原をコードするポリヌクレオチドにおける標的塩基（例えば、Ｃ塩基）に標的化する。

【０１６６】

いくつかの態様において、腫瘍関連抗原をコードするポリヌクレオチドは、細胞（例えば、腫瘍細胞）のゲノムＤＮＡ中の腫瘍関連抗原遺伝子座である。いくつかの態様において、腫瘍細胞は培養細胞である。いくつかの態様において、腫瘍細胞はin vivoのものである。いくつかの態様において、腫瘍細胞はex vivoのものである。いくつかの態様において、腫瘍細胞は哺乳動物からのものである。いくつかの態様において、哺乳動物はヒトである。いくつかの態様において、哺乳動物はげっ歯類である。いくつかの態様において、げっ歯類はマウスである。いくつかの態様において、げっ歯類はラットである。

【０１６７】

いくつかの態様において、腫瘍関連抗原をコードするポリヌクレオチドは、コード鎖および相補鎖を含むＤＮＡ分子、例えば腫瘍細胞のゲノム中の腫瘍関連抗原遺伝子座であり得る。いくつかの態様において、腫瘍関連抗原をコードするポリヌクレオチドはまた、コード領域（例えば、エクソン）および非コード領域（例えば、イントロンまたはスプライシング部位）も含み得る。いくつかの態様において、標的塩基（例えば、Ｃ塩基）は、腫瘍関連抗原をコードするポリヌクレオチドのコード領域（例えば、エクソン）に位置する。したがって、コード領域の塩基の変換は、腫瘍関連抗原タンパク質配列のアミノ酸変化、すなわち変異をもたらし得る。所望の変異（単数または複数）を含む腫瘍関連抗原は、いったん分解されると（例えば、プロテアソームによる分解などのタンパク質分解経路のいずれかを介して）、免疫原性ヘテロクリティックエピトープをもたらす。

【０１６８】

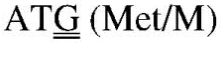
いくつかの態様において、標的塩基は、腫瘍関連抗原遺伝子の非コード領域、例えばイントロンまたはスプライス部位に位置する。いくつかの態様において、標的塩基はスプライス部位に位置し、かかる標的塩基の編集は腫瘍関連抗原ｍＲＮＡの選択的スプライシングを引き起こす。いくつかの態様において、選択的スプライシングは、腫瘍関連抗原遺伝子の非コード領域の翻訳をもたらし、クリプティックエピトープを生成する。免疫原性エピトープ（例えば、ヘテロクリティックエピトープまたはクリプティックエピトープ）は、腫瘍細胞またはプロフェッショナル抗原提示細胞によって提示され、免疫系によって認識されるため、腫瘍特異的免疫応答（例えば、Ｔ細胞応答またはＢ細胞応答）を誘導することができる。

【０１６９】
腫瘍関連抗原遺伝子を編集するために、腫瘍関連抗原遺伝子（ポリヌクレオチド分子）を核酸塩基エディターと接触させることができ、ここで核酸塩基エディターはその標的配列に結合し、所望の塩基を編集する。例えば、核酸塩基エディターは、編集が望まれる細胞（例えば、腫瘍）で発現され、核酸塩基エディターによる腫瘍関連抗原遺伝子の編集を可能にし得る。いくつかの態様において、腫瘍関連抗原遺伝子におけるその標的配列への核酸塩基エディターの結合は、ガイドヌクレオチド配列、例えば、腫瘍関連抗原遺伝子における標的配列の鎖の１つに相補的なヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子によって、媒介される。したがって、ガイドヌクレオチド配列を設計することにより、核酸塩基エディターは、任意の腫瘍関連抗原遺伝子の任意の標的塩基を編集するようにプログラムすることができる。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、編集が望まれる腫瘍細胞において、核酸塩基エディターと共発現される。いくつかの態様において、核酸塩基エディター／ｇＲＮＡ複合体は、編集が望まれる細胞（例えば、腫瘍細胞）に送達される。

【０１７０】
本明細書に提供されるのは、塩基編集およびそれらを作製するための戦略を介して生産され得る、非限定的かつ例示的なヘテロクリティックエピトープおよびクリプティックエピトープである。

【０１７１】
コドン変更
本明細書において記載される核酸塩基エディターを用いて、いくつかのアミノ酸コドンを、当該コドン中の標的塩基の脱アミノ化を介して、異なるコドンに変換することができる。例えば、いくつかの態様において、シトシン（Ｃ）塩基は、シトシンデアミナーゼドメイン（例えば、ＡＰＯＢＥＣ１またはＡＩＤ）を含む核酸塩基エディターによる脱アミノ化を介して、チミン（Ｔ）塩基に変換される。脱アミノ化（例えば、ＡＰＯＢＥＣ１またはＡＩＤなどのシトシンデアミナーゼによる）を介するＣからＴへの変更の間に、シトシンは、初めにウリジン（Ｕ）に変換され、Ｇ：Ｕミスマッチをもたらすことは、注目に値する。Ｇ：Ｕミスマッチは、次いで、ＤＮＡ修復および複製経路によりＴ：Ａ対に変換されて、それにより、元のシトシンの位置にチミンを導入する。こうして、Ｃ塩基の脱アミノ化は、Ｃ－Ｇ塩基対のＴ－Ａ塩基対による置き換えをもたらす。

【０１７２】
当業者が精通しているとおり、アミノ酸コドン中の塩基の変換は、当該コドンがコードするアミノ酸の変更をもたらし得る。シトシンデアミナーゼは、脱アミノ化を介して、シトシン（Ｃ）塩基をチミン（Ｔ）塩基に変換することができる。したがって、Ｃ塩基を含むアミノ酸コドンについて、Ｃ塩基を直接Ｔに変換することができることが想起される。例えば、ロイシンのコドン（ＣＴＣ）を、コード鎖上の第１のＣの脱アミノ化を介して、ＴＴＣ（フェニルアラニン）コドンに変換することができる。グアニン（Ｇ）塩基を含むアミノ酸コドンについて、Ｃ塩基が相補鎖上に存在する；そして、Ｇ塩基は、相補鎖上のＣの脱アミノ化を介して、アデノシン（Ａ）に変換することができる。例えば、

【化１】


コドンは、相補鎖上の第３のＣの脱アミノ化を介して、

【化２】


コドンに変換することができる。いくつかの態様において、あるコドンを異なるコドンに変換するために、２つのＣからＴへの変更が必要とされる。本開示の核酸塩基エディターにより任意の腫瘍関連抗原において作製することができる、可能な変異の非限定的な例を、表４にまとめる。

表４．塩基編集による例示的なコドンの変更
【表４－１】

標的コドン	塩基編集反応	編集されたコドン
CTT (Leu/L)	コード鎖上の第1の塩基CをTへ	TTT (Phe/F)
CTC (Leu/L)	コード鎖上の第1の塩基CをTへ	TTC (Phe/F)
ATG (Met/M)	相補鎖上の第3の塩基CをTへ	ATA (Ile/I)
GTT (Val/V)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	ATT (Ile/I)
GTA (Val/V)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	ATA (Ile/I)
GTC (Val/V)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	ATC (Ile/I)
GTG (Val/V)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	ATG (Met/M)
TCT (Ser/S)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	TTT (Phe/F)
TCC (Ser/S)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	TTC (Phe/F)
TCA (Ser/S)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	TTA (Leu/L)
TCG (Ser/S)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	TTG (Leu/L)
AGT (Ser/S)	相補鎖上の第2の塩基CをTへ	AAT (Asp/N)
AGC (Ser/S)	相補鎖上の第2の塩基CをTへ	AAC (Aps/N)
CCT (Pro/P)	コード鎖上の第1の塩基CをTへ	TCT (Ser/S)
CCC (Pro/P)	コード鎖上の第1の塩基CをTへ	TCC (Ser/S)
CCA (Pro/P)	コード鎖上の第1の塩基CをTへ	TCA (Ser/S)
CCG (Pro/P)	コード鎖上の第1の塩基CをTへ	TCG (Ser/S)
CCT (Pro/P)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	CTT (Leu/L)
CCC (Pro/P)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	CTC (Leu/L)
CCA (Pro/P)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	CTA (Leu/L)
CCG (Pro/P)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	CTG (Leu/L)
ACT (Thr/T)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	ATT (Leu/L)
ACC (Thr/T)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	ATC (Leu/L)
ACA (Thr/T)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	ATA (Leu/L)
ACG (Thr/T)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	ATG (Met/M)
GCT (Ala/A)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	GTT (Val/V)
GCC (Ala/A)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	GTC (Val/V)
GCA (Ala/A)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	GTA (Val/V)
GCG (Ala/A)	コード鎖上の第2の塩基CをTへ	GTG (Val/V)
GCT (Ala/A)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	ACT (Thr/T)
GCC (Ala/A)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	ACC (Thr/T)
GCA (Ala/A)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	ACA (Thr/T)
GCG (Ala/A)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	ACG (Thr/T)
CAT (His/H)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	TAT (Tyr/Y)
CAC (His/H)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	TAC (Tyr/Y)
GAT (Asp/D)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	AAT (Asp/N)

【表４－２】

GAC (Asp/D)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	AAC (Asp/N)
GAA (Glu/E)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	AAA (Lys/K)
GAG (Glu/E)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	AAG (Lys/K)
TGT (Cys/C)	相補鎖上の第2の塩基CをTへ	TAT (Tyr/Y)
TGC (Cys/C)	相補鎖上の第2の塩基CをTへ	TAC (Tyr/Y)
CGT (Arg/R)	コード鎖上の第1の塩基CをTへ	TGT (Cys/C)
CGC (Arg/R)	コード鎖上の第1の塩基CをTへ	TGC (Cys/C)
AGA (Arg/R)	相補鎖上の第2の塩基CをTへ	AAA (Lys/K)
AGG (Arg/R)	相補鎖上の第2の塩基CをTへ	AAG (Lys/K)
CGG (Arg/R)	相補鎖上の第2の塩基CをTへ	CAG (Gln/Q)
CGG (Arg/R)	コード鎖上の第1の塩基CをTへ	TGG (Trp/W)
GGT (Gly/G)	相補鎖上の第2の塩基CをTへ	GAT (Asp/D)
GGC (Gly/G)	相補鎖上の第2の塩基CをTへ	GAC (Asp/D)
GGA (Gly/G)	相補鎖上の第2の塩基CをTへ	GAA (Glu/E)
GGG (Gly/G)	相補鎖上の第2の塩基CをTへ	GAG (Glu/E)
GGT (Gly/G)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	AGT (Ser/S)
GGC (Gly/G)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	AGC (Ser/S)
GGA (Gly/G)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	AGA (Arg/R)
GGG (Gly/G)	相補鎖上の第1の塩基CをTへ	AGG (Arg/R)

【０１７３】

塩基編集を介して導入されるかかるアミノ酸置換は、ヘテロクリティックエピトープを生成する。腫瘍関連抗原から核酸塩基エディターによって生成され得るヘテロクリティックエピトープの非限定的な例を、表５にまとめる。

【０１７４】

いくつかの態様において、その標的配列に結合して所望の塩基を編集するために、核酸塩基エディターは、そのガイドヌクレオチド配列（例えばガイドＲＮＡ）に依存する。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列は、ｇＲＮＡ配列である。ｇＲＮＡは、典型的には、Ｃａｓ９への結合を可能にするｔｒａｃｒＲＮＡフレームワーク、および本明細書において開示される融合タンパク質に配列特異性を付与するガイド配列を含む。いくつかの態様において、ガイドＲＮＡは、構造５’－［ガイド配列］－ｇｕｕｕｕａｇａｇｃｕａｇａａａｕａｇｃａａｇｕｕａａａａｕａａａｇｇｃｕａｇｕｃｃｇｕｕａｕｃａａｃｕｕｇａａａａａｇｕｇｇｃａｃｃｇａｇｕｃｇｇｕｇｃｕｕｕｕｕ－３’（配列番号３３６）を含み、ここで、ガイド配列は、標的配列に対して相補的な配列を含む。他の適切なｔｒａｃｒＲＮＡフレームワーク配列を、表１１に提供する。ガイド配列は、典型的には、約２０ヌクレオチド長である。一定の態様において、ガイド配列は、１５～２５ヌクレオチド長であってもよい。いくつかの態様において、ガイド配列は、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチド長である。かかる好適なガイドＲＮＡ配列は、典型的には、編集されるべき標的ヌクレオチドの上流または下流５０ヌクレオチド以内（例えば、５０、４５、４０、３５、３０、３５、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、または１０以内）の核酸配列に対して相補的なガイド配列を含む。

【０１７５】

核酸塩基エディターをその標的配列に標的化して特定の変異を腫瘍関連抗原遺伝子に誘導するために使用し得るガイド配列を、表５に提供する。本明細書において提示される変異およびガイド配列は、単に説明を目的とするものであって、限定的であることを意図しないことが、理解されるべきである。

表５．ヘテロクリティックエピトープ

【表５－１】

抗原名/エピトープアミノ酸位置(例示条件)	ヘテロクリティックエピトープ(変異), ゲノム標的領域	プログラミング可能なガイド RNA 配列	配列番号	(PAM)	gRNA サイズ (C-編集)	ゲノムエディター種類[a]
gp100/209-217 (黒色腫)	IIDQVPFSV (T210I) (配列番号 786) ttcaccattaCtggtaagggtttaggaaggggca (配列番号 831)	GCCUUCACCAUUACUGGUAA CACCAUUACUGGUAAGGGUU ACCAUUACUGGUAAGGGUUU CCAUUACUGGUAAGGGUUUA AUUACUGGUAAGGGUUUAGG UUACUGGUAAGGGUUUAGGA UACUGGUAAGGGUUUAGGAA ACUGGUAAGGGUUUAGGAAG CAGCCUUCACCAUUACUGGU UUACUGGUAAGGGUUUAGGA	724 870 871 872 873 874 875 876 877 888	(GGG) (TAG) (AGG) (GGAA) (AAG) (AGG) (GGG) (GGG) (AAGGGT) (AGGGG)	20 (C14) 20 (C9) 20 (C8) 20 (C7) 20 (C5) 20 (C4) 20 (C3) 20 (C2) 20 (C16) 20 (C5)	SpBE3 SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3 SpBE3 SpBE3 SaBE3 St3BE3
gp100/280-288 (黒色腫)	YLEPGPVTV (A288V) (配列番号 818) agtcactgCccaggtggtcctgcaggctgccattcc (配列番号 832)	UCACUGCCCAGGUGGUCCUG CACUGCCCAGGUGGUCCUGC	725 889	(CAG) (AGG)	20 (C7) 20 (C6)	SpBE3 SpBE3
gp100/154-162 (黒色腫)	KIWGQYWQV (T155I) (配列番号 787) tatgtctggaagaCctggggtgaggactcccttct (配列番号 833)	AUGUCUGGAAGACCUGGGGU UGUCUGGAAGACCUGGGGUG GUCUGGAAGACCUGGGGUGA UCUGGAAGACCUGGGGUGAG	726 890 891 892	(GAG) (AGG) (GGG) (GGAC)	20 (C13) 20 (C12) 20 (C11) 20 (C10)	SpBE3 SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3
MART-1/26-35 (黒色腫)	EVAGIGILTV (A27V) (配列番号 819)	GGCCGCAGGGAUCGGCAUCC GCAGGGAUCGGCAUCCUGAU UGGUCCAGGGCCGCAGGGAU	727 893 894	(TGAT) (CGTG) (CGG)	20 (C6) 20 (C2)	VQR-SpBE3 VQR-SpBE3

【表５－２】

	tggtccagggccgCagggatcggcatcctgatcgtggtcctgggga (配列番号 834)	AGGGCCGCAGGGAUCGGCAU GCAGGGAUCGGCAUCCUGAU	895 896	(CCTGAT) (CGTGGT)	20 (C14) 20 (C8) 20 (C2)	SpBE3 KKH-SaBE3 KKH-SaBE3
NY-ESO-1/157-165 (複数の腫瘍, 例えば黒色腫および乳がん)	SLLMWITQY (C165Y) (配列番号 788) ctttccctgttgatgtggatcacgcagtGctttctgccc (配列番号 835)	ACUGCGUGAUCCACAUCAAC CACUGCGUGAUCCACAUCAA	728 897	(AGG) (CAG)	20 (C -1) 20 (C1)	SpBE3 SpBE3
TYR/369-377 (黒色腫)	YMNGIMSQV (T373I) (配列番号 789) tatgaatggaaCaatgtcccaggtacagggatctgcc (配列番号 836)	AUGGAACAAUGUCCCAGGUA UGGAACAAUGUCCCAGGUAC GGAACAAUGUCCCAGGUACA GAACAAUGUCCCAGGUACAG UGGAACAAUGUCCCAGGUAC	729 898 899 900 901	(CAG) (AGG) (GGG) (GGAT) (AGGGAT)	20 (C7) 20 (C6) 20 (C5) 20 (C4) 20 (C6)	SpBE3 SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 SaBE3
TyRP-1/240-251 (黒色腫)	DAEKYDICTDEY (C244Y) (配列番号 790) tgggactggcgggatgcagaaaagtGtgacatttgcacagatgagtacatggga (配列番号 837)	CACACUUUUCUGCAUCCCGC GUCACACUUUUCUGCAUCCC	730 902	(CAG) (GCCAGT)	20 (C3) 20 (C5)	SpBE3 KKH-SaBE3

【表５－３】

サバイビン/95-102 (複数の腫瘍. 例えば黒色腫, 乳がん, および白血病)	ELILGEFLKL (T97I) (配列番号 791) tttgaagaattaaCccttggtgaatttttgaaactggac (配列番号 838)	AUUAACCCUUGGUGAAUUUU CCUUGGUGAAUUUUUGAAAC	731 903	(TGAA) (TGG)	20 (C6) 20 (C -1)	VQR-SpBE3 SpBE3
HER2/657-666 (乳がん)	AMVGILLVVV (V658M) (配列番号 793) gcttccgccccagccctctgacgtccatcatctctgcgGtggttggcattctgctggtc (配列番号 839)	CGCAGAGAUGAUGGACGUCA ACCGCAGAGAUGAUGGACGU CCAACCACCGCAGAGAUGAU GCCAACCACCGCAGAGAUGA AAUGCCAACCACCGCAGAGA AGAAUGCCAACCACCGCAGA CCGCAGAGAUGAUGGACGUC	732 904 905 906 907 908 909	(GAG) (CAG) (GGAC) (TGG) (TGAT) (GATGAT) (AGAG)	20 (C-1) 20 (C2) 20 (C8) 20 (C9) 20 (C12) 20 (C14) 20 (C1)	VQR-SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 KKH-SaBE3 EQR-SpBE3
HER2/911-920 (乳がん)	ITWELMTFGA (T912I) (配列番号 794) aggtgtgaCtgtggggagctgatgactttggggCcaaaccttacgatgggatccagcccgggagatccct (配列番号 840)	AGGUGUGACUGUGUGGGAGC UGUGACUGUGUGGGAGCUGA UUAGGUGUGACUGUGUGGGA GUGUGGGAGCUGAUGACUUU	733 910 911 912	(TGAT) (TGAC) (GCTGAT) (TGGGG)	20 (C9) 20 (C6) 20 (C11) 20 (C-2)	VQR-SpBE3 VQR-SpBE3 KKH-SaBE3 St3BE3
HER2/911-920 (乳がん)	ITWELMTFGV (A920V) (配列番号 795) gacttttggggCc	ACUUUUGGGGCCAAACCUUA UUUGGGGCCAAACCUUACGA UUGGGGCCAAACCUUACGAU UUUGGGGCCAAACCUUACGA	734 913 914 915	(CGAT) (TGG) (GGG) (TGGGAT)	20 (C11) 20 (C8) 20 (C7) 20 (C8)	VQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3 SaBE3

【表５－４】

	aaaccttacgatgggatcccagcccgg (配列番号 841)					
hTERT/540-549 (乳がん)	ILAKFLHWLI (M549I) (配列番号) cgtgaggagatcctggccaagttcctgcactggctgatGagtgtgtacgtcgtcgagctg (配列番号 842)	CAUCAGCCAGUGCAGGAACU CACACUCAUCAGCCAGUGCA ACACACUCAUCAGCCAGUGC UACACACUCAUCAGCCAGUG GACGUACACACUCAUCAGCC GACGACGUACACACUCAUCA	735 916 917 918 919 920	(TGG) (GGAA) (AGG) (CAG) (AGTG) (GCCAGT)	20 (C1) 20 (C7) 20 (C8) 20 (C9) 20 (C12) 20 (C11)	SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 KKH-SaBE3
hTERT/572-580 (乳がん)	WLFFYRKSV (R572W) (配列番号 716) cccaagcctatcttttctgatgctCggctcttcttggtcacctctccgttcca (配列番号 843)	UUCUGAUGCUCGGCUCUUCU	736	(TGG)	20 (C11)	SpBE3
SSX2/41-49 (複数の腫瘍)	KVSEKIFYV (A42V) (配列番号 792) ggaaaagatgaaagCctcggagaaaatcttctatgtgtatatgaagagaaagtatgaggctatgact (配列番号 844)	GAAAAGAUGAAAGCCUCGGA GCCUCGGAGAAAAUCUUCUA	737 921	(GAAAAT) (TGTG)	20 (C14) 20 (C2)	KKH-SaBE3 VQR-SpBE3

【表５－５】

WT1/235-243 (白血病)	YMTWNQMNL (C235Y)(配列番号 798) atttataccaaatg acatcccagcttg aatGcatgacctg ga (配列番号 845)	CAGGUCAUGCAUUCAAGCUG CCAGGUCAUGCAUUCAAGCU UCCAGGUCAUGCAUUCAAGC GCAUUCAAGCUGGGAUGUCA UCCAGGUCAUGCAUUCAAGC	738 922 923 924 925	(GGAT) (GGG) (TGG) (TTTGGT) (TGGGAT)	20 (C10) 20 (C11) 20 (C12) 20 (C2) 20 (C12)	VQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3 KKH-SaBE3 SaBE3
WT1/235-243 (白血病)	CITWNQMNL (M236I)(配列番号 799) atttataccaaatg acatcccagcttg aatgcatGacctg gaatcagat (配列番号 846)	UGAUUCCAGGUCAUGCAUUC UCCAGGUCAUGCAUUCAAGC CAGGUCAUGCAUUCAAGCUG CCAGGUCAUGCAUUCAAGCU UCCAGGUCAUGCAUUCAAGC	739 926 927 928 929	(AAG) (TGGGAT) (GGAT) (GGG) (TGG)	20 (C12) 20 (C8) 20 (C6) 20 (C7) 20 (C8)	SpBE3 SaBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3
CD33/65-73 (白血病)	VIISGDSPV (A65V)(配列番号 796) ctggttccgggaag gagCcattatatc cagggactctcca gtg (配列番号 847)	GGGAAGGAGCCAUUAUAUCC GGAAGGAGCCAUUAUAUCCA GAAGGAGCCAUUAUAUCCAG GCCAUUAUAUCCAGGGACUC	740 930 931 932	(AGG) (GGG) (GGAC) (TCCAGT)	20 (C10) 20 (C9) 20 (C8) 20 (C2)	SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 KKH-SaBE3
EpCAM/184-192 (複数の腫瘍)	ILYENNVII (T192I)(配列番号 800) atgagaataatgtt atcaCtattgatct ggttcaaaattctt	UAAUGUUAUCACUAUUGAUC UUAUCACUAUUGAUCUGGUU AAUAAUGUUAUCACUAUUGA	741 933 934	(TGG) (CAAAAT) (TCTGGT)	20 (C12) 20 (C7) 20 (C14)	SpBE3 KKH-SaBE3 KKH-SaBE3

【表５－６】

	ctc (配列番号 848)					
CEA-CAM/24-31 (複数の腫瘍, 例えば大腸がん, 肺がん, 乳がん)	LLTFWNPPI (T314I)(配列番号 801) taaccttctggaac ccgcccaCcact gccaagctcacta ttgaatccacgcc gt (配列番号 849)	ACCACUGCCAAGCUCACUAU GGAACCCGCCCACCACUGCC ACCACUGCCAAGCUCACUAU	742 935 936	(TGA) (AAG) (TGAA)	20 (C2) 20 (C13) 20 (C2)	SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3
CEA-CAM/310-318 (複数の腫瘍, 例えば大腸がん, 肺がん, 乳がん)	RITVTTITV (T311I)(配列番号 802) gacactggcctca ataggaCcacagt cacgacgatcaca gtctatggtaagtg gatccacgaa (配列番号 850)	CCUCAAUAGGACCACAGUCA CAAUAGGACCACAGUCACGA GACCACAGUCACGACGAUCA CUCAAUAGGACCACAGUCAC AGGACCACAGUCACGACGAU	743 937 938 939 940	(CGAC) (CGAT) (CAG) (GACGAT) (CACAGT)	20 (C12) 20 (C9) 20 (C3) 20 (C11) 20 (C5)	VQR-SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 KKH-SaBE3 KKH-SaBE3
CEA-CAM/687-695 (複数の腫瘍, 例えば大腸がん, 肺がん, 乳がん)	AVVGIMIGV (T688V)(配列番号 803) tctcctggtctctc agctggggccaCt gtcggcatcatgat tggagtgctggttg gggtt (配列番号 851)	UGGGGCCACUGUCGGCAUCA GCCACUGUCGGCAUCAUGAU CCACUGUCGGCAUCAUGAUU CACUGUCGGCAUCAUGAUUG ACUGUCGGCAUCAUGAUUGG GCUGGGGCCACUGUCGGCAU GCCACUGUCGGCAUCAUGAU GCCACUGUCGGCAUCAUGAU	744 941 942 943 944 945 946 947	(TGAT) (TGG) (GGAG) (GAG) (AGTG) (CATGAT) (TGGAGT) (TGGAG)	20 (C9) 20 (C5) 20 (C4) 20 (C3) 20 (C2) 20 (C11) 20 (C5) 20 (C5)	VQR-SpBE3 SpBE3 EQR-SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 KKH-SaBE3 SaBE3 St3BE3
CEA-CAM/691-699 (複数の腫瘍, 例え	IMIGMLVGV (V695M)(配列番号 804)	UCCAAUCAUGAUGCCGACAG ACUCCAAUCAUGAUGCCGAC CACUCCAAUCAUGAUGCCGA CAGCACUCCAAUCAUGAUGC	745 948 949 950	(TGG) (AGTG) (CAG) (CGAC)	20 (C-1) 20 (C2) 20 (C3)	SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3

【表５－７】

ば大腸がん, 肺がん, 乳がん)	tctcagctggggc cactgtcggcatc atgattggaGtgct ggttggggtt (配列番号 852)	CCCAACCAGCACUCCAAUCA AGCACUCCAAUCAUGAUGCC ACCCCAACCAGCACUCCAAU	951 952 953	(TGAT) (GACAGT) (CATGAT)	20 (C6) 20 (C12) 20 (C5) 20 (C14)	VQR-SpBE3 VQR-SpBE3 KKH-SaBE3 KKH-SaBE3
MAGEA3/112-120 (複数の腫瘍)	KVAELVYFL (H118Y) (配列番号 805) aggtggccgagttg gttCattttctgct cctcaagtatcga gccagggagccgg tcac (配列番号 853)	GUUGGUUCAUUUUCUGCUCC UGGUUCAUUUUCUGCUCCUC	746 954	(TCAAGT) (AAG)	20 (C8) 20 (C6)	KKH-SaBE3 SpBE3
MAGEA3/181-190 (MAGE A1 においても) (複数の腫瘍)	YLGLSYDGLL (C181Y) (配列番号 806) ctatgtccttgtca cctGcctaggtct ctcctatgat (配列番号 854)	AGGUGACAAGGACAUAGGAG GCAGGUGACAAGGACAUAGG GGCAGGUGACAAGGACAUAG AGGCAGGUGACAAGGACAUA UAGGCAGGUGACAAGGACAU CUAGGCAGGUGACAAGGACA GAGACCUAGGCAGGUGACAA AGAGACCUAGGCAGGUGACA UAGGCAGGUGACAAGGACAU	747 955 956 957 958 959 960 961 962	(TGG) (AGTG) (GAG) (GGAG) (AGG) (TAG) (GGAC) (AGG) (AGGAGT)	20 (C-1) 20 (C2) 20 (C3) 20 (C4) 20 (C5) 20 (C6) 20 (C11) 20 (C13) 20 (C5)	SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 EQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 SaBE3
MAGEA3/181-190 (MAGE A2/A12 においても) (複数の腫瘍)	YLGLSYDGLL (C181Y) (配列番号 806) tacatccttgtcac ctGcctgggcctc tcctacgat (配列番号 855)	AGGUGACAAGGAUGUACAAG GCAGGUGACAAGGAUGUACA GGCAGGUGACAAGGAUGUAC GAGGCCCAGGCAGGUGACAA AGAGGCCCAGGCAGGUGACA CAGGCAGGUGACAAGGAUGU GAGAGGCCCAGGCAGGUGAC	748 963 964 965 966 967 968	(TGG) (AGTG) (AAG) (GGAT) (AGG) (ACAAGT) (AAGGAT)	20 (C-1) 20 (C2) 20 (C3) 20 (C11) 20 (C13) 20 (C5) 20 (C14)	SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 KKH-SaBE3 SaBE3
MAGEA3/181-190 (MAGE A3 においても)	YLGLSYDGLL (C181Y) (配列番号 806)	AGGUGGCAAAGAUGUACAAG GCAGGUGGCAAAGAUGUACA GGCAGGUGGCAAAGAUGUAC GAGGCCCAGGCAGGUGGCAA	749 969 970 971	(TGG) (AGTG) (AAG) (AGAT)	20 (C-1) 20 (C2) 20 (C3)	SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3

【表５－８】

(複数の腫瘍)	gtacatctttgcca cctGcctgggcct ctcctacga (配列番号 856)	AGAGGCCCAGGCAGGUGGCA CAGGCAGGUGGCAAAGAUGU GAGAGGCCCAGGCAGGUGGC	972 973 974	(AAG) (ACAAGT) (AAAGAT)	20 (C11) 20 (C13) 20 (C6) 20 (C12)	VQR-SpBE3 SpBE3 KKH-SaBE3 KKH-SaBE3
MAGEA3/181-190 (MAGE A4 においても) (複数の腫瘍)	YLGLSYDGLL (C181Y) (配列番号 806) tacaccttgtcac ctGcctgggcctt tcctatgat (配列番号 857)	AGGCAGGUGACAAGGGUGUA CAGGCAGGUGACAAGGGUGU CCAGGCAGGUGACAAGGGUG AGGCCCAGGCAGGUGACAAG AAGGCCCAGGCAGGUGACAA AAAGGCCCAGGCAGGUGACA GAAAGGCCCAGGCAGGUGAC CCCAGGCAGGUGACAAGGGU CAGGCAGGUGACAAGGGUGU AAGGCCCAGGCAGGUGACAA	750 975 976 977 978 979 980 981 982 983	(GGTG) (AGG) (TAG) (GGTG) (GGG) (AGG) (AAG) (GTAGGT) (AGGTG) (GGGTG)	20 (C4) 20 (C5) 20 (C6) 20 (C9) 20 (C10) 20 (C11) 20 (C12) 20 (C7) 20 (C5) 20 (C11)	VQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3 SpBE3 KKH-SaBE3 St3BE3 St3BE3
MUC-1/92-101 (複数の腫瘍)	AIWGQDVTSV (T93I) (配列番号 807) tcagctgccaCct ggggacaggatgt cacctcggtccca gtcaccaggcca (配列番号 858)	UCAGCUGCCACCUGGGGACA CUGGGGACAGGAUGUCACCU ACCUGGGGACAGGAUGUCAC	751 984 985	(GGAT) (CGG) (CTCGGT)	20 (C11) 20 (C-1) 20 (C2)	VQR-SpBE3 SpBE3 KKH-SaBE3

a)ゲノムエディター種類の略語：SpBE3 = APOBEC1-SpCas9n-UGI; VQR-SpBE3 = APOBEC1-VQR-SpCas9n-UGI; EQR-SpBE3 = APOBEC1-EQR-SpCas9n-UGI; VRER-SpBE3 = APOBEC1-VRER-SpCas9n-UGI; SaBE3 = APOBEC1-SaCas9n-UGI; KKH-SaBE3 = APOBEC1-KKH-SaCas9n-UGI; St3BE3 = APOBEC1-St3Cas9n-UGI; St1BE3 = APOBEC1-St1Cas9n-UGI。ガイド配列（核酸塩基エディターを標的配列に標的化するガイドRNAの一部）が提供される。ガイド配列は、完全ガイドRNA配列を生成することが当分野で知られている任意のtracrRNAフレームワーク配列と共に使用可能である。

【０１７６】

クリプティックエピトープ

本開示のいくつかの側面は、腫瘍細胞でクリプティックエピトープを生成するための戦略を提供する。いくつかの態様において、かかる戦略は、腫瘍関連抗原遺伝子のスプライシング部位の変更を伴う。変更されたスプライシング部位は、腫瘍関連抗原をコードするｍＲＮＡのスプライシングの変更をもたらし得る。変更されたスプライシングの１つの結果は、遺伝子の他の点では非コード領域の翻訳であり、これは他の点では「隠されたペプ

チド」、すなわちクリプティックエピトープをもたらす。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、およびイントロンアクセプター部位を含む。スプライシングのメカニズムは、当業者によく知られている。イントロンドナー部位はコンセンサス配列ＧＧＧＴＲＡＧＴを有し、イントロンドナー部位のコンセンサス配列のＧ塩基と対になっているＣ塩基は、核酸塩基エディターにより標的化され、それによってイントロンドナー部位を変更する可能性がある。ラリアット分岐点もまた、コンセンサス配列、例えばＹＴＲＡＣを有し、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得、次のエクソンのスキップにつながる可能性がある。イントロンアクセプター部位はコンセンサス配列ＹＮＣＡＧＧ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、およびイントロンアクセプター部位のコンセンサス配列のＧ塩基と対になった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得、それによりイントロンアクセプター部位を変更し、次にエクソンのスキップにつながる可能性がある。スプライシング部位を変更する一般的な戦略を、表６に示す。

表６．塩基編集を介したイントロン－エクソン接合部の例示的な変更

【表６】

標的部位	コンセンサス配列	塩基編集反応	編集された配列	結果
イントロンドナー	GGGTRAGT（例）	相補鎖上の第2または第3の塩基CをTへ	GAGTRAGT（例）	イントロン配列は、フレームの未成熟な終止コドンでエクソンとして翻訳される
ラリアット分岐点	YTRAC（例）	コード鎖上の第5の塩基CをTへ	YTRAT（例）	次のエクソンは成熟mRNAからスキップされ、これはコードフレームに影響し得る
イントロンアクセプター	Y(rich)NCAGG（例）	相補鎖上の第2から最後の塩基CをTへ	Y(rich)NCAAG（例）	エクソンは成熟mRNAからスキップされ、これはコードフレームに影響し得る
開始コドン	ATG（Met/M）	相補鎖上の第3の塩基CをTへ	ATA（Ile/I）	次のATGは開始コドンとして使用され、これはコードフレームに影響し得る

【０１７７】

本明細書に記載の塩基編集方法を使用して生産され得る非限定的な例示的クリプティックエピトープを、表７に提供する。

表７．クリプティックエピトープ

【表７－１】

抗原名および例示条件	クリプティックエピトープおよびゲノム標的領域	プログラミング可能なガイド RNA 配列	配列番号	(PAM)	gRNA サイズ (C-編集)	ゲノムエディター種類 *
gp100 (PMEL 遺伝子) (黒色腫)	VYFFLPDHL (配列番号 808) AAGCTTTGTTTATGTCTGGAAGACCTGGGgtgagggactcccttctcagcctatcatccacac (配列番号 859) イントロン 4,イントロンドナー部位	UCCCUCACCCCAGGUCUUCC GUCCCUCACCCCAGGUCUUC AGAAGGGAGUCCCUCACCCC UGUCUGGAAGACCUGGGGUG GUCUGGAAGACCUGGGGUGA AUGUCUGGAAGACCUGGGGU GAGAAGGGAGUCCCUCACCC	752 986 987 988 989 990 991	(AGAC) (CAG) (AGG) (AGG) (GGG) (GAG) (CAG)	20 (C9) 20 (C9/10) 20 (n.a.) 20 (n.a.) 20 (n.a.) 20 (n.a.) 20 (n.a.)	VQR-SpBE3 SpBE3 WT Cas9 WT Cas9 WT Cas9 WT Cas9 WT Cas9
gp100 (PMEL 遺伝子) (黒色腫)	VYFFLPDHL (配列番号 808) ccaaaaacttcagGCCAATACTGGCAAGTTCT (配列番号 860) イントロン 4,イントロンアクセプター部位	CCUGAAGUUUUUGGAAUGAA UUGGCCUGAAGUUUUUGGAA AGUAUUGGCCUGAAGUUUUU CAGUAUUGGCCUGAAGUUUU CAGUAUUGGCCUGAAGUUUU CUUUUCAUUCCAAAAACUUC AACUUGCCAGUAUUGGCCUG GCUUUUCAUUCCAAAAACUU	753 992 993 994 995 996 997 998	(AAG) (TGAA) (GGAA) (TGG) (TGGAAT) (AGG) (AAG) (CAG)	20 (C1/2) 20 (C4/5) 20 (C9/10) 20 (C10/11) 20 (C10/11) 20 (n.a.) 20 (n.a.) 20 (n.a.)	SpBE3 VQR-SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 SaBE3 WT Cas9 WT Cas9 WT Cas9
TYRP1 (黒色腫)	MSLQRQFLR (配列番号 809) gcactcttatttcaagcagaatGagtgctcctaa (配列番号 861) ORF1,標的開始コドン	CUCAUUCUGCUUGAAAUAAG ACUCAUUCUGCUUGAAAUAA GCACUCAUUCUGCUUGAAAU UUAGGAGCACUCAUUCUGCU GCACUCAUUCUGCUUGAAAU UUAGGAGCACUCAUUCUGCU CACUCAUUCUGCUUGAAAUA ACUCUUAUUUCAAGCAGAAU	754 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005	(AGTG) (GAG) (AAG) (TGAA) (AAGAGT) (TGAAAT) (AGAG) (GAG)	20 (C3) 20 (C4) 20 (C6) 20 (C11) 20 (C6) 20 (C11) 20 (C5) 20 (n.a.)	VQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 SaBE3 KKH-SaBE3 EQR-SpBE3 WT Cas9
MGAT5	VLPDVFIRCV (配列	UGUAAGACAGAAAACCACAC	755	(AGCG)	20 (C-1)	VRER-SpBE3

【表７－２】

(黒色腫)	番号 810) tcatacgctgtgtggttttctgtcttacagTTGTTTGTTGGACTTGGGTTC (配列番号 862) 標的イントロン 2-エキソン 3 接合部,イントロン 2 の最後の塩基	CUGUAAGACAGAAAACCACA CAAGUCCAACAAACAACUGU UCUGUCUUACAGUUGUUUGU	1006 1007 1008	(CAG) (AAG) (TGG)	20 (C1) 20 (n.a.) 20 (n.a.)	SpBE3 WT Cas9 WT Cas9
LAGE-1 (複数の腫瘍,例えば黒色腫および乳がん)	MLMAQEALAFL (配列番号 811) LAAQERRVPR (配列番号 812) APRGVRMAV (配列番号 813) QGAMLAAQERRVPRAAEVPR (配列番号 814) CLSRRPWKRSWSAGSCPGMPHL (配列番号 815) tctctgagagccgggcagaggctccggagccatGcaggccgaaggc (配列番号 863) 標的 OFR1 開始部位	CUUCGGCCUGCAUGGCUCCG AUGGCUCCGGAGCCUCUGCC GCCUUCGGCCUGCAUGGCUC CCUUCGGCCUGCAUGGCUCC CAGAGGCUCCGGAGCCAUGC GCAGAGGCUCCGGAGCCAUG GCCUUCGGCCUGCAUGGCUC	756 1009 1010 1011 1012 1013 1014	(GAG) (CGG) (CGG) (GGAG) (AGG) (CAG) (CGG)	20 (C11) 20 (C -1) 20 (C13) 20 (C12) 20 (n.a.) 20 (n.a.) 20 (n.a.)	SpBE3 SpBE3 SpBE3 EQR-SpBE3 WT Cas9 WT Cas9 WT Cas9
TRP-2	EVISCKLIKR (配列番号 816)	CCUAAUAAUGUAUCUCUAAC ACCUAAUAAUGUAUCUCUAA	757 1015	(AGAA) (CAG)	20 (C1/2) 20 (C2/3)	VQR-SpBE3 SpBE3

【表７－３】

(黒色腫)	TATTCTGTTAGAGA TACATTATTAGgtgg gttttttcc (配列番号 864) 標的イントロン２ドナー部位	ACCUAAUAAUGUAUCUCUAA CACCUAAUAAUGUAUCUCUA UUAGAGAUACAUUAUUAGGU GUUAGAGAUACAUUAUUAGG	1016 1017 1018 1019	(CAGAAT) (ACAGAAT) (GGG) (TGG)	20 (C2/3) 20 (C3/4) 20 (n.a.) 20 (n.a.)	SaBE3 St1BE3 WT Cas9 WT Cas9
TRP-2 (黒色腫)	EVISCKLIKR (配列番号 816) tatgtttcccaattgtttca gGACCAGGACGCC CCT (配列番号 865) 標的イントロン２アクセプター部位	UCCUGGUCCUGAAACAAUUG GUCCUGGUCCUGAAACAAUU CGUCCUGGUCCUGAAACAAU UUUCCCAAUUGUUUCAGGAC UUCCCAAUUGUUUCAGGACC	758 1020 1021 1022 1023	(GGAA) (GGG) (TGG) (CAG) (AGG)	20 (C8/9) 20 (C9/10) 20 (C10/11) 20 (n.a.) 20 (n.a.)	VQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3 WT Cas9 WT Cas9
BIRC5/サバイビン (複数の腫瘍,例えば黒色腫, 乳がん, および白血病)	AYACNTSTL (配列番号 817) agtggactgccgctttaat cccttCaGctgcctttcc gctgtt (配列番号 866) 標的イントロン２スプライソソーム分岐部位	AGCUGAAGGGAUUAAAGCGG GGCAGCUGAAGGGAUUAAAG AAGGCAGCUGAAGGGAUUAA AAAGGCAGCUGAAGGGAUUA GCAGCUGAAGGGAUUAAAGC GACUGCCGCUUUAAUCCCUU CUGCCGCUUUAAUCCCUUCA	759 1024 1025 1026 1027 1028 1029	(CAG) (CGG) (AGCG) (AAG) (GGCAGT) (CAG) (GCT)	20 (C3) 20 (C6) 20 (C8) 20 (C9) 20 (C5) 20 (n.a.) 20 (n.a.)	SpBE3 SpBE3 VRER-SpBE3 SpBE3 KKH-SaBE3 WT Cas9 WT Cas9
BIRC5/サバイビン (複数の腫瘍,例えば黒色腫, 乳がん, および白血病)	AYACNTSTL (配列番号 817) tccgctgttgttttgattttt ctagAGAGGAACAT AA (配列番号 867) 標的イントロン２アクセプター部位	UCUAGAAAAAUCAAAACAAC CUCUAGAAAAAUCAAAACAA GAACAUAAAAAGCAUUCGUC	760 1030 1031	(AGCG) (CAG) (CGG)	20 (C2) 20 (C3) 20 (n.a.)	VRER-SpBE3 SpBE3 WT Cas9

【表７－４】

Bcr-Abl-OOF (白血病)	SSKALQRPV (配列番号 603) GFKQSSKAL (配列番号 604) ATGFKQSSKALQRP VAS (配列番号 605) ATGFKQSSKALQRP VAS (配列番号 606) tccccctttctcttccag AAGCCCTTCAGC (配列番号 868) 標的イントロン１アクセプター部位	UGGAAGAGAAAGGGGGGAAC CUGGAAGAGAAAGGGGGGAA GCUUCUGGAAGAGAAAGGGG GGCUUCUGGAAGAGAAAGGG GGGCUUCUGGAAGAGAAAGG AGGGCUUCUGGAAGAGAAAG AAGGGCUUCUGGAAGAGAAA GAAGGGCUUCUGGAAGAGAA UGAAGGGCUUCUGGAAGAGA UCUGGAAGAGAAAGGGGGGA AGGGCUUCUGGAAGAGAAAG AAGGGCUUCUGGAAGAGAAA GAAGGGCUUCUGGAAGAGAA UUCCCCCCUUUCUCUUCCAG CUGUUCCCCCCUUUCUCUUC	761 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045	(AGAA) (CAG) (GGAA) (GGG) (GGG) (GGG) (GGG) (AGG) (AAG) (ACAGAAA) (GGGGG) (GGGGG) (AGGGG) (AAG) (CAG)	20 (C-1) 20 (C1) 20 (C5) 20 (C6) 20 (C7) 20 (C8) 20 (C9) 20 (C10) 20 (C11) 20 (C2) 20 (C8) 20 (C9) 20 (C10) 20 (n.a.) 20 (n.a.)	VQR-SpBE3 SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3 SpBE3 SpBE3 SpBE3 SpBE3 St1BE3 St3BE3 St3BE3 St3BE3 WT Cas9 WT Cas9
Bcr-Abl-OOF (白血病)	SSKALQRPV (配列番号 603) GFKQSSKAL (配列番号 604) ATGFKQSSKALQRP VAS (配列番号 605) ATGFKQSSKALQRP VAS (配列番号 606) tcctttcttctcagGTGA AAAGCTCCGGGTC T (配列番号 869) 標的イントロン２アクセプター部位	UGAGAAGAAAGGAACCAAAU GCUUUUCACCUGAGAAGAAA AGCUUUUCACCUGAGAAGAA GAGCUUUUCACCUGAGAAGA UUCACCUGAGAAGAAAGGAA CCGGAGCUUUUCACCUGAGA CCCGGAGCUUUUCACCUGAG ACCCGGAGCUUUUCACCUGA CACCUGAGAAGAAAGGAACC GAUUUGGUUCCUUUCUUCUC UUCCUUUCUUCUCAGGUGAA UGAUUUGGUUCCUUUCUUCU	762 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056	(CAG) (GGAA) (AGG) (AAG) (CCAAAT) (AGA) (AAG) (GAAGAA) (AAATC) (AGG) (AAG) (CAG)	20 (C-1) 20 (C9/10) 20 (C10/11) 20 (C11/12) 20 (C5/6) 20 (C7/8) 20 (C6/7) 20 (C8/9) 20 (C6/7) 20 (n.a.) 20 (n.a.) 20 (n.a.)	SpBE3 VQR-SpBE3 SpBE3 SpBE3 KKH-SaBE3 SpBE3 SpBE3 KKH-SaBE3 St3BE3 WT Cas9 WT Cas9 WT Cas9

a)ゲノムーエディター種類の略語：SpBE3 = APOBEC1-SpCas9n-UGI; VQR-SpBE3 = APOBEC1-VQR-SpCas9n-UGI; EQR-SpBE3 = APOBEC1-EQR-SpCas9n-UGI; VRER-SpBE3 = APOBEC1-VRER-SpCas9n-UGI; SaBE3 = APOBEC1-SaCas9n-UGI; KKH-SaBE3 = APOBEC1-KKH-SaCas9n-UGI; St3BE3 = APOBEC1-St3Cas9n-UGI; St1BE3 = APOBEC1-St1Cas9n-UGI。ガイド配列（核酸塩基エディターを標的配列に標的化するガイド RNA の一部）が提供される。ガイド配列は、完全ガイド RNA 配列を生成することが当分野で知られている任意のtracrRNAフレームワーク配列と共に使用可能である。

【０１７８】

いくつかの態様において、核酸塩基エディターを使用して、未成熟な終止コドン（正常

終止コドンの上流に存在する終止コドン）を腫瘍特異的抗原遺伝子（例えば、ＴＡＡ、ＴＡＧ、およびＴＧＡ）に導入することができる。いくつかの態様において、未成熟な終止コドンの導入は、腫瘍特異的抗原を不安定化する。いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原の不安定化は、免疫原性エピトープ（例えば、ヘテロクリティックエピトープまたはクリプティックエピトープ）の増強された提示をもたらす。

【０１７９】

未成熟な終止コドンは、標的残基をコードする標的コドンの１つ以上の塩基を変更することにより導入される。例えば、シトシンデアミナーゼドメインを含む核酸塩基エディターは、脱アミノ化を介して、シトシン（Ｃ）塩基をチミン（Ｔ）塩基に変換することができる。したがって、Ｃ塩基を含むアミノ酸コドンについて、Ｃ塩基をＴに変換し得ることが想起される。例えば、ＣＡＧ（Ｇｌｎ／Ｑ）コドンを、コード鎖上の第１のＣの脱アミノ化を介して、ＴＡＧ（アンバー）コドンに変更することができる。グアニン（Ｇ）塩基を含むセンスコドンについて、Ｃ塩基が相補鎖上に存在する；そして、Ｇ塩基は、相補鎖上のＣの脱アミノ化を介して、アデノシン（Ａ）に変換することができる。例えば、ＴＧＧ（Ｔｒｐ／Ｗ）コドンを、相補鎖上の第２のＣの脱アミノ化を介して、ＴＡＧ（アンバー）コドンに変換することができる。いくつかの態様において、コドンをナンセンスコドンに変換するために、ＣからＴへの２つの変更が必要とされる。例えば、ＣＧＧ（Ｒ）コドンは、コード鎖上の第１のＣの脱アミノ化および相補鎖上の第２のＣの脱アミノ化を介して、ＴＡＧ（アンバー）コドンに変換される。

【０１８０】

いくつかの態様において、標的残基は、腫瘍特異的抗原の柔軟なループ領域に位置する。いくつかの態様において、タンデムな未成熟の終止コドンが導入される。塩基編集を介して終止コドンに変更し得るコドンの非限定的な例を、表８に示す。

表８．終止コドンへの変換

【表８】

標的コドン	塩基編集プロセス	編集されたコドン
CAG (Gln/Q)	コード鎖上の第1の塩基ＣをＴへ	TAG (アンバー)
TGG (Trp/W)	相補鎖上の第2の塩基ＣをＴへ	TAG (アンバー)
CGA (Arg/R)	コード鎖上の第1の塩基ＣをＴへ	TGA (オパール)
CAA (Gln/Q)	コード鎖上の第1の塩基ＣをＴへ	TAA (オーカー)
TGG (Trp/W)	相補鎖上の第3の塩基ＣをＴへ	TGA (オパール)
CGG (Arg/R)	コード鎖上の第1の塩基ＣをＴへ、および相補鎖上の第2の塩基ＣをＴへ	TAG (アンバー)
CGA (Arg/R)	コード鎖上の第1の塩基ＣをＴへ、および相補鎖上の第2の塩基ＣをＴへ	TAA (オーカー)

一重下線: コード鎖上での変化
二重下線: 相補鎖上での変化

【０１８１】

いくつかの態様において、クリプティックエピトープは、腫瘍特異的抗原遺伝子のコードフレームをシフトすることにより生成される。いくつかの態様において、コードフレームは、開始コドン（ＡＴＧ）を開始コドンとして使用できないセンスコドンに変更することにより、シフトされる。そのため、翻訳はコーディング領域の次の開始コドンから開始され、コードフレームがシフトされ得る。いくつかの態様において、正常なセンスコドンを編集して開始コドンを生成し、新たに生成された開始コドンから翻訳を開始することができ、これはコードフレームのシフトにもつながり得る。開始コドンの変更と、結果とし

て生じるコードフレームのシフトにより、腫瘍特異的抗原遺伝子からそれ以外では生成されないペプチド（すなわち、クリプティックエピトープ）が生成される。本明細書に記載の核酸塩基エディターによって達成され得る非限定的かつ例示的な開始コドンの変更は、表９に提供される。

表９．塩基編集を介した開始コドンの変更

【表９】

標的コドン	塩基編集プロセス	編集されたコドン
コグネイト開始コドン ATG (Met/M)	相補鎖上の第3の塩基ＣをＴへ	ATA (Ile/I, 次の ATG を開始コドンとして使用)
ACG (Thr/T)	コード鎖上の第2の塩基ＣをＴへ	ATG (Met/M)
GTG (Val/V)	相補鎖上の第1の塩基ＣをＴへ	ATG (Met/M)
GCG (Ala/A)	相補鎖上の第1の塩基ＣをＴへ、およびコード鎖上の第2の塩基ＣをＴへ	ATG (Met/M)

【０１８２】

表５および表６に列挙された腫瘍関連抗原、ならびにそれらのそれぞれの遺伝子配列およびタンパク質配列は、当技術分野で知られている。リストされた腫瘍特異的抗原のアミノ酸配列は、表１０に列挙されている。

表１０．ヒト腫瘍特異的抗原のアミノ酸配列

【表１０－１】

腫瘍関連抗原名	アミノ酸配列	配列番号
メラノサイトタンパク質 PMEL (gp100)	MDLVLKRCLLHLAVIGALLAVGATKVPRNQDWLGVSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQRLDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPGSQKVLPDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQPVYPQETDDACIFPDGGPCPSGSWSQKRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGTHTMEVTVYHRRGSRSYVPLAHSSSAFTITDQVPFSVSVSQLRALDGGNKHFLRNQPLTFALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVPGTTDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPTAEPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGLPKEACMEISSPGCQPPAQRLCQPVLPSPACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPLIVGILLVLMAVVLASLIYRRRLMKQDFSVPQLPHSSSHWLRLPRIFCSCPIGENSPLLSGQQv	763
T細胞1により認識される黒色腫抗	MPREDAHFIYGYPKKGHGHSYTTAEEAAGIGILTVILGVLLLIGCWYCRRRNGYRALMDKSLHVGTQCALTRRCPQEGFDHRDSKVSLQEKNCEPVVPNAPPAYEKLSAEQSPPPYSP	764

【表１０－２】

原(MLANA/MART-1)		
5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸オキシダーゼ(TYRP1)	MSAPKLLSLGCIFFPLLLFQQARAQFPRQCATVEALRSGMCCPDLSPVSGPGTDRC GSSSGRGRCEAVTADSRPHSPQYPHDGRDDREVWPLRFFNRTCHCNGNFSGHNCG TCRPGWRGAACDQRVLIVRRNLLDLSKEEKNHFVRALDMAKRTTHPLFVIATRRSEEI LGPDGNTPQFENISIYNYFVWTHYYSVKKTFLGVGQESFGEVDFSHEGPAFLTWHRY HLLRLEKDMQEMLQEPSFSLPYWNFATGKNVCDICTDDLMGSRSNFDSTLISPNSVF SQWRVVCDSLEDYDTLGTLCNSTEDGPIRRNPAGNVARPMVQRLPEPQDVAQCLEV GLFDTPPFYSNSTNSFRNTVEGYSDPTGKYDPAVRSLHNLAHLFLNGTGGQTHLSP NDPIFVLLHTFTDAVFDEWLRRYNADISTFPLENAPIGHNRQYNMVPFWPPVTNTEMF VTAPDNLGYTYEIQWPSREFSVPEIIAIAVVGALLLVALIFGTASYLIRARRSMDEANQP LLTDQYQCYAEEYEKLQNPNQSVV	765
α-1,6-マンノシル糖たんぱく質 6-β-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ A (MGAT5)	MALFTPWKLSSQKLGFFLVTFGFIWGMMLLHFTIQQRTQPESSSMLREQILDLSKRYI KALAEENRNVVDGPYAGVMTAYDLKKTLAVLLDNILQRIGKLESKVDNLVVNGTGTN STNSTTAVPSLVALEKINVADIINGAQEKCVLPPMDGYPHCEGKIKWMKDMWRSDPC YADYGVDGSTCSFFIYLSEVENWCPHLPWRAKNPYEEADHNSLAEIRTDFNILYSMMK KHEEFRWMRLRIRRMADAWIQAIKSLAEKQNLEKRKRKKVLVHLGLLTKESGFKIAETA FSGGPLGELVQWSDLITSLYLLGHDIRISASLAELKEIMKKVVGNRSGCPTVGDRIVELI YIDIVGLAQFKKTLGPSWVHYQCMLRVLDSFGTEPEFNHANYAQSKGHKTPWGKWN LNPQQFYTMFPHTPDNSFLGFVVEQHLNSSDIHHINEIKRQNQSLVYGKVDSFWKNK KIYLDIIHTYMEVHATVYGSSTKNIPSYVKNHGILSGRDLQFLLRETKLFVGLGFPYEGP APLEAIANGCAFLNPKFNPPKSSKNTDFFIGKPTLRELTSQHPYAEVFIGRPHVWTVD LNNQEEVEDAVKAILNQKIEPYMPYEFTCEGMLQRINAFIEKQDFCHGQVMWPPLSAL QVKLAEPGQSCKQVCQESQLICEPSFFQHLNKDKDMLKYKVTCQSSELAKDILVPSF DPKNKHCVFQGDLLLFSCAGAHPRHQRVCPCRDFIKGQVALCKDCL	766
がん/精巣抗原 1 (CTAG1; LAGE2/NY-ESO-1)	MQAEGRGTGGSTGDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGEAGATGGRGPRGAGAARAS GPGGGAPRGPHGGAASGLNGCCRCGARGPESRLLEFYLAMPFATPMEAELARRSL AQDAPPLPVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHRQLQLSISSCLQQLSLLMWITQCFL PVFLAQPPSGQRR	767
黒色腫の CTL 認識抗原(CAMEL)	MLMAQEALAFLMAQGAMLAAQERRVPRAAEVPGAQGQQGPRGREEAPRGVRMAV PLLRRMEGAPAGPGGRTAACFSCTSRCLSRRPWKRSWSAGSCPGMPHLSPDQGRF	768
L-ドパクロムタウトメラーゼ(DCT)	MSPLWWGFLLSCLGCKILPGAQGQFPRVCMTVDSLVNKECCPRLGAESANVCGSQ QGRGQCTEVRADTRPWSGPYILRNQDDRELWPRKFFHRTCKCTGNFAGYNCGDCK FGWTGPNCERKKPPVIRQNIHSLSPQEREQFLGALDLAKKRVHPDYVITTQHWLGLL GPNGTQPQFANCSVYDFFVWLHYYSVRDTLLGPGRPYRAIDFSHQGPAFVTWHRYH LLCLERDLQRLIGNESFALPYWNFATGRNECDVCTDQLFGAARPDDPTLISRNSRFS SWETVCDSLDDYNHLVTLCNGTYEGLLRRNQMGRNSMKLPTLKDIRDCLSLQKFDN PPFFQNSTFSFRNALEGFDKADGTLDSQVMSLHNLVHSFLNGTNALPHSAANDPIFV VLHSFTDAIFDEWMKRFNPPADAWPQELAPIGHNRMYNMVPFFPPVTNEELFLTSDQ LGYSYAIDLPVSVEETPGWPTTLLVVMGTLVALVGLFVLLAFLQYRRLRKGYTPLME THLSSKRYTEEA	769
チロシナーゼ (TYR)	MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDRSPCGQLSGRGSC QNILLSNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVFYNRTCQCSGNFMGFNCGNCKFGFWGP NCTERRLLVRRNIFDLSAPEKDKFFAYLTLAKHTISSDYVIPIGTYGQMKNGSTPMFND INIYDLFVWMHYYVSMDALLGGSEIWRDIDFAHEAPAFLPWHRLFLLRWEQEIQKLTGD ENFTIPYWDWRDAEKCDICTDEYMGGQHPTNPNLLSPASFFSSWQIVCSRLEEYNSH QSLCNGTPEGPLRRNPGNHDKSRTPRLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDKAANFSFR NTLEGFASPLTGIADASQSSMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLLHHAFVDSIFEQ WLRRHRPLQEVYPEANAPIGHNRESYMVPFIPLYRNGDFFISSKDLGYDYSYLQDSDP	770

【表１０－３】

	DSFQDYIKSYLEQASRIWSWLLGAAMVGAVLTALLAGLVSLLCRHKRKQLPEEKQPL LMEKEDYHSLYQSHL	
バキュロウイルス IAP リピート含有タンパク質 5 (BIRC5)	MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQC FFCFKELEGWEPDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKLDRERAKNKIAK ETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMD	771
受容体型チロシンタンパク質キナーゼ erbB-2 (ERBB2/HER2)	MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVV QGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYAL AVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDI FHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARC KGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMP NPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCA RVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQ LQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGL RSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACH QLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPEC QPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGA CQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQK IRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIW IPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVT QLMPYGCLLDHVRENRGRLGSQDLLNWCMQIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVK SPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTV WELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRE LVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQ QGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAG SDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPE YVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENP EYLTPQGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLG LDVPV	772
骨髄細胞表面抗原 CD33	MPLLLLLPLLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKNSPVH GYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNG SYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQ GTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQL NVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRR KAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKKSKLHGPTETSSCSGAAPTVEMDEELHYASL NFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ	773
テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT)	MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCL VCVPWDARPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGP PEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCA YQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGAR RRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPAR PAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLY SSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMR PLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEEDTDPR RLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERRFLRNTKKFISLGKHAKL SLQELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSF FYVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLT SRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLL GASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKP QNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAV VIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVV	774

【表１０－４】

	NFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNR GFKAGRNMRRKLFGVLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLLQAYRFHACVLQLP FHQQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQ AFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD	
タンパク質 SSX2	MNGDDAFARRPTVGAQIPEKIQKAFDDIAKYFSKEEWEKMKASEKIFYVYMKRKYEAM TKLGFKATLPPFMCNKRAEDFQGNDLDNDPNRGNQVERPQMTFGRLQGISPKIMPK KPAEEGNDSEEVPEASGPQNDGKELCPPGKPTTSEKIHERSGPKRGEHAWTHRLRE RKQLVIYEEISDPEEDDE	775
ウィルムス腫瘍タンパク質(WT1)	MGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGGCALPVSGAAQWAPVLDFAPPGASAYGSLGGPA PPPAPPPPPPPPPHSFIKQEPSWGGAEPHEEQCLSAFTVHFSGQFTGTAGACRYGP FGPPPPSQASSGQARMFPNAPYLPSCLESQPAIRNQGYSTVTFDGTPSYGHTPSHH AAQFPNHSFKHEDPMGQQGSLGEQQYSVPPPVYGCHTPTDSCTGSQALLLRTPYS SDNLYQMTSQLECMTWNQMNLGATLKGVAAGSSSSVKWTEGQSNHSTGYESDNHT TPILCGAQYRIHTHGVFRGIQDVRRVPGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRY FKLSHLQMHSRKHTGEKPYQCDFKDCERRFSRSDQLKRHQRRHTGVKPFQCKTCQ RKFSRSDHLKTHTRTHTGKTSEKPFSCRWPSCQKKFARSDELVRHHNMHQRNMTKL QLAL	776
精子関連抗原 11A (SPAG11A)	MRQRLLPSVTSLLLVALLFPGSSQARHVNHSATEALGELRERAPGQGTNGFQLLRH AVKRDLLPPRTPPYQVHISHQEARGPSFKICVGFLGPRWARGCSTGNEKYHLPYAAR DLQTFFLPFW	777
BCR/ABL 融合タンパク質アイソフォーム X3	MVDPVGFAEAWKAQFPDSEPPRMELRSVGDIEQELERCKASIRRLEQEVNQERFRMI YLQTLLAKEKKSYDRQRWGFRRAAQAPDGASEPRASASRPQPAPADGADPPPAEE PEARPDGEGSPGKARPGTARRPGAAASGERDDRGPPASVAALRSNFERIRKGHGQP GADAEKPFYVNVEFHHERGLVKVNDKEVSDRISSLGSQAMQMERKKSQHGAGSSVG DASRPPYRGRSSESSCGVDGDYEDAELNPRFLKDNLIDANGGSRPPWPPLEYQPYQ SIYVGGMMEGEGKGPLLRSQSTSEQEKRLTWPRRSYSPRSFEDCGGGYTPDCSSNE NLTSSEEDFSSGQSSRVSPSPTTYRMFRDKSRSPSQNSQQSFDSSSPPTPQCHKRH RHCPVVVSEATIVGVRKTGQIWPNDGEGAFHGDADGSFGTPPGYGCAADRAEEQRR HQDGLPYIDDSPSSSPHLSSKGRGSRDALVSGALESTKASELDLEKGLEMRKWVLSG ILASEETYLSHLEALLLPMKPLKAAATTSQPVLTSQQIETIFFKVPELYEIHKEFYDGLF PRVQQWSHQQRVGDLFQKLASQLGVYRVLGYNHNGEWCEAQTKNGQGWVPSNYIT PVNSLEKHSWYHGPVSRNAAEYLLSSGINGSFLVRESESSPGQRSISLRYEGRVYHY RINTASDGKLYVSSESRFNTLAELVHHHSTVADGLITTLHYPAPKRNKPTVYGVSPNY DKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFLKEAA VMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGNLLDYLRECNRQEVNAVVLLYMATQ ISSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIK WTAPESLAYNKFSIKSDVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYELLEKDYRMERPE GCPEKVYELMRACWQWNPSDRPSFAEIHQAFETMFQESSISDEVEKELGKQGVRGA VSTLLQAPELPTKTRTSRRAAEHRDTTDVPEMPHSKGQGESDPLDHEPAVSPLLPR KERGPPEGGLNEDERLLPKDKKTNLFSALIKKKKKTAPTPPKRSSSFREMDGQPERR GAGEEEGRDISNGALAFTPLDTADPAKSPKPSNGAGVPNGALRESGGSGFRSPHLW KKSSTLTSSRLATGEEEGGGSSSKRFLRSCSASCVPHGAKDTEWRSVTLPRDLQST GRQFDSSTFGGHKSEKPALPRKRAGENRSDQVTRGTVTPPPRLVKKNEEAADEVFK DIMESSPGSSPPNLTPKPLRRQVTVAPASGLPHKEEAGKGSALGTPAAAEPVTPTSK AGSGAPGGTSKGPAEESRVRRHKHSSESPGRDKGKLSRLKPAPPPPPAASAGKAG GKPSQSPSQEAAGEAVLGAKTKATSLVDAVNSDAAKPSQPGEGLKKPVLPATPKPQ SAKPSGTPISPAPVPSTLPSASSALAGDQPSSTAFIPLISTRVSLRKTRQPPERIASGA ITKGVVLDSTEALCLAISRNSEQMASHSAVLEAGKNLYTFCVSYVDSIQQMRNKFAFR EAINKLENNLRELQICPATAGSGPAATQDFSKLLSSVKEISDIVQR	778
癌胎児性抗原関連細胞接着分子 5 (CEACAM5)	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNL PQHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQNDT GFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDAT YLWWVNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVIL NVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNI	779

【表１０－５】

	TVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCE PEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLLSVTRNDVGPYECGIQNKLSVDH SDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQE LFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVA FTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNS VSANRSDPVTLDVLYGPDTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQ QHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMI GVLVGVALI	
黒色腫抗原，ファミリーA，3 バリアント（MAGE-A3）	MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSSTLVEVTLGEVPAA ESPDPPQSPQGASSLPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLESEFQAALSRK VAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVGNWQYFFPVIFSKAFSSLQLVFGIELMEVD PIGHLYIFATCLGLSYDGLLGDNQIMPKAGLLIIVLAIIAREGDCAPEEKIWEELSVLEVF EGREDSILGDPKKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRALVETSYVKVLH HMVKISGGPHISYPPLHEWVLREGEE	780
ムチン 1（MUC1）	MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVSM TSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVTLAPATEPASGSAATWGQDVTSVPVTRPALGST TPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP APGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSA PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH GVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP APGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSA PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH GVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP APGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSA PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH GVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP APGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSA PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH GVTSAPDNRPALGSTAPPVHNVTSASGSASGSASTLVHNGTSARATTTPASKSTPF SIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHSSVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSFFFLSFHIS NLQFNSSLEDPSTDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFR EGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLV LVCVLVALAIVYLIALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSS TDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL	781
上皮細胞接着分子前駆体(EpCAM)	MAPPQVLAFGLLLAAATATFAAAQEECVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQN TVICSKLAAKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCN GTSMCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYWIIIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEI TTRYQLDPKFITSILYENNVITIDLVQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSK KMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVI SRKKRMAKYEKAEIKEMGEMHRELNA	782

【０１８３】

いくつかの態様において、腫瘍特異的抗原からの免疫原性ペプチドを含有するがんワクチン（例えば、ヘテロクリティックエピトープおよびクリプティックエピトープ）は、in vivo（例えば、対象の腫瘍細胞中）またはex vivo（例えば、対象から単離された腫瘍細胞中）で生成される。いくつかの態様において、腫瘍細胞を核酸塩基エディターで処理して免疫原性ペプチドを生成し、放射線照射して、全細胞のがんワクチンとして対象に投与する。

【０１８４】

腫瘍関連抗原をコードする遺伝子を編集するために、核酸塩基エディターおよび／またはガイドヌクレオチド配列は、編集が行われる細胞（例えば腫瘍細胞）に導入される。いくつかの態様において、核酸塩基エディターおよび／またはガイドヌクレオチド配列をコードする核酸分子（例えば発現ベクター）を、細胞中に送達し、細胞において核酸塩基エディターおよび／またはガイドヌクレオチド配列の共発現をもたらす。核酸塩基エディタ

ーおよび／またはガイドヌクレオチド配列をコードする核酸分子を、当該分野において公知の任意の方法、例えば、トランスフェクション（例えば、カチオン性リポソームにより媒介されるトランスフェクション）、形質導入（例えば、ウイルス感染を介して）およびエレクトロポレーションを用いて、細胞中に送達してもよい。いくつかの態様において、単離された核酸塩基エディター／ｇＲＮＡ複合体を送達する。当業者は、単離されたタンパク質を細胞に送達する方法に精通している。例えば、ｇＲＮＡとの複合体中の単離された核酸塩基エディターを、その細胞への侵入を促進する過給された細胞浸透性タンパク質またはペプチドに会合させる（例えば、ＰＣＴ出願公開WO2010129023および米国特許出願公開US20150071906において記載される；本明細書において参考として援用される）。いくつかの態様において、ｇＲＮＡとの複合体中の単離された核酸塩基エディターは、カチオン性トランスフェクション試薬、例えば、Thermofisher Scientific製のリポフェクタミンCRISPRMAX Cas9トランスフェクション試薬により送達することができる。いくつかの態様において、核酸塩基エディターとｇＲＮＡとは、別々に送達してもよい。他の適切な送達方法、例えば、ＡＡＶ媒介遺伝子導入も使用され得る。ＡＡＶを使用した、Ｃａｓ９ベースのゲノム編集剤（例えば、本明細書に記載の核酸塩基エディター）を送達するための戦略は、例えば、参照により本明細書に組み込まれるZetsche et al., Nature Biotechnology 33, 139-142 (2015)に記載されている。

【０１８５】

いくつかの態様において、生成された免疫原性ペプチドは、ＭＨＣクラスＩ抗原提示経路を介して、腫瘍細胞の表面に提示される。いくつかの態様において、免疫原性ペプチドは、ＭＨＣクラスＩＩ抗原提示経路を介して、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面に提示される。いくつかの態様において、ＡＰＣは、腫瘍細胞、樹状細胞、単核食細胞、胸腺上皮細胞、およびＢ細胞からなる群より選択される。いくつかの態様において、免疫原性ペプチドは、ペプチドが由来する腫瘍特異的抗原に対する適応免疫応答を誘導する。いくつかの態様において、免疫原性ペプチドは、腫瘍に対する適応免疫応答を誘導する。いくつかの態様において、適応免疫応答は、樹状細胞の成熟、ＣＤ４＋ Ｔリンパ球の活性化、ＣＤ８＋ Ｔリンパ球（細胞傷害性Ｔ細胞）の（Ｔヘルパー細胞）活性化、Ｂリンパ球の活性化および成熟、および／または腫瘍抗原特異的抗体の生産を、促進することを含む。

【０１８６】

Ｔヘルパー細胞（ＴＨ細胞）は、Ｂ細胞の形質細胞およびメモリーＢ細胞への成熟、ならびに細胞傷害性Ｔ細胞およびマクロファージの活性化を含む免疫プロセスにおいて、他の白血球を支援する。これらの細胞は、その表面にＣＤ４糖タンパク質を発現するため、ＣＤ４＋ Ｔ細胞としても知られている。ヘルパーＴ細胞は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面に発現するＭＨＣクラスＩＩ分子によりペプチド抗原によって提示されると、活性化される。活性化されると、ヘルパーＴ細胞は急速に分裂し、能動的な免疫応答を調節または支援するサイトカインと呼ばれる小さなタンパク質を分泌する。これらの細胞は、ＴＨ１、ＴＨ２、ＴＨ３、ＴＨ１７、ＴＨ９、またはＴＦＨを含むいくつかのサブタイプの１つに分化することができ、これらは異なるサイトカインを分泌して異なる種類の免疫応答を促進する。ＡＰＣからのシグナル伝達は、Ｔ細胞を特定のサブタイプに指向させる。

【０１８７】

細胞傷害性Ｔ細胞（例えば、ＴＣ細胞、ＣＴＬ、Ｔキラー細胞、キラーＴ細胞）はウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、これらは移植拒絶にも関係している。これらの細胞はその表面にＣＤ８糖タンパク質を発現するため、ＣＤ８＋ Ｔ細胞としても知られている。これらの細胞は、すべての有核細胞の表面に存在するＭＨＣクラスＩ分子に関連する抗原に結合することにより、標的を認識する。ＩＬ－１０、アデノシン、および制御性Ｔ細胞によって分泌される他の分子を介して、ＣＤ８＋細胞はアネルギー（抗原反応不顕性）状態に不活性化され、自己免疫疾患を防ぐ。

【０１８８】

ほとんどの細胞傷害性Ｔ細胞は、特定の抗原を認識することができるＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現する。細胞内の抗原はクラスＩ ＭＨＣ分子に結合し、クラスＩ ＭＨＣ分子

によって細胞の表面に運ばれ、そこでＴ細胞によって認識され得る。ＴＣＲがその抗原に特異的である場合、クラスＩ ＭＨＣ分子と抗原の複合体に結合し、Ｔ細胞は、例えばアポトーシスを誘導することにより細胞を破壊する。ＴＣＲがクラスＩ ＭＨＣ分子に結合するためには、前者にはクラスＩ ＭＨＣ分子の定常部分に結合するＣＤ８と呼ばれる糖タンパク質が付随していなければならない。したがって、これらのＴ細胞はＣＤ８＋ Ｔ細胞と呼ばれる。

【０１８９】

ナチュラルキラーＴ細胞（ＮＫＴ細胞－自然免疫系のナチュラルキラー細胞と混同しないこと）は、適応免疫系と自然免疫系を橋渡しする。主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）分子によって提示されるペプチド抗原を認識する従来のＴ細胞とは異なり、ＮＫＴ細胞は、ＣＤ１ｄと呼ばれる分子によって提示される糖脂質抗原を認識する。活性化されると、これらの細胞はＴｈ細胞およびＴｃ細胞の両方に起因する機能（すなわち、サイトカイン産生および細胞溶解／細胞殺傷分子の放出）を実行できる。それらはまた、いくつかの腫瘍細胞および、例えば細菌またはウイルスなどの微生物に感染した細胞を、認識および除去することもできる。

【０１９０】

メモリーＴ細胞は、初期Ｔ細胞応答後も長期間持続する抗原特異的Ｔ細胞のサブセットである。それらは、同種の抗原に再曝露されると、直ちに多数のエフェクターＴ細胞に拡大し、したがって、過去の抗原に対する「メモリー」を免疫系に提供する。本明細書に記載のがんワクチンは、腫瘍特異的抗原に対する「メモリー」を免疫系に提供し、それにより、新たに出現したがん細胞または転移したがん細胞に対する強力な免疫応答を誘導する。

【０１９１】

制御性Ｔ細胞（サプレッサーＴ細胞）は、免疫寛容の維持に重要である。それらの主な役割は、免疫反応の終わりに向かってＴ細胞媒介性免疫を遮断し、胸腺での負の選択の過程を逃れた自己反応性Ｔ細胞を抑制することである。サプレッサーＴ細胞とヘルパーＴ細胞は、それらの調節機能により、まとめて制御性Ｔ細胞と呼ばれる。

【０１９２】

Ｂ細胞活性化は、脾臓およびリンパ節などの二次リンパ器官（ＳＬＯ）で起こる。Ｂ細胞は骨髄で成熟した後、血液を介してＳＬＯに移動し、ＳＬＯは循環するリンパを介して抗原の一定の供給を受ける。ＳＬＯでは、Ｂ細胞がＢＣＲを介して抗原に結合すると、Ｂ細胞の活性化が開始される。抗原は、自由に浮遊するか、またはマクロファージもしくは樹状細胞（ＤＣ）などのＡＰＣによって提示されるかのいずれかであり、タンパク質、糖タンパク質、多糖類、ウイルス全粒子（whole virus particles）、細菌全細胞（whole bacterial cells）を含む。Ｂ細胞のいくつかのサブタイプは優先的にＴ細胞依存性活性化を受けるが、他のサブタイプの細胞は優先的にＴ細胞非依存性活性化を受ける。

【０１９３】

Ｔ細胞の助けを借りてＢ細胞を活性化する抗原は、Ｔ細胞依存性（ＴＤ）抗原として知られており、外来タンパク質を含む。それらは、Ｔ細胞を欠く生物において体液性応答を誘導することができないため、この名前が付けられている。これらの抗原に対するＢ細胞の応答には数日かかるが、生成された抗体はＴ細胞非依存性の活性化から生成された抗体よりも親和性が高く、機能的に汎用性である。

【０１９４】

ＢＣＲがＴＤ抗原に結合すると、抗原は受容体媒介エンドサイトーシスを介してＢ細胞に取り込まれ、分解され、細胞膜上のＭＨＣ－ＩＩ分子と複合したペプチド片としてＴ細胞に提示される。同じ抗原で活性化されたＴヘルパー（ＴＨ）細胞、典型的には濾胞性Ｔヘルパー（ＴＦＨ）細胞は、これらのＭＨＣ－ＩＩ－ペプチド複合体を、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を介して認識して結合する。ＴＣＲ－ＭＨＣ－ＩＩ－ペプチド結合後、Ｔ細胞は、表面タンパク質ＣＤ４０ＬおよびＩＬ－４およびＩＬ－２１などのサイトカインを発現する。ＣＤ４０Ｌは、Ｂ細胞増殖、免疫グロブリンクラススイッチング、および体細胞超

変異を促進し、Ｔ細胞の成長と分化を維持するＢ細胞表面受容体ＣＤ４０を結合することにより、Ｂ細胞活性化に必要な共刺激因子として機能する。Ｂ細胞サイトカイン受容体によって結合されたＴ細胞由来のサイトカインもまた、Ｂ細胞増殖、免疫グロブリンクラススイッチング、体細胞超変異を促進し、分化を誘導する。Ｂ細胞はこれらのシグナルを受信した後、活性化されたとみなされる。

【０１９５】

活性化されたＢ細胞は、即時保護のための短命の形質芽細胞および持続的な保護のための長命の形質細胞およびメモリーＢ細胞の両方を生じる、２段階分化プロセスに関与する。濾胞外反応として知られる最初のステップは、リンパ濾胞の外側で発生するが、まだＳＬＯにある。このステップの間に、活性化されたＢ細胞は増殖し、免疫グロブリンクラススイッチングを受け、主にクラスＩｇＭの初期の弱い抗体を産生する形質芽細胞に分化する。２番目のステップは、活性化されたＢ細胞がリンパ濾胞に入り、胚中心（ＧＣ）を形成することからなるが、この胚中心（ＧＣ）は、Ｂ細胞が広範な増殖、免疫グロブリンクラススイッチング、体細胞超変異による親和性成熟に供されるところの、特殊な微小環境である。これらのプロセスは、ＧＣ内のＴＦＨ細胞によって促進され、高親和性メモリーＢ細胞および長寿命形質細胞の両方を生成する。結果として生じる形質細胞は大量の抗体を分泌し、ＳＬＯ内に留まるか、またはより優先的には、骨髄に移動する。

【０１９６】

Ｔ細胞の助けなしにＢ細胞を活性化する抗原は、Ｔ細胞非依存性（ＴＩ）抗原として知られており、外来多糖および非メチル化ＣｐＧ ＤＮＡを含む。それらは、Ｔ細胞を欠く生物において体液性応答を誘導することができるため、この名前が付けられている。これらの抗原に対するＢ細胞の応答は迅速であるが、生成された抗体は、Ｔ細胞依存性活性化から生成された抗体よりも親和性が低く、機能的に汎用性が低い傾向がある。

【０１９７】

ＴＤ抗原と同様に、ＴＩ抗原により活性化されるＢ細胞は、活性化を完了するためにさらなるシグナルを必要とするが、Ｔ細胞からそれらを受け取る代わりに、該シグナルは、共通の微生物成分の認識およびこれのトール様受容体（ＴＬＲ）へ結合によって提供されるか、またはＢＣＲを細菌細胞上の反復エピトープに広範囲に架橋することによって提供される。ＴＩ抗原によって活性化されたＢ細胞は、リンパ小胞の外側で増殖し続けるが、まだＳＬＯ内にあり（ＧＣは形成されない）、免疫グロブリンクラススイッチングを受ける可能性があり、主にクラスＩｇＭの初期の弱い抗体を産生する短命の形質芽細胞に分化するが、長寿命形質細胞のいくつかの集団にも分化する。

【０１９８】

メモリーＢ細胞の活性化は、親Ｂ細胞によって共有される標的抗原の検出および結合から始まる。一定のウイルス特異的メモリーＢ細胞などの一部のメモリーＢ細胞は、Ｔ細胞の助けなしで活性化できるが、他はＴ細胞の助けが必要である。抗原が結合すると、メモリーＢ細胞は受容体を介したエンドサイトーシスを介して抗原を取り込み、これを分解し、細胞膜上のＭＨＣ－ＩＩ分子と複合したペプチド片としてＴ細胞に提示する。メモリーＴヘルパー（ＴＦＨ）細胞、典型的には同じ抗原で活性化されたＴ細胞に由来するメモリー濾胞Ｔヘルパー（ＴＦＨ）細胞は、これらのＭＨＣ－ＩＩ－ペプチド複合体をＴＣＲを介して認識して結合する。ＴＣＲ－ＭＨＣ－ＩＩ－ペプチド結合およびメモリーＴＦＨ細胞からの他のシグナルの中継に続いて、メモリーＢ細胞が活性化され、濾胞外応答を介して形質芽細胞および形質細胞に分化するか、または形質細胞およびより多くのメモリーＢ細胞を生成する、胚中心反応を起こす。

【０１９９】

いくつかの態様において、適応免疫応答は、腫瘍細胞の死滅、腫瘍負荷の低減、腫瘍サイズの低減、および／または転移の防止をもたらす。いくつかの態様において、適応免疫応答は、自然体細胞変異に関連するネオエピトープに対して活性である。いくつかの態様において、ネオエピトープは腫瘍細胞の系統に特異的である。

【０２００】

いくつかの態様において、ヘテロクリティックエピトープまたはクリプティックエピトープにより誘導される適応免疫応答は、天然の腫瘍特異的抗原と交差反応する。いくつかの態様において、ヘテロクリティックエピトープまたはクリプティックエピトープによって誘導される適応免疫応答は、腫瘍特異的抗原で起きる自然変異から生じるネオエピトープと交差反応する。

【０２０１】

臨床用途でのヘテロクリティックエピトープの使用に関連する利点がある。例えば、ヘテロクリティックエピトープは、Ｔ細胞アネルギーの状態を逆転させ、Ｔ細胞の非寛容化交差反応性クローンを活性化することにより、または「免疫偏向」、すなわちＴｈ１やＴｈ２などの生産されるＣＴＬの種類を媒介することにより、寛容を破壊／克服する能力を有する。最近の研究は、ヘテロクリティックエピトープが、それらが内因的にプロセシングされたエピトープを認識するＣＴＬを誘導可能であるという点において、免疫原性であることを示している（Zaremba, et al., Cancer Research, 57:4570 (1997)；Rivoltoni, et al., Cancer Research, 59:301 (1999)； Selby, et al., The Journal of Immunology 162(2):669 (1999)、それらの各々の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。これは、異なる免疫系の研究で確認されている（Zugel, et al., J. Immunol., 161:1705 (1998)、Wang, et al., J. Exp. Med., 190:983 (1999)、Men, et al., J. Immunol., 162:3566, (1999)、これらの各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる）。例えば、Zugelらによる研究は、成体マウスにおける免疫優性Ｔ細胞エピトープに対するＴ細胞寛容は、そのペプチドのヘテロクリティック交差反応性ペプチドアナログを用いた免疫化によって克服できることを示した。

【０２０２】

いくつかの態様において、ヘテロクリティックエピトープまたはクリプティックエピトープは、Ｔ細胞からのサイトカイン産生を調節する（Pfeiffer, et al., J. Exp. Med.,181:1569 (1995), Tao, et al., J. Immunol., 158:4237 (1997), Salazar, et al., Int. J. Cancer 85(6):829-38 (2000), Nicholson, et al., Int. Immunol. 12(2):205-13 (2000)、それぞれの全内容は参照により本明細書に組み込まれる）。かかるアナログによって誘導される免疫偏向は、Ｔｈ細胞応答の特定のサブセットの生成が腫瘍退縮と相関するいくつかの疾患状態に影響を及ぼし（Zitvogel, et al., J. Exp. Med., 183:87 (1996), Celluzzi, et al., J. Exp. Med. 183:283 (1996)、それぞれの全内容は参照により本明細書に組み込まれる）、または自己免疫疾患もしくは感染症の臨床転帰に影響を与えた（Romagnani, et al., Annu. Rev. Immunol., 12:227-57 (1994)、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる）。したがって、ヘテロクリティックエピトープによる免疫化は、エフェクターＴ細胞の特定のサブセットの誘導によりサイトカイン産生を調節する能力を提供し、それによって疾患の経過を変化させる。

【０２０３】

いくつかの態様において、ヘテロクリティックエピトープは、強力な生物学的効力のために、治療用量に必要とされるペプチドの量が著しく少ないため、薬物開発において利点を提供する。この特徴は、特定の製造および毒性の懸念を克服する。これに関して、ＭＡＲＴ－１ペプチドのヘテロクリティックアナログ（Rivoltini, et al., Cancer Research 59:301 (1999)、その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる）は黒色腫患者において抗原特異的Ｔ細胞を生成したが、天然のエピトープよりもはるかに低い濃度で活性だったことが示されている。同様の結果がSchlomらによって、ＣＥＡ由来のＣＡＰ１エピトープのヘテロクリティックアナログに関して報告された（Zaremba, et al., Cancer Research 57:4570 (1997)、その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる）。

【０２０４】

核酸塩基エディター

免疫原性ペプチドまたはエピトープを、本明細書に記載のがんワクチンとして腫瘍関連抗原から生成する方法は、核酸塩基エディターの使用により可能になる。本明細書において記載されるとおり、核酸塩基エディターは、（ｉ）プログラミング可能なＤＮＡ結合タ

ンパク質ドメイン；および（ｉｉ）デアミナーゼドメインを含む融合タンパク質である。任意のプログラミング可能なＤＮＡ結合ドメインを塩基エディターにおいて用い得ることが、理解されるべきである。

【０２０５】

いくつかの態様において、プログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）または転写活性化因子様エフェクタードメイン（ＴＡＬＥ）のＤＮＡ結合ドメインを含む。いくつかの態様において、プログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミングすることができ、したがって、「ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン」として言及される。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９、またはｄＣａｓ９である。ｄＣａｓ９は、本明細書において用いられる場合、そのヌクレアーゼ活性において完全に不活性であるか、またはそのヌクレアーゼ活性において部分的に不活性なＣａｓ９（例えばＣａｓ９ニッカーゼ）を包含する。したがって、いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、Ｃａｓ９ニッカーゼである。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、ヌクレアーゼ不活性型Ｃｐｆ１である。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、ヌクレアーゼ不活性型アルゴノートである。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、ヌクレアーゼ不活性型ＣａｓＸまたはＣａｓＹであり、これは例えば、Burstein et al., New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes, Nature 542, 237-241, 2017に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２０６】

いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、ｄＣａｓ９ドメインである。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、Ｃａｓ９ニッカーゼである。いくつかの態様において、ｄＣａｓ９ドメインは、配列番号２または配列番号３のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ｄＣａｓ９ドメインは、本明細書において提供されるＣａｓ９ドメインのうちのいずれか１つ（例えば、配列番号１１～２６０）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９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも９９．５％同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号１におけるＤ１０Ｘ（Ｘは、Ｄ以外の任意のアミノ酸である）および／またはＨ８４０Ｘ（Ｘは、Ｈ以外の任意のアミノ酸である）に対応する変異を含む。いくつかの態様において、ｄＣａｓ９ドメインは、本明細書において提供されるＣａｓ９ドメインのうちのいずれか１つ（例えば、配列番号１１～２６０）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９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも９９．５％同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号１におけるＤ１０Ａおよび／またはＨ８４０Ａに対応する変異を含む。いくつかの態様において、Ｃａｓ９ニッカーゼは、本明細書において提供されるＣａｓ９ドメインのうちのいずれか１つ（例えば、配列番号１１～２６０）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９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも９９．５％同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号１におけるＤ１０Ｘ（Ｘは、Ｄ以

外の任意のアミノ酸である）に対応する変異、および配列番号１における位置８４０に対応する位置においてヒスチジンを含む。いくつかの態様において、Ｃａｓ９ニッカーゼは、本明細書において提供されるＣａｓ９ドメインのうちのいずれか１つ（例えば、配列番号１１～２６０）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９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも９９．５％同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号１におけるＤ１０Ａに対応する変異、および配列番号１における位置８４０に対応する位置においてヒスチジンを含む。いくつかの態様において、それぞれ配列番号２または配列番号３に対して少なくとも約７０％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一、少なくとも約９９．５％同一、または少なくとも約９９．９％であり、配列番号１におけるＤ１０Ａおよび／またはＨ８４０Ａに対応する変異を含む、ｄＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼのバリアントまたはホモログ（例えば、それぞれ配列番号２または配列番号３のバリアント）が提供される。いくつかの態様において、配列番号２よりも、約５アミノ酸、約１０アミノ酸、約１５アミノ酸、約２０アミノ酸、約２５アミノ酸、約３０アミノ酸、約４０アミノ酸、約５０アミノ酸、約７５アミノ酸、約１００アミノ酸、またはそれより多く、長いまたは短いアミノ酸配列を有する、Ｃａｓ９のバリアント（例えば、配列番号２のバリアント）が提供され、ただし、当該ｄＣａｓ９バリアントは、配列番号１におけるＤ１０Ａおよび／またはＨ８４０Ａに対応する変異を含む。いくつかの態様において、配列番号３よりも、約５アミノ酸、約１０アミノ酸、約１５アミノ酸、約２０アミノ酸、約２５アミノ酸、約３０アミノ酸、約４０アミノ酸、約５０アミノ酸、約７５アミノ酸、約１００アミノ酸、またはそれより多く、長いまたは短いアミノ酸配列を有する、Ｃａｓ９ニッカーゼのバリアント（例えば、配列番号３のバリアント）が提供され、ただし、当該ｄＣａｓ９バリアントは、配列番号１における、Ｄ１０Ａに対応する変異を含み、位置８４０に対応する位置においてヒスチジンを含む。

【０２０７】

さらなる好適なヌクレアーゼ不活性型ｄＣａｓ９ドメインは、本開示および当該分野における知識に基づいて当業者に明らかであり、本開示の範囲内である。かかるさらなる例示的な好適なヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９ドメインとして、これらに限定されないが、Ｄ１０Ａ／Ｈ８４０Ａ、Ｄ１０Ａ／Ｄ８３９Ａ／Ｈ８４０Ａ、Ｄ１０Ａ／Ｄ８３９Ａ／Ｈ８４０Ａ／Ｎ８６３Ａ変異体ドメイン（例えば、Prashant et al., Nature Biotechnology. 2013；31（9）：833-838を参照；これは、本明細書において参考として援用される）、またはＫ６０３Ｒ（例えば、Chavez et al., Nature Methods 12, 326-328, 2015を参照；これは、これは、本明細書において参考として援用される）が挙げられる。

【０２０８】

いくつかの態様において、本発明において利用される核酸塩基エディターは、Ｃａｓ９ドメインとＤＮＡの糖－リン酸骨格との間の静電相互作用が、野生型Ｃａｓ９ドメインと比較して減少したＣａｓ９ドメインを含む。いくつかの態様において、Ｃａｓ９ドメインは、Ｃａｓ９ドメインとＤＮＡの糖－リン酸骨格との間の会合を減少させる、１つ以上の変異を含む。いくつかの態様において、本明細書において記載される核酸塩基エディターは、ｄＣａｓ９（例えば、Ｄ１０ＡおよびＨ８４０Ａ変異を有するもの）またはＣａｓ９ニッカーゼ（例えば、Ｄ１０Ａ変異を有するもの）を含み、ここで、当該ｄＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼは、配列番号１において提供されるアミノ酸配列のＮ４９７Ｘ、Ｒ６６１Ｘ、Ｑ６９５Ｘ、および／またはＱ９２６Ｘ変異のうちの１つ以上、または配列番号１１～２６０において提供されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応する変異をさらに含み、ここで、Ｘは、任意のアミノ酸である。いくつかの態様において、本明細書において記載される核酸塩基エディターは、ｄＣａｓ９（例えば、Ｄ１０ＡおよびＨ８４０Ａ変異を有するもの）またはＣａｓ９ニッカーゼ（例えば、Ｄ１０Ａ変異を有するも

の）を含み、ここで、当該ｄＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼは、配列番号１において提供されるアミノ酸配列のＮ４９７Ａ、Ｒ６６１Ａ、Ｑ６９５Ａ、および／またはＱ９２６Ａ変異のうちの１つ以上、または配列番号１１～２６０において提供されるアミノ酸配列のうちのいずれかにおける対応する変異をさらに含む。いくつかの態様において、ｄＣａｓ９ドメイン（例えば、本明細書において提供される核酸塩基エディターのうちのいずれかのもの）は、配列番号２～９のうちのいずれかにおいて記載されるようなアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、核酸塩基エディターは、配列番号２９３～３０２および３２１のうちのいずれかにおいて記載されるようなアミノ酸配列を含む。

Ｃａｓ９とＤＮＡ骨格との間の静電相互作用が減少しているＣａｓ９バリアント

【数１２】

DKKYSIGL**A**IGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARR
RYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK
KLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK
AILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLL
AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYK
EIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGE
LHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASA
QSFIERMT**A**FDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFE
DREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG**A**LSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFM
ALIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEM
ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDIN
RLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFD
NLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR**A**ITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFR
KDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATA
KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTG
GFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS
SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASH
YEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD（配列番号9、
配列番号1に対する変異に太字および下線を付す）

高フィデリティー核酸塩基エディター（ＨＦ－ＢＥ３）

【数１３】

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKF
TTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTI
QIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQ
SCHYQRLPPHILWATGLKSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLN
PDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITK
APLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTAFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYN
ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASL
GTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
ALSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMALIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGS
PAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEH
PVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS
DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRAITKHVAQIL
DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK
LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
WDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA
YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR
KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKR
VILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIH
QSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 321)

【０２０９】

いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、微生物ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの単一エフェクターである。微生物ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの単一エフェクターは、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、Ｃ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、およびＣ２ｃ３を包含するが、これに限定されない。典型的に、微生物ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、クラス１およびクラス２システムに分割される。クラス１システムは、マルチサブユニットエフェクター複合体を有し、一方クラス２システムは、単一タンパク質エフェクターを有する。Ｃａｓ９およびＣｐｆ１はクラス２エフェクターである。Ｃａｓ９およびＣｐｆ１に加えて、３つの別個のクラス２ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム（Ｃ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、およびＣ２ｃ３）が、Shmakov et al., “Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR Cas Systems”, Mol. Cell, 2015 Nov 5; 60(3)：385-397に記載されており、その内容全体が参照によって本明細書に組み込まれる。Ｃ２ｃ１およびＣ２ｃ３の２つのシステムのエフェクターは、Ｃｐｆ１に関するＲｕｖＣ様エンドヌクレアーゼドメインを含有する。第３のシステム、Ｃ２ｃ２は、２つの予測されるＨＥＰＮ ＲＮａｓｅドメインを有するエフェクターを含有する。成熟したＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡの生産は、Ｃ２ｃ１によるＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡの生産とは異なり、ｔｒａｃｒＲＮＡとは独立である。Ｃ２ｃ１は、ＤＮＡ切断についてＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡの両方に依存している。細菌のＣ２ｃ２は、その活性型ＲＮＡ単一鎖ＲＮＡ分解活性とは別個にＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡの成熟について独特なＲＮａｓｅ活性を所有することが示されている。これらのＲＮａｓｅ機能は、互いによ

び、ＣｐｆｌのＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡプロセシング挙動とは異なる。例えば、East-Selets ky, et al., “Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide RNA proc essing and RNA detection”, Nature, 2016 Oct 13;538(7624):270-273を参照し、その内容全体は、参照によって本明細書に組み込まれる。Leptotrichia shahiiにおけるＣ２ ｃ２のin vitro生化学的分析は、Ｃ２ｃ２が単一ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡによる誘導型であり、相補的プロトスペーサーを運搬するｓｓＲＮＡ標的を切断するようプログラムされ得ることを示している。２つの保存されたＨＥＰＮドメインにおける触媒残基は、切断を仲介する。触媒残基における変異は、触媒不活性型ＲＮＡ結合タンパク質を生成する。例えば、Abudayyeh et al., “C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-t argeting CRISPR effector”, Science, 2016 Aug 5; 353(6299)を参照し、その内容全体は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【０２１０】

Alicyclobaccillus acidoterrastris Ｃ２ｃ１（ＡａｃＣ２ｃ１）の結晶構造は、キメラ単一分子ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）と複合していると報告されている。例えば、Liu et al., “C2c1-sgRNA Complex Structure Reveals RNA-Guided DNA Cleavage Mechanism ”, Mol. Cell, 2017 Jan 19;65(2):310-322を参照し、これは、参照によって本明細書に組み込まれる。結晶構造はまた、Alicyclobacillus acidoterrestris Ｃ２ｃ１において三重複合体として標的ＤＮＡに結合したものについて報告している。例えば、Yang et al ., “PAM-dependent Target DNA Recognition and Cleavage by C2C1 CRISPR-Cas endonu clease”, Cell, 2016 Dec 15;167(7):1814-1828を参照し、その内容全体は、参照によって本明細書に組み込まれている。標的および非標的ＤＮＡ鎖の両方を有するＡａｃＣ２ｃ１の触媒能力のあるコンホメーションは、捕捉され独立して単一ＲｕｖＣ触媒ポケット内に位置し、Ｃ２ｃ１媒介性切断により、標的ＤＮＡのスタガー７ヌクレオチド切断をもたらす。Ｃ２ｃ１三重複合体と以前に同定されたＣａｓ９およびＣｐｆ１の対照物との間の構造の比較は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９システムにより使用されるメカニズムの多様性を実証している。

【０２１１】

いくつかの態様において、本明細書に記載の核酸塩基エディターは、Ｃ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、またはＣ２ｃ３タンパク質を含む。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、Ｃ２ｃ１タンパク質である。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、Ｃ２ｃ２タンパク質である。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、Ｃ２ｃ３タンパク質である。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、天然のＣ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、またはＣ２ｃ３タンパク質と少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも９９．５％同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、天然に存在するＣ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、またはＣ２ｃ３タンパク質である。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、配列番号１０５７～１０５９のいずれか１つと、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも９９．５％同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、配列番号１０５７～１０５９のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の細菌種からのＣ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、またはＣ２ｃ３も、本開示に従って使用できることが理解されるべきである。

【０２１２】

Ｃ２ｃ１(uniprot.org/uniprot/T0D7A2#) sp|T0D7A2|C2C1_ALIAG ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼＣ２ｃ１ OS=Alicyclobacillus acidoterrestris (株ATCC 49025 / DSM 3922 / CIP 106132 / NCIMB 13137 / GD3B) GN=c2c1 PE=1 SV=1

【数１４】

DSM 3922 / CIP 106132 / NCIMB 13137 / GD3B) GN=c2c1 PE=1 SV=1

MAVKSIKVKLRLDDMPEIRAGLWKLHKEVNAGVRYYTEWLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECDKTAE
ECKAELLERLRARQVENGHRGPAGSDDELLQLARQLYELLVPQAIGAKGDAQQIARKFLSPLADKDAV
GGLGIAKAGNKPRWVRMREAGEPGWEEEKEKAETRKSADRTADVLRALADFGLKPLMRVYTDSEMS
SVEWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQAIERMMSWESWNQRVGQEYAKLVEQKNRFEQKNFVGQEHLV
HLVNQLQQDMKEASPGLESKEQTAHYVTGRALRGSDKVFEKWGKLAPDAPFDLYDAEIKNVQRRNT
RRFGSHDLFAKLAEPEYQALWREDASFLTRYAVYNSILRKLNHAKMFATFTLPDATAHPIWTRFDKLG
GNLHQYTFLFNEFGERRHAIRFHKLLKVENGVAREVDDVTVPISMSEQLDNLLPRDPNEPIALYFRDYG
AEQHFTGEFGGAKIQCRRDQLAHMHRRRGARDVYLNVSVRVQSQSEARGERRPPYAAVFRLVGDNH
RAFVHFDKLSDYLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVDLGLRTSASISVFRVARKDELKPNSKGRVPFFF
PIKGNDNLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQRTLRQLRTQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSW
AKLIEQPVDAANHMTPDWREAFENELQKLKSLHGICSDKEWMDAVYESVRRVWRHMGKQVRDWRK
DVRSGERPKIRGYAKDVVGGNSIEQIEYLERQYKFLKSWSFFGKVSGQVIRAEKGSRFAITLREHIDHAK
EDRLKKLADRIIMEALGYVYALDERGKGKWVAKYPPCQLILLEELSEYQFNNDRPPSENNQLMQWSH
RGVFQELINQAQVHDLLVGTMYAAFSSRFDARTGAPGIRCRRVPARCTQEHNPEPFPWWLNKFVVEHT
LDACPLRADDLIPTGEGEIFVSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQQRLWSDFDISQIRLRCDWGEVDGE
LVLIPRLTGKRTADSYSNKVFYTNTGVTYYERERGKKRRKVFAQEKLSEEEAELLVEADEAREKSVVL
MRDPSGIINRGNWTRQKEFWSMVNQRIEGYLVKQIRSRVPLQDSACENTGDI (配列番号 1057)

【０２１３】

Ｃ２ｃ２(uniprot.org/uniprot/P0DOC6) >sp|P0DOC6|C2C2_LEPSD ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼＣ２ｃ２ OS=Leptotrichia shahii (株DSM 19757 / CCUG 47503 / CIP 107916 / JCM 16776 / LB37) GN=c2c2 PE=1 SV=1

【数１５】

MGNLFGHKRWYEVRDKKDFKIKRKVKVKRNYDGNKYILNINENNNKEKIDNNKFIRKYINYKKNDNI
LKEFTRKFHAGNILFKLKGKEGIIRIENNDDFLETEEVVLYIEAYGKSEKLKALGITKKKIIDEAIRQGITK
DDKKIEIKRQENEEEIEIDIRDEYTNKTLNDCSIILRIIENDELETKKSIYEIFKNINMSLYKIIEKIIENETEK
VFENRYYEEHLREKLLKDDKIDVILTNFMEIREKIKSNLEILGFVKFYLNVGGDKKKSKNKKMLVEKIL
NINVDLTVEDIADFVIKELEFWNITKRIEKVKKVNNEFLEKRRNRTYIKSYVLLDKHEKFKIERENKKDK
IVKFFVENIKNNSIKEKIEKILAEFKIDELIKKLEKELKKGNCDTEIFGIFKKHYKVNFDSKKFSKKSDEEK
ELYKIIYRYLKGRIEKILVNEQKVRLKKMEKIEIEKILNESILSEKILKRVKQYTLEHIMYLGKLRHNDID
MTTVNTDDFSRLHAKEELDLELITFFASTNMELNKIFSRENINNDENIDFFGGDREKNYVLDKKILNSKI
KIIRDLDFIDNKNNITNNFIRKFTKIGTNERNRILHAISKERDLQGTQDDYNKVINIIQNLKISDEEVSKAL
NLDVVFKDKKNIITKINDIKISEENNNDIKYLPSFSKVLPEILNLYRNNPKNEPFDTIETEKIVLNALIYVN
KELYKKLILEDDLEENESKNIFLQELKKTLGNIDEIDENIIENYYKNAQISASKGNNKAIKKYQKKVIECY
IGYLRKNYEELFDFSDFKMNIQEIKKQIKDINDNKTYERITVKTSDKTIVINDDFEYIISIFALLNSNAVIN
KIRNRFFATSVWLNTSEYQNIIDILDEIMQLNTLRNECITENWNLNLEEFIQKMKEIEKDFDDFKIQTKKE
IFNNYYEDIKNNILTEFKDDINGCDVLEKKLEKIVIFDDETKFEIDKKSNILQDEQRKLSNINKKDLKKKV
DQYIKDKDQEIKSKILCRIIFNSDFLKKYKKEIDNLIEDMESENENKFQEIYYPKERKNELYIYKKNLFLNI
GNPNFDKIYGLISNDIKMADAKFLFNIDGKNIRKNKISEIDAILKNLNDKLNGYSKEYKEKYIKKLKEND
DFFAKNIQNKNYKSFEKDYNRVSEYKKIRDLVEFNYLNKIESYLIDINWKLAIQMARFERDMHYIVNGL
RELGIIKLSGYNTGISRAYPKRNGSDGFYTTTAYYKFFDEESYKKFEKICYGFGIDLSENSEINKPENESIR
NYISHFYIVRNPFADYSIAEQIDRVSNLLSYSTRYNNSTYASVFEVFKKDVNLDYDELKKKFKLIGNNDI
LERLMKPKKVSVLELESYNSDYIKNLIIELLTKIENTNDTL（ 配列番号 1058)

【０２１４】

Ｃ２ｃ３、以下より翻訳 >CEPX01008730.1 marine metagenome genome assembly TARA_037_MES_0.1-0.22, contig TARA_037_MES_0.1-0.22_scaffold22115_1,全ゲノムショットガン配列

【数１６】

MRSNYHGGRNARQWRKQISGLARRTKETVFTYKFPLETDAAEIDFDKAVQTYGIAEGVGHGSLIGLVC
AFHLSGFRLFSKAGEAMAFRNRSRYPTDAFAEKLSAIMGIQLPTLSPEGLDLIFQSPPRSRDGIAPVWSE
NEVRNRLYTNWTGRGPANKPDEHLLEIAGEIAKQVFPKFGGWDDLASDPDKALAAADKYFQSQGDFP
SIASLPAAIMLSPANSTVDFEGDYIAIDPAAETLLHQAVSRCAARLGRERPDLDQNKGPFVSSLQDALVS
SQNNGLSWLFGVGFQHWKEKSPKELIDEYKVPADQHGAVTQVKSFVDAIPLNPLFDTTHYGEFRASVA
GKVRSWVANYWKRLLDLKSLLATTEFTLPESISDPKAVSLFSGLLVDPQGLKKVADSLPARLVSAEEAI
DRLMGVGIPTAADIAQVERVADEIGAFIGQVQQFNNQVKQKLENLQDADDEEFLKGLKIELPSGDKEPP
AINRISGGAPDAAAEISELEEKLQRLLDARSEHFQTISEWAEENAVTLDPIAAMVELERLRLAERGATGD
PEEYALRLLLQRIGRLANRVSPVSAGSIRELLKPVFMEEREFNLFFHNRLGSLYRSPYSTSRHQPFSIDVG
KAKAIDWIAGLDQISSDIEKALSGAGEALGDQLRDWINLAGFAISQRLRGLPDTVPNALAQVRCPDDVR
IPPLLAMLLEEDDIARDVCLKAFNLYVSAINGCLFGALREGFIVRTRFQRIGTDQIHYVPKDKAWEYPDR
LNTAKGPINAAVSSDWIEKDGAVIKPVETVRNLSSTGFAGAGVSEYLVQAPHDWYTPLDLRDVAHLVT
GLPVEKNITKLKRLTNRTAFRMVGASSFKTHLDSVLLSDKIKLGDFTIIIDQHYRQSVTYGGKVKISYEP
ERLQVEAAVPVVDTRDRTVPEPDTLFDHIVAIDLGERSVGFAVFDIKSCLRTGEVKPIHDNNGNPVVGT
VAVPSIRRLMKAVRSHRRRRQPNQKVNQTYSTALQNYRENVIGDVCNRIDTLMERYNAFPVLEFQIKN
FQAGAKQLEIVYGS（配列番号 1059)

【０２１５】
Ｃａｓ９は、標的ＤＮＡ配列におけるＣＲＩＳＰＲ反復配列中の短いモチーフ（ＰＡＭモチーフ）を認識する。「ＰＡＭモチーフ」、または「プロトスペーサー隣接モチーフ」とは、本明細書において用いられる場合、ＣＲＩＳＰＲの細菌の獲得免疫系においてＣａｓ９ヌクレアーゼにより標的とされるＤＮＡ配列のすぐ後に続くＤＮＡ配列を指す。ＰＡＭは、浸潤性のウイルスまたはプラスミドの構成成分であるが、細菌のＣＲＩＳＰＲ遺伝子座の構成成分ではない。天然においては、Ｃａｓ９は、ＰＡＭ配列が続いてない場合は、標的ＤＮＡ配列に首尾よく結合しないかまたはこれを切断しないであろう。ＰＡＭは、必須のターゲティング構成成分であり（細菌のゲノムにおいては見出されない）、これは、細菌自体を非自己ＤＮＡと区別し、それによりＣＲＩＳＰＲ遺伝子座がヌクレアーゼにより標的とされて破壊されることを防止する。

【０２１６】
野生型Streptococcus pyogenesＣａｓ９は、正準のＰＡＭ配列（５’－ＮＧＧ－３’）を認識する。他のＣａｓ９ヌクレアーゼ（例えば、Streptococcus thermophiles、Staphylococcus aureus、Neisseria meningitidis、またはTreponema denticolaorからのＣａｓ９）およびそれらのＣａｓ９バリアントは、当該分野において、異なる、またはより緩やかなＰＡＭ要件を有することが記載されている。例えば、Kleinstiver et al., Nature 523, 481-485, 2015；Klenstiver et al., Nature 529, 490-495, 2016；Ran et al., Nature, Apr 9；520（7546）：186-191, 2015；Kleinstiver et al., Nat Biotechnol, 33（12）：1293-1298, 2015；Hou et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 110（39）：15644-9, 2014；Prykhozhij et al., PLoS One, 10（3）：e0119372, 2015；Zetsche et al., Cell 163, 759-771, 2015；Gao et al., Nature Biotechnology, doi：10.1038/nbt.3547, 2016；Want et al., Nature 461, 754-761, 2009；Chavez et al., doi：dx.doi.org/10.1101/058974；Fagerlund et al., Genome Biol. 2015；16：25, 2015；Zetsche et al., Cell, 163, 759-771, 2015；およびSwarts et al., Nat Struct Mol Biol, 21（9）：743-53, 2014において、これらの各々は、本明細書において参考として援用される。

【０２１７】
したがって、本開示のガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、限定することなく、ＮＧＧ、ＮＧＡＮ、ＮＧＮＧ、ＮＧＡＧ、ＮＧＣＧ、ＮＮＧＲＲＴ、ＮＧＲＲＮ、ＮＮＮＲＲＴ、ＮＮＮＧＡＴＴ、ＮＮＡＧＡＡＷ、ＮＡＡＡＣ、ＴＴＮ、ＴＴＴＮ、およびＹＴＮを含む多様なＰＡＭ配列を認識することができ、ここで、Ｙはピリミジンであり、Ｎは任意の核酸塩基である。いくつかの態様において、ＰＡＭは標的塩基の５’に位置する。いくつかの態様において、ＰＡＭは標的塩基の３’に位置する。

【０２１８】
異なるＰＡＭ特異性を有するＲＮＡによりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質の一例は、プレボテラ属（Prevotella）およびフランシセラ（Francisella）由来の、クラスター化され規則的に間隔が空いている短い回分配列リピート（Ｃｐｆ１）である。Ｃａｓ９と同様に、Ｃｐｆ１もまたクラス２のＣＲＩＳＰＲエフェクター（class 2 CRISPR effector）である。Ｃｐｆ１が、Ｃａｓ９とは別個の特徴を有する強固なＤＮＡ干渉を仲介することが示されている。Ｃｐｆ１は、ｔｒａｃｒＲＮＡを欠いている単一ＲＮＡガイド型エンドヌクレアーゼであり、Ｔ－リッチプロトスペーサー隣接モチーフ（ＴＴＮ、ＴＴＴＮ、またはＹＴＮ）を利用する。さらにＣｐｆ１は、スタガーＤＮＡの二本鎖切断を介してＤＮＡを切断する。１６のＣｐｆ１－ファミリータンパク質の中で、AcidaminococcusおよびLachnospiraceae由来の２つの酵素が、ヒト細胞において効率的なゲノム編集活性を有することが示されている。

【０２１９】
ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインとして使用され得るヌクレアーゼ－不活性型Ｃｐｆ１（ｄＣｐｆ１）バリアントもまた、本開示において役立つ。Ｃｐｆ１タンパク質は、Ｃａｓ９のＲｕｖＣドメインと同様である

ＲｕｖＣ様エンドヌクレアーゼドメインを有するが、ＨＮＨエンドヌクレアーゼドメインは有しておらず、Ｃｐｆ１のＮ末端はＣａｓ９のアルファ－ヘリックス認識ローブ（lobe）を有していない。Ｃｐｆ１のＲｕｖＣ様ドメインが両ＤＮＡ鎖を切断する要因であること、およびＲｕｖＣ様ドメインの不活性化がＣｐｆ１のヌクレアーゼ活性を不活性にすることが、Zetsche et al., Cell, 163, 759-771, 2015（参照により本明細書に組み込まれている）に示されていた。例えば、Francisella novicida Ｃｐｆ１７（配列番号１０）におけるＤ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、またはＤ１２５５Ａに対応する変異は、Ｃｐｆ１のヌクレアーゼ活性を不活性にする。いくつかの態様において、本開示のｄＣｐｆ１は、配列番号１０におけるＤ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、Ｄ１２５５Ａ、Ｄ９１７Ａ／Ｅ１００６Ａ、Ｄ９１７Ａ／Ｄ１２５５Ａ、Ｅ１００６Ａ／Ｄ１２５５Ａ、またはＤ９１７Ａ／Ｅ１００６Ａ／Ｄ１２５５Ａに対応する変異を含む。Ｃｐｆ１のＲｕｖＣドメインを不活性にする任意の変異、例えば、置換変異、欠失、または挿入は、本開示に従って使用され得ることが理解される。

【０２２０】

したがって、いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、ヌクレアーゼ不活性型Ｃｐｆ１（ｄＣｐｆ１）である。いくつかの態様において、ｄＣｐｆ１は、配列番号２６１～２６７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ｄＣｐｆ１は、配列番号１０に対して、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または少なくとも９９．５％同一であるアミノ酸配列を含み、配列番号１０におけるＤ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、Ｄ１２５５Ａ、Ｄ９１７Ａ／Ｅ１００６Ａ、Ｄ９１７Ａ／Ｄ１２５５Ａ、Ｅ１００６Ａ／Ｄ１２５５Ａ、またはＤ９１７Ａ／Ｅ１００６Ａ／Ｄ１２５５Ａに対応する変異を含む。他の細菌種からのＣｐｆ１もまた、本開示に従って用いることができる。

野生型Francisella novicida Ｃｐｆ１（配列番号１０）（Ｄ９１７、Ｅ１００６、およびＤ１２５５に太字および下線を付す）

【数１７】

MSIYQEFVNKYSLSKTLRFELIPQGKTLENIKARGLILDDEKRAKDYKKAKQIIDKYHQFFIEEILSSVCIS
EDLLQNYSDVYFKLKKSDDDNLQKDFKSAKDTIKKQISEYIKDSEKFKNLFNQNLIDAKKGQESDLILW
LKQSKDNGIELFKANSDITDIDEALEIIKSFKGWTTYFKGFHENRKNVYSSNDIPTSIIYRIVDDNLPKFLE
NKAKYESLKDKAPEAINYEQIKKDLAEELTFDIDYKTSEVNQRVFSLDEVFEIANFNNYLNQSGITKFNT
IIGGKFVNGENTKRKGINEYINLYSQQINDKTLKKYKMSVLFKQILSDTESKSFVIDKLEDDSDVVTTMQ
SFYEQIAAFKTVEEKSIKETLSLLFDDLKAQKLDLSKIYFKNDKSLTDLSQQVFDDYSVIGTAVLEYITQ
QIAPKNLDNPSKKEQELIAKKTEKAKYLSLETIKLALEEFNKHRDIDKQCRFEEILANFAAIPMIFDEIAQ
NKDNLAQISIKYQNQGKKDLLQASAEDDVKAIKDLLDQTNNLLHKLKIFHISQSEDKANILDKDEHFYL
VFEECYFELANIVPLYNKIRNYITQKPYSDEKFKLNFENSTLANGWDKNKEPDNTAILFIKDDKYYLGV
MNKKNNKIFDDKAIKENKGEGYKKIVYKLLPGANKMLPKVFFSAKSIKFYNPSEDILRIRNHSTHTKNG
SPQKGYEKFEFNIEDCRKFIDFYKQSISKHPEWKDFGFRFSDTQRYNSIDEFYREVENQGYKLTFENISES
YIDSVVNQGKLYLFQIYNKDFSAYSKGRPNLHTLYWKALFDERNLQDVVYKLNGEAELFYRKQSIPKK
ITHPAKEAIANKNKDNPKKESVFEYDLIKDKRFTEDKFFFHCPITINFKSSGANKFNDEINLLLKEKAND
VHILSI**D**RGERHLAYYTLVDGKGNIIKQDTFNIIGNDRMKTNYHDKLAAIEKDRDSARKDWKKINNIKE
MKEGYLSQVVHEIAKLVIEYNAIVVF**E**DLNFGFKRGRFKVEKQVYQKLEKMLIEKLNYLVFKDNEFDK
TGGVLRAYQLTAPFETFKKMGKQTGIIYYVPAGFTSKICPVTGFVNQLYPKYESVSKSQEFFSKFDKICY
NLDKGYFEFSFDYKNFGDKAAKGKWTIASFGSRLINFRNSDKNHNWDTREVYPTKELEKLLKDYSIEY
GHGECIKAAICGESDKKFFAKLTSVLNTILQMRNSKTGTELDYLISPVADVNGNFFDSRQAPKNMPQDA
DANGAYHIGLKGLMLLGRIKNNQEGKKLNLVIKNEEYFEFVQNRNN

Francisella novicida Ｃｐｆ１ Ｄ９１７Ａ（配列番号２６１）（Ａ９１７、Ｅ１００６、およびＤ１２５５に、太字および下線を付す）

【数１８】

MSIYQEFVNKYSLSKTLRFELIPQGKTLENIKARGLILDDEKRAKDYKKAKQIIDKYHQFFIEEILSSVCIS
EDLLQNYSDVYFKLKKSDDDNLQKDFKSAKDTIKKQISEYIKDSEKFKNLFNQNLIDAKKGQESDLILW
LKQSKDNGIELFKANSDITDIDEALEIIKSFKGWTTYFKGFHENRKNVYSSNDIPTSIIYRIVDDNLPKFLE
NKAKYESLKDKAPEAINYEQIKKDLAEELTFDIDYKTSEVNQRVFSLDEVFEIANFNNYLNQSGITKFNT
IIGGKFVNGENTKRKGINEYINLYSQQINDKTLKKYKMSVLFKQILSDTESKSFVIDKLEDDSDVVTTMQ
SFYEQIAAFKTVEEKSIKETLSLLFDDLKAQKLDLSKIYFKNDKSLTDLSQQVFDDYSVIGTAVLEYITQ
QIAPKNLDNPSKKEQELIAKKTEKAKYLSLETIKLALEEFNKHRDIDKQCRFEEILANFAAIPMIFDEIAQ
NKDNLAQISIKYQNQGKKDLLQASAEDDVKAIKDLLDQTNNLLHKLKIFHISQSEDKANILDKDEHFYL
VFEECYFELANIVPLYNKIRNYITQKPYSDEKFKLNFENSTLANGWDKNKEPDNTAILFIKDDKYYLGV
MNKKNNKIFDDKAIKENKGEGYKKIVYKLLPGANKMLPKVFFSAKSIKFYNPSEDILRIRNHSTHTKNG
SPQKGYEKFEFNIEDCRKFIDFYKQSISKHPEWKDFGFRFSDTQRYNSIDEFYREVENQGYKLTFENISES
YIDSVVNQGKLYLFQIYNKDFSAYSKGRPNLHTLYWKALFDERNLQDVVYKLNGEAELFYRKQSIPKK
ITHPAKEAIANKNKDNPKKESVFEYDLIKDKRFTEDKFFFHCPITINFKSSGANKFNDEINLLLKEKAND
VHILSI**A**RGERHLAYYTLVDGKGNIIKQDTFNIIGNDRMKTNYHDKLAAIEKDRDSARKDWKKINNIKE
MKEGYLSQVVHEIAKLVIEYNAIVVF**E**DLNFGFKRGRFKVEKQVYQKLEKMLIEKLNYLVFKDNEFDK
TGGVLRAYQLTAPFETFKKMGKQTGIIYYVPAGFTSKICPVTGFVNQLYPKYESVSKSQEFFSKFDKICY
NLDKGYFEFSFDYKNFGDKAAKGKWTIASFGSRLINFRNSDKNHNWDTREVYPTKELEKLLKDYSIEY
GHGECIKAAICGESDKKFFAKLTSVLNTILQMRNSKTGTELDYLISPVADVNGNFFDSRQAPKNMPQDA
DANGAYHIGLKGLMLLGRIKNNQEGKKLNLVIKNEEYFEFVQNRNN

Francisella novicida Ｃｐｆ１ Ｅ１００６Ａ（配列番号２６２）（Ｄ９１７、Ａ１００６、およびＤ１２５５に、太字および下線を付す）

【数１９】

MSIYQEFVNKYSLSKTLRFELIPQGKTLENIKARGLILDDEKRAKDYKKAKQIIDKYHQFFIEEILSSVCIS
EDLLQNYSDVYFKLKKSDDDNLQKDFKSAKDTIKKQISEYIKDSEKFKNLFNQNLIDAKKGQESDLILW
LKQSKDNGIELFKANSDITDIDEALEIIKSFKGWTTYFKGFHENRKNVYSSNDIPTSIIYRIVDDNLPKFLE
NKAKYESLKDKAPEAINYEQIKKDLAEELTFDIDYKTSEVNQRVFSLDEVFEIANFNNYLNQSGITKFNT
IIGGKFVNGENTKRKGINEYINLYSQQINDKTLKKYKMSVLFKQILSDTESKSFVIDKLEDDSDVVTTMQ
SFYEQIAAFKTVEEKSIKETLSLLFDDLKAQKLDLSKIYFKNDKSLTDLSQQVFDDYSVIGTAVLEYITQ
QIAPKNLDNPSKKEQELIAKKTEKAKYLSLETIKLALEEFNKHRDIDKQCRFEEILANFAAIPMIFDEIAQ
NKDNLAQISIKYQNQGKKDLLQASAEDDVKAIKDLLDQTNNLLHKLKIFHISQSEDKANILDKDEHFYL
VFEECYFELANIVPLYNKIRNYITQKPYSDEKFKLNFENSTLANGWDKNKEPDNTAILFIKDDKYYLGV
MNKKNNKIFDDKAIKENKGEGYKKIVYKLLPGANKMLPKVFFSAKSIKFYNPSEDILRIRNHSTHTKNG
SPQKGYEKFEFNIEDCRKFIDFYKQSISKHPEWKDFGFRFSDTQRYNSIDEFYREVENQGYKLTFENISES
YIDSVVNQGKLYLFQIYNKDFSAYSKGRPNLHTLYWKALFDERNLQDVVYKLNGEAELFYRKQSIPKK
ITHPAKEAIANKNKDNPKKESVFEYDLIKDKRFTEDKFFFHCPITINFKSSGANKFNDEINLLLKEKAND
VHILSI**D**RGERHLAYYTLVDGKGNIIKQDTFNIIGNDRMKTNYHDKLAAIEKDRDSARKDWKKINNIKE
MKEGYLSQVVHEIAKLVIEYNAIVVF**A**DLNFGFKRGRFKVEKQVYQKLEKMLIEKLNYLVFKDNEFDK
TGGVLRAYQLTAPFETFKKMGKQTGIIYYVPAGFTSKICPVTGFVNQLYPKYESVSKSQEFFSKFDKICY
NLDKGYFEFSFDYKNFGDKAAKGKWTIASFGSRLINFRNSDKNHNWDTREVYPTKELEKLLKDYSIEY
GHGECIKAAICGESDKKFFAKLTSVLNTILQMRNSKTGTELDYLISPVADVNGNFFDSRQAPKNMPQDA
DANGAYHIGLKGLMLLGRIKNNQEGKKLNLVIKNEEYFEFVQNRNN

Francisella novicida Ｃｐｆ１ Ｄ１２５５Ａ（配列番号２６３）（Ｄ９１７、Ｅ１００６、およびＡ１２５５に、太字および下線を付す）

【数２０】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR
KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA
KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN
LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK
YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL
GELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGA
SAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFK
TNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT
LFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVI
EMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQEL
DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK
FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD
FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKA
TAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQ
TGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME
RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLA
SHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENI
IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号

1) (一重下線：HNHドメイン；二重下線：RuvCドメイン)

Francisella novicida Ｃｐｆ１ Ｄ９１７Ａ／Ｅ１００６Ａ（配列番号２６４）（Ａ９１７、Ａ１００６、およびＤ１２５５に、太字および下線を付す）

【数２１】

MSIYQEFVNKYSLSKTLRFELIPQGKTLENIKARGLILDDEKRAKDYKKAKQIIDKYHQFFIEEILSSVCIS
EDLLQNYSDVYFKLKKSDDDNLQKDFKSAKDTIKKQISEYIKDSEKFKNLFNQNLIDAKKGQESDLILW
LKQSKDNGIELFKANSDITDIDEALEIIKSFKGWTTYFKGFHENRKNVYSSNDIPTSIIYRIVDDNLPKFLE
NKAKYESLKDKAPEAINYEQIKKDLAEELTFDIDYKTSEVNQRVFSLDEVFEIANFNNYLNQSGITKFNT
IIGGKFVNGENTKRKGINEYINLYSQQINDKTLKKYKMSVLFKQILSDTESKSFVIDKLEDDSDVVTTMQ
SFYEQIAAFKTVEEKSIKETLSLLFDDLKAQKLDLSKIYFKNDKSLTDLSQQVFDDYSVIGTAVLEYITQ
QIAPKNLDNPSKKEQELIAKKTEKAKYLSLETIKLALEEFNKHRDIDKQCRFEEILANFAAIPMIFDEIAQ
NKDNLAQISIKYQNQGKKDLLQASAEDDVKAIKDLLDQTNNLLHKLKIFHISQSEDKANILDKDEHFYL
VFEECYFELANIVPLYNKIRNYITQKPYSDEKFKLNFENSTLANGWDKNKEPDNTAILFIKDDKYYLGV
MNKKNNKIFDDKAIKENKGEGYKKIVYKLLPGANKMLPKVFFSAKSIKFYNPSEDILRIRNHSTHTKNG
SPQKGYEKFEFNIEDCRKFIDFYKQSISKHPEWKDFGFRFSDTQRYNSIDEFYREVENQGYKLTFENISES
YIDSVVNQGKLYLFQIYNKDFSAYSKGRPNLHTLYWKALFDERNLQDVVYKLNGEAELFYRKQSIPKK
ITHPAKEAIANKNKDNPKKESVFEYDLIKDKRFTEDKFFFHCPITINFKSSGANKFNDEINLLLKEKAND
VHILSI**A**RGERHLAYYTLVDGKGNIIKQDTFNIIGNDRMKTNYHDKLAAIEKDRDSARKDWKKINNIKE
MKEGYLSQVVHEIAKLVIEYNAIVVF**A**DLNFGFKRGRFKVEKQVYQKLEKMLIEKLNYLVFKDNEFDK
TGGVLRAYQLTAPFETFKKMGKQTGIIYYVPAGFTSKICPVTGFVNQLYPKYESVSKSQEFFSKFDKICY
NLDKGYFEFSFDYKNFGDKAAKGKWTIASFGSRLINFRNSDKNHNWDTREVYPTKELEKLLKDYSIEY
GHGECIKAAICGESDKKFFAKLTSVLNTILQMRNSKTGTELDYLISPVADVNGNFFDSRQAPKNMPQDA
DANGAYHIGLKGLMLLGRIKNNQEGKKLNLVIKNEEYFEFVQNRNN

Francisella novicida Ｃｐｆ１ Ｄ９１７Ａ／Ｄ１２５５Ａ（配列番号２６５）（Ａ９１７、Ｅ１００６、およびＡ１２５５に、太字および下線を付す）

【数２２】

MSIYQEFVNKYSLSKTLRFELIPQGKTLENIKARGLILDDEKRAKDYKKAKQIIDKYHQFFIEEILSSVCIS
EDLLQNYSDVYFKLKKSDDDNLQKDFKSAKDTIKKQISEYIKDSEKFKNLFNQNLIDAKKGQESDLILW
LKQSKDNGIELFKANSDITDIDEALEIIKSFKGWTTYFKGFHENRKNVYSSNDIPTSIIYRIVDDNLPKFLE
NKAKYESLKDKAPEAINYEQIKKDLAEELTFDIDYKTSEVNQRVFSLDEVFEIANFNNYLNQSGITKFNT
IIGGKFVNGENTKRKGINEYINLYSQQINDKTLKKYKMSVLFKQILSDTESKSFVIDKLEDDSDVVTTMQ
SFYEQIAAFKTVEEKSIKETLSLLFDDLKAQKLDLSKIYFKNDKSLTDLSQQVFDDYSVIGTAVLEYITQ
QIAPKNLDNPSKKEQELIAKKTEKAKYLSLETIKLALEEFNKHRDIDKQCRFEEILANFAAIPMIFDEIAQ
NKDNLAQISIKYQNQGKKDLLQASAEDDVKAIKDLLDQTNNLLHKLKIFHISQSEDKANILDKDEHFYL
VFEECYFELANIVPLYNKIRNYITQKPYSDEKFKLNFENSTLANGWDKNKEPDNTAILFIKDDKYYLGV
MNKKNNKIFDDKAIKENKGEGYKKIVYKLLPGANKMLPKVFFSAKSIKFYNPSEDILRIRNHSTHTKNG
SPQKGYEKFEFNIEDCRKFIDFYKQSISKHPEWKDFGFRFSDTQRYNSIDEFYREVENQGYKLTFENISES
YIDSVVNQGKLYLFQIYNKDFSAYSKGRPNLHTLYWKALFDERNLQDVVYKLNGEAELFYRKQSIPKK
ITHPAKEAIANKNKDNPKKESVFEYDLIKDKRFTEDKFFFHCPITINFKSSGANKFNDEINLLLKEKAND
VHILSI**A**RGERHLAYYTLVDGKGNIIKQDTFNIIGNDRMKTNYHDKLAAIEKDRDSARKDWKKINNIKE
MKEGYLSQVVHEIAKLVIEYNAIVVF**E**DLNFGFKRGRFKVEKQVYQKLEKMLIEKLNYLVFKDNEFDK
TGGVLRAYQLTAPFETFKKMGKQTGIIYYVPAGFTSKICPVTGFVNQLYPKYESVSKSQEFFSKFDKICY
NLDKGYFEFSFDYKNFGDKAAKGKWTIASFGSRLINFRNSDKNHNWDTREVYPTKELEKLLKDYSIEY
GHGECIKAAICGESDKKFFAKLTSVLNTILQMRNSKTGTELDYLISPVADVNGNFFDSRQAPKNMPQDA
AANGAYHIGLKGLMLLGRIKNNQEGKKLNLVIKNEEYFEFVQNRNN

Francisella novicida Ｃｐｆ１ Ｅ１００６Ａ／Ｄ１２５５Ａ（配列番号２６６）（Ｄ９１７、Ａ１００６、およびＡ１２５５に、太字および下線を付す）

【数２３】

MSIYQEFVNKYSLSKTLRFELIPQGKTLENIKARGLILDDEKRAKDYKKAKQIIDKYHQFFIEEILSSVCIS
EDLLQNYSDVYFKLKKSDDDNLQKDFKSAKDTIKKQISEYIKDSEKFKNLFNQNLIDAKKGQESDLILW
LKQSKDNGIELFKANSDITDIDEALEIIKSFKGWTTYFKGFHENRKNVYSSNDIPTSIIYRIVDDNLPKFLE
NKAKYESLKDKAPEAINYEQIKKDLAEELTFDIDYKTSEVNQRVFSLDEVFEIANFNNYLNQSGITKFNT
IIGGKFVNGENTKRKGINEYINLYSQQINDKTLKKYKMSVLFKQILSDTESKSFVIDKLEDDSDVVTTMQ
SFYEQIAAFKTVEEKSIKETLSLLFDDLKAQKLDLSKIYFKNDKSLTDLSQQVFDDYSVIGTAVLEYITQ
QIAPKNLDNPSKKEQELIAKKTEKAKYLSLETIKLALEEFNKHRDIDKQCRFEEILANFAAIPMIFDEIAQ
NKDNLAQISIKYQNQGKKDLLQASAEDDVKAIKDLLDQTNNLLHKLKIFHISQSEDKANILDKDEHFYL
VFEECYFELANIVPLYNKIRNYITQKPYSDEKFKLNFENSTLANGWDKNKEPDNTAILFIKDDKYYLGV
MNKKNNKIFDDKAIKENKGEGYKKIVYKLLPGANKMLPKVFFSAKSIKFYNPSEDILRIRNHSTHTKNG
SPQKGYEKFEFNIEDCRKFIDFYKQSISKHPEWKDFGFRFSDTQRYNSIDEFYREVENQGYKLTFENISES
YIDSVVNQGKLYLFQIYNKDFSAYSKGRPNLHTLYWKALFDERNLQDVVYKLNGEAELFYRKQSIPKK
ITHPAKEAIANKNKDNPKKESVFEYDLIKDKRFTEDKFFFHCPITINFKSSGANKFNDEINLLLKEKAND
VHILSI**D**RGERHLAYYTLVDGKGNIIKQDTFNIIGNDRMKTNYHDKLAAIEKDRDSARKDWKKINNIKE
MKEGYLSQVVHEIAKLVIEYNAIVVF**A**DLNFGFKRGRFKVEKQVYQKLEKMLIEKLNYLVFKDNEFDK
TGGVLRAYQLTAPFETFKKMGKQTGIIYYVPAGFTSKICPVTGFVNQLYPKYESVSKSQEFFSKFDKICY
NLDKGYFEFSFDYKNFGDKAAKGKWTIASFGSRLINFRNSDKNHNWDTREVYPTKELEKLLKDYSIEY
GHGECIKAAICGESDKKFFAKLTSVLNTILQMRNSKTGTELDYLISPVADVNGNFFDSRQAPKNMPQDA
AANGAYHIGLKGLMLLGRIKNNQEGKKLNLVIKNEEYFEFVQNRNN

Francisella novicida Ｃｐｆ１ Ｄ９１７Ａ／Ｅ１００６Ａ／Ｄ１２５５Ａ（配列番号２６７）（Ａ９１７、Ａ１００６、およびＡ１２５５に、太字および下線を付す）

【数２４】

MSIYQEFVNKYSLSKTLRFELIPQGKTLENIKARGLILDDEKRAKDYKKAKQIIDKYHQFFIEEILSSVCIS
EDLLQNYSDVYFKLKKSDDDNLQKDFKSAKDTIKKQISEYIKDSEKFKNLFNQNLIDAKKGQESDLILW
LKQSKDNGIELFKANSDITDIDEALEIIKSFKGWTTYFKGFHENRKNVYSSNDIPTSIIYRIVDDNLPKFLE
NKAKYESLKDKAPEAINYEQIKKDLAEELTFDIDYKTSEVNQRVFSLDEVFEIANFNNYLNQSGITKFNT
IIGGKFVNGENTKRKGINEYINLYSQQINDKTLKKYKMSVLFKQILSDTESKSFVIDKLEDDSDVVTTMQ
SFYEQIAAFKTVEEKSIKETLSLLFDDLKAQKLDLSKIYFKNDKSLTDLSQQVFDDYSVIGTAVLEYITQ
QIAPKNLDNPSKKEQELIAKKTEKAKYLSLETIKLALEEFNKHRDIDKQCRFEEILANFAAIPMIFDEIAQ
NKDNLAQISIKYQNQGKKDLLQASAEDDVKAIKDLLDQTNNLLHKLKIFHISQSEDKANILDKDEHFYL
VFEECYFELANIVPLYNKIRNYITQKPYSDEKFKLNFENSTLANGWDKNKEPDNTAILFIKDDKYYLGV
MNKKNNKIFDDKAIKENKGEGYKKIVYKLLPGANKMLPKVFFSAKSIKFYNPSEDILRIRNHSTHTKNG
SPQKGYEKFEFNIEDCRKFIDFYKQSISKHPEWKDFGFRFSDTQRYNSIDEFYREVENQGYKLTFENISES
YIDSVVNQGKLYLFQIYNKDFSAYSKGRPNLHTLYWKALFDERNLQDVVYKLNGEAELFYRKQSIPKK
ITHPAKEAIANKNKDNPKKESVFEYDLIKDKRFTEDKFFFHCPITINFKSSGANKFNDEINLLLKEKAND
VHILSI**A**RGERHLAYYTLVDGKGNIIKQDTFNIIGNDRMKTNYHDKLAAIEKDRDSARKDWKKINNIKE
MKEGYLSQVVHEIAKLVIEYNAIVVF**A**DLNFGFKRGRFKVEKQVYQKLEKMLIEKLNYLVFKDNEFDK
TGGVLRAYQLTAPFETFKKMGKQTGIIYYVPAGFTSKICPVTGFVNQLYPKYESVSKSQEFFSKFDKICY
NLDKGYFEFSFDYKNFGDKAAKGKWTIASFGSRLINFRNSDKNHNWDTREVYPTKELEKLLKDYSIEY
GHGECIKAAICGESDKKFFAKLTSVLNTILQMRNSKTGTELDYLISPVADVNGNFFDSRQAPKNMPQDA
AANGAYHIGLKGLMLLGRIKNNQEGKKLNLVIKNEEYFEFVQNRNN

【０２２１】

いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、Acidaminoccous種からのＣｐｆ１タンパク質である（ＡｓＣｐｆ１）。Acidaminococcus種からのＣｐｆ１タンパク質は、先に記載されており、当業者には明らかであろう。例示的なAcidaminococcus Ｃｐｆ１タンパク質（ＡｓＣｐｆ１）として、限定することなく、本明細書において提供されるＡｓＣｐｆ１タンパク質のうちのいずれかが挙げられる。

【０２２２】

野生型ＡｓＣｐｆ１－残基Ｒ９１２を太い下線において示し、残基６６１～６６７を斜体および下線において示す。

【数２５】

TQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQL
DWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNG
KVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRL
ITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNL
AIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNEL
NSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAG
KELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTMLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEF
SARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLY
YLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNF
IEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQ
YKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPE
NLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLS
DEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGE
RNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVD
LMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQ
FTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFK
MNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLE
EKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNP
EWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN (配列番号 1060)

【０２２３】

ＡｓＣｐｆ１（Ｒ９１２Ａ）－残基Ａ９１２を太い下線において示し、残基６６１～６６７を斜体および下線において示す。

【数２６】

TQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQL
DWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNG
KVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRL
ITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNL
AIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNEL
NSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAG
KELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTMLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEF
SARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLY
YLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNF
IEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQ
YKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPE
NLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLS
DEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGE

ANLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVD
LMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQ
FTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFK
MNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLE
EKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNP
EWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN (配列番号 1061)

【０２２４】

いくつかの態様において、核酸によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質は、Lachnospiraceae種からのＣｐｆ１タンパク質である（ＬｂＣｐｆ１）。Lachnospiraceae種からのＣｐｆ１タンパク質は、先に記載されており、当業者には明らかであろう。例示的なLachnospiraceae Ｃｐｆ１タンパク質（ＬｂＣｐｆ１）として、限定することなく、本明細書において提供されるＬｂＣｐｆ１タンパク質のうちのいずれかが挙げられる。

【０２２５】

野生型ＬｂＣｐｆ１

【数２７】

MSKLEKFTNCYSLSKTLRFKAIPVGKTQENIDNKRLLVEDEKRAEDYKGVKKLLDRYYLSFINDVLHSI
KLKNLNNYISLFRKKTRTEKENKELENLEINLRKEIAKAFKGNEGYKSLFKKDIIETILPEFLDDKDEIAL
VNSFNGFTTAFTGFFDNRENMFSEEAKSTSIAFRCINENLTRYISNMDIFEKVDAIFDKHEVQEIKEKILN
SDYDVEDFFEGEFFNFVLTQEGIDVYNAIIGGFVTESGEKIKGLNEYINLYNQKTKQKLPKFKPLYKQVL
SDRESLSFYGEGYTSDEEVLEVFRNTLNKNSEIFSSIKKLEKLFKNFDEYSSAGIFVKNGPAISTISKDIFG
EWNVIRDKWNAEYDDIHLKKKAVVTEKYEDDRRKSFKKIGSFSLEQLQEYADADLSVVEKLKEIIIQK
VDEIYKVYGSSEKLFDADFVLEKSLKKNDAVVAIMKDLLDSVKSFENYIKAFFGEGKETNRDESFYGD
FVLAYDILLKVDHIYDAIRNYVTQKPYSKDKFKLYFQNPQFMGGWDKDKETDYRATILRYGSKYYLAI
MDKKYAKCLQKIDKDDVNGNYEKINYKLLPGPNKMLPKVFFSKKWMAYYNPSEDIQKIYKNGTFKK
GDMFNLNDCHKLIDFFKDSISRYPKWSNAYDFNFSETEKYKDIAGFYREVEEQGYKVSFESASKKEVD
KLVEEGKLYMFQIYNKDFSDKSHGTPNLHTMYFKLLFDENNHGQIRLSGGAELFMRRASLKKEELVVH
PANSPIANKNPDNPKKTTTLSYDVYKDKRFSEDQYELHIPIAINKCPKNIFKINTEVRVLLKHDDNPYVI
GIDRGERNLLYIVVVDGKGNIVEQYSLNEIINNFNGIRIKTDYHSLLDKKEKERFEARQNWTSIENIKELK
AGYISQVVHKICELVEKYDAVIALEDLNSGFKNSRVKVEKQVYQKFEKMLIDKLNYMVDKKSNPCAT
GGALKGYQITNKFESFKSMSTQNGFIFYIPAWLTSKIDPSTGFVNLLKTKYTSIADSKKFISSFDRIMYVP
EEDLFEFALDYKNFSRTDADYIKKWKLYSYGNRIRIFRNPKKNNVFDWEEVCLTSAYKELFNKYGINY
QQGDIRALLCEQSDKAFYSSFMALMSLMLQMRNSITGRTDVDFLISPVKNSDGIFYDSRNYEAQENAIL
PKNADANGAYNIARKVLWAIGQFKKAEDEKLDKVKIAISNKEWLEYAQTSVKH（配列番号
1062)

【０２２６】

ＬｂＣｐｆ１（Ｒ８３６Ａ）

【数２８】

MSKLEKFTNCYSLSKTLRFKAIPVGKTQENIDNKRLLVEDEKRAEDYKGVKKLLDRYYLSFINDVLHSI
KLKNLNNYISLFRKKTRTEKENKELENLEINLRKEIAKAFKGNEGYKSLFKKDIIETILPEFLDDKDEIAL
VNSFNGFTTAFTGFFDNRENMFSEEAKSTSIAFRCINENLTRYISNMDIFEKVDAIFDKHEVQEIKEKILN
SDYDVEDFFEGEFFNFVLTQEGIDVYNAIIGGFVTESGEKIKGLNEYINLYNQKTKQKLPKFKPLYKQVL
SDRESLSFYGEGYTSDEEVLEVFRNTLNKNSEIFSSIKKLEKLFKNFDEYSSAGIFVKNGPAISTISKDIFG
EWNVIRDKWNAEYDDIHLKKKAVVTEKYEDDRRKSFKKIGSFSLEQLQEYADADLSVVEKLKEIIIQK
VDEIYKVYGSSEKLFDADFVLEKSLKKNDAVVAIMKDLLDSVKSFENYIKAFFGEGKETNRDESFYGD
FVLAYDILLKVDHIYDAIRNYVTQKPYSKDKFKLYFQNPQFMGGWDKDKETDYRATILRYGSKYYLAI
MDKKYAKCLQKIDKDDVNGNYEKINYKLLPGPNKMLPKVFFSKKWMAYYNPSEDIQKIYKNGTFKK
GDMFNLNDCHKLIDFFKDSISRYPKWSNAYDFNFSETEKYKDIAGFYREVEEQGYKVSFESASKKEVD
KLVEEGKLYMFQIYNKDFSDKSHGTPNLHTMYFKLLFDENNHGQIRLSGGAELFMRRASLKKEELVVH
PANSPIANKNPDNPKKTTTLSYDVYKDKRFSEDQYELHIPIAINKCPKNIFKINTEVRVLLKHDDNPYVI
GIDRGEANLLYIVVVDGKGNIVEQYSLNEIINNFNGIRIKTDYHSLLDKKEKERFEARQNWTSIENIKEL
KAGYISQVVHKICELVEKYDAVIALEDLNSGFKNSRVKVEKQVYQKFEKMLIDKLNYMVDKKSNPCA
TGGALKGYQITNKFESFKSMSTQNGFIFYIPAWLTSKIDPSTGFVNLLKTKYTSIADSKKFISSFDRIMYV
PEEDLFEFALDYKNFSRTDADYIKKWKLYSYGNRIRIFRNPKKNNVFDWEEVCLTSAYKELFNKYGIN
YQQGDIRALLCEQSDKAFYSSFMALMSLMLQMRNSITGRTDVDFLISPVKNSDGIFYDSRNYEAQENAI
LPKNADANGAYNIARKVLWAIGQFKKAEDEKLDKVKIAISNKEWLEYAQTSVKH（配列番号
1063）

【０２２７】

ＬｂＣｐｆ１（Ｒ１１３８Ａ）

【数２９】

MSKLEKFTNCYSLSKTLRFKAIPVGKTQENIDNKRLLVEDEKRAEDYKGVKKLLDRYYLSFINDVLHSI
KLKNLNNYISLFRKKTRTEKENKELENLEINLRKEIAKAFKGNEGYKSLFKKDIIETILPEFLDDKDEIAL
VNSFNGFTTAFTGFFDNRENMFSEEAKSTSIAFRCINENLTRYISNMDIFEKVDAIFDKHEVQEIKEKILN
SDYDVEDFFEGEFFNFVLTQEGIDVYNAIIGGFVTESGEKIKGLNEYINLYNQKTKQKLPKFKPLYKQVL
SDRESLSFYGEGYTSDEEVLEVFRNTLNKNSEIFSSIKKLEKLFKNFDEYSSAGIFVKNGPAISTISKDIFG
EWNVIRDKWNAEYDDIHLKKKAVVTEKYEDDRRKSFKKIGSFSLEQLQEYADADLSVVEKLKEIIIQK
VDEIYKVYGSSEKLFDADFVLEKSLKKNDAVVAIMKDLLDSVKSFENYIKAFFGEGKETNRDESFYGD
FVLAYDILLKVDHIYDAIRNYVTQKPYSKDKFKLYFQNPQFMGGWDKDKETDYRATILRYGSKYYLAI
MDKKYAKCLQKIDKDDVNGNYEKINYKLLPGPNKMLPKVFFSKKWMAYYNPSEDIQKIYKNGTFKK
GDMFNLNDCHKLIDFFKDSISRYPKWSNAYDFNFSETEKYKDIAGFYREVEEQGYKVSFESASKKEVD
KLVEEGKLYMFQIYNKDFSDKSHGTPNLHTMYFKLLFDENNHGQIRLSGGAELFMRRASLKKEELVVH
PANSPIANKNPDNPKKTTTLSYDVYKDKRFSEDQYELHIPIAINKCPKNIFKINTEVRVLLKHDDNPYVI
GIDRGERNLLYIVVVDGKGNIVEQYSLNEIINNFNGIRIKTDYHSLLDKKEKERFEARQNWTSIENIKELK
AGYISQVVHKICELVEKYDAVIALEDLNSGFKNSRVKVEKQVYQKFEKMLIDKLNYMVDKKSNPCAT
GGALKGYQITNKFESFKSMSTQNGFIFYIPAWLTSKIDPSTGFVNLLKTKYTSIADSKKFISSFDRIMYVP
EEDLFEFALDYKNFSRTDADYIKKWKLYSYGNRIRIFRNPKKNNVFDWEEVCLTSAYKELFNKYGINY
QQGDIRALLCEQSDKAFYSSFMALMSLMLQMANSITGRTDVDFLISPVKNSDGIFYDSRNYEAQENAIL
PKNADANGAYNIARKVLWAIGQFKKAEDEKLDKVKIAISNKEWLEYAQTSVKH（配列番号
1064)

【０２２８】

いくつかの態様において、Ｃｐｆ１タンパク質は、無能化された（crippled）Ｃｐｆ１タンパク質である。本明細書において用いられる場合、「無能化Ｃｐｆ１」タンパク質は、野生型Ｃｐｆ１タンパク質と比較して減弱化されたヌクレアーゼ活性を有するＣｐｆ１タンパク質である。いくつかの態様において、無能化Ｃｐｆ１タンパク質は、優先的に、非標的鎖よりも効率的に標的鎖を切断する。例えば、Ｃｐｆ１タンパク質は、優先的に、二本鎖核酸分子のうちの編集されるべきヌクレオチドが存在する鎖を切断する。いくつかの態様において、無能化Ｃｐｆ１タンパク質は、優先的に、標的鎖よりも効率的に非標的鎖を切断する。例えば、Ｃｐｆ１タンパク質は、優先的に、二本鎖核酸分子のうちの編集されるべきヌクレオチドが存在しない鎖を切断する。いくつかの態様において、無能化Ｃｐｆ１タンパク質は、優先的に、それが非標的鎖を切断するよりも少なくとも５％より効率的に、標的鎖を切断する。いくつかの態様において、無能化Ｃｐｆ１タンパク質は、優先的に、それが非標的鎖を切断するよりも、少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または少なくとも１００％さらに効率的に、標的鎖を切断する。

【０２２９】

いくつかの態様において、無能化Ｃｐｆ１タンパク質は、天然に存在しないＣｐｆ１タンパク質である。いくつかの態様において、無能化Ｃｐｆ１タンパク質は、野生型Ｃｐｆ１タンパク質と比較して、１つ以上の変異を含む。いくつかの態様において、無能化Ｃｐｆ１タンパク質は、野生型Ｃｐｆ１タンパク質と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の変異を含む。いくつかの態様において、無能化Ｃｐｆ１タンパク質は、配列番号７６３において、または別のＣｐｆ１タンパク質における対応するアミノ酸において記載されるように、Ｒ８３６Ａ変異を含む。同様の結果を達成するために、配列番号７６３のＲ８３６Ａと相同な残基（例えば、対応するアミノ酸）を含むＣｐｆ１をまた、変異させるこ

とができることが、理解されるべきである。いくつかの態様において、無能化Ｃｐｆ１タンパク質は、配列番号７６３において、または別のＣｐｆ１タンパク質における対応するアミノ酸において記載されるようなＲ１１３８Ａ変異を含む。いくつかの態様において、無能化Ｃｐｆ１タンパク質は、配列番号７６２において、または別のＣｐｆ１タンパク質における対応するアミノ酸において記載されるようなＲ９１２Ａ変異を含む。いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、配列番号７６３（ＬｂＣｐｆ１）の残基Ｒ８３８および配列番号７６２（ＡｓＣｐｆ１）の残基Ｒ９１２は、対応する（例えば相同な）残基の例である。例えば、配列番号７６２と７６３との間のアラインメントの一部は、Ｒ９１２とＲ８３８とが対応する残基であることを示す。

【０２３０】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるＣｐｆ１タンパク質のうちのいずれかは、１つ以上のアミノ酸の欠失を含む。いくつかの態様において、本明細書において提供されるＣｐｆ１タンパク質のうちのいずれかは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のアミノ酸の欠失を含む。いかなる特定の理論にも拘束されることは望まないが、Ｃｐｆ１においてはらせん領域が存在し、これは、ＡｓＣｐｆ１（配列番号７６２）の残基６６１～６６７を含み、これは、Ｃｐｆ１に融合しているデアミナーゼ（例えばＡＰＯＢＥＣ）の機能を妨害し得る。この領域は、アミノ酸配列ＫＫＴＧＤＱＫを含む。したがって、本開示の側面は、Ｃｐｆ１中のこのらせん領域を妨害する変異（例えば欠失）を含むＣｐｆ１タンパク質を提供する。いくつかの態様において、Ｃｐｆ１タンパク質は、配列番号７６２における以下の残基の１つ以上の欠失、または別のＣｐｆ１タンパク質における１つ以上の対応する欠失を含む：Ｋ６６１、Ｋ６６２、Ｔ６６３、Ｇ６６４、Ｄ６６５、Ｑ６６６、およびＫ６６７。いくつかの態様において、Ｃｐｆ１タンパク質は、配列番号７６２におけるＴ６６３およびＤ６６５の欠失、または別のＣｐｆ１タンパク質における対応する欠失を含む。いくつかの態様において、Ｃｐｆ１タンパク質は、配列番号７６２におけるＫ６６２、Ｔ６６３、Ｄ６６５、およびＱ６６６の欠失、または別のＣｐｆ１タンパク質における対応する欠失を含む。いくつかの態様において、Ｃｐｆ１タンパク質は、配列番号７６２におけるＫ６６１、Ｋ６６２、Ｔ６６３、Ｄ６６５、Ｑ６６６およびＫ６６７の欠失、または別のＣｐｆ１タンパク質における対応する欠失を含む。

【０２３１】

ＡｓＣｐｆ１（Ｔ６６３およびＤ６６５の欠失）

【数３０】

TQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQL
DWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNG
KVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRL
ITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNL
AIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNEL
NSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAG
KELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTMLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEF
SARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLY
YLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNF
IEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKGQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQY
KDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPEN
LAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSD
EARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGER
NLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDL
MIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQF
TSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFK
MNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLE
EKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNP
EWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN（配列番号 1065）

【０２３２】

ＡｓＣｐｆ１（Ｋ６６２、Ｔ６６３、Ｄ６６５およびＱ６６６の欠失）

【数３１】

TQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQL
DWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNG
KVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRL
ITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNL
AIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNEL
NSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAG
KELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTMLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEF
SARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLY
YLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNF
IEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKGKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDL
GEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAK
TSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEAR
ALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLI
YITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMI
HYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTS
FAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMN
RNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKG
IVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWP
MDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN（配列番号　1066）

【０２３３】

ＡｓＣｐｆ１（Ｋ６６１、Ｋ６６２、Ｔ６６３、Ｄ６６５、Ｑ６６６およびＫ６６７の欠失）

【数３２】

TQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQL
DWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNG
KVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRL
ITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNL
AIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNEL
NSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAG
KELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTMLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEF
SARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLY
YLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNF
IEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAGGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGE
YYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTS
IKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARAL
LPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYIT
VIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQ
AVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAK
MGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNL
SFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVF
RDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMD
ADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN（配列番号　1067）

【０２３４】

いくつかの態様において、本開示のガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、ＰＡＭ配列に対して必要性を有しない。かかるガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質の一例は、Natronobacterium gregoryiからのアルゴノートタンパク質であってよい（ＮｇＡｇｏ）。ＮｇＡｇｏは、ｓｓＤＮＡガイド型エンドヌクレアーゼである。ＮｇＡｇｏは、約２４ヌクレオチドの５’がリン酸化されたｓｓＤＮＡ（ｇＤＮＡ）に結合してそれをその標的部位へと誘導し、ｇＤＮＡにおいてＤＮＡ二本鎖切断を作製するであろう。Ｃａｓ９とは対照的に、ＮｇＡｇｏ－ｇＤＮＡ系は、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を必要としない。ヌクレアーゼ不活性型ＮｇＡｇｏ（ｄＮｇＡｇｏ）を用いることにより、標的とすることができるコドンを著しく拡大することができる。ＮｇＡｇｏの特徴づけおよび使用は、Gao et al., Nat Biotechnol. Epub 2016 May 2. PubMed PMID：27136078；Swarts et al., Nature. 507（7491）（2014）：258-61；およびSwarts et al., Nucleic Acids Res. 43（10）（2015）：5120-9において記載されており、これらの各々は、本明細書において参考として援用される。Natronobacterium gregoryiアルゴノートの配列を、配列番号２７０において提供する。

野生型Natronobacterium gregoryiアルゴノート（配列番号２７０）

【数３３】

MTVIDLDSTTTADELTSGHTYDISVTLTGVYDNTDEQHPRMSLAFEQDNGERRYITL
WKNTTPKDVFTYDYATGSTYIFTNIDYEVKDGYENLTATYQTTVENATAQEVGTTD
EDETFAGGEPLDHHLDDALNETPDDAETESDSGHVMTSFASRDQLPEWTLHTYTLT
ATDGAKTDTEYARRTLAYTVRQELYTDHDAAPVATDGLMLLTPEPLGETPLDLDCG
VRVEADETRTLDYTTAKDRLLARELVEEGLKRSLWDDYLVRGIDEVLSKEPVLTCD
EFDLHERYDLSVEVGHSGRAYLHINFRHRFVPKLTLADIDDDNIYPGLRVKTTYRPR
RGHIVWGLRDECATDSLNTLGNQSVVAYHRNNQTPINTDLLDAIEAADRRVVETRR
QGHGDDAVSFPQELLAVEPNTHQIKQFASDGFHQQARSKTRLSASRCSEKAQAFAER
LDPVRLNGSTVEFSSEFFTGNNEQQLRLLYENGESVLTFRDGARGAHPDETFSKGIVN
PPESFEVAVVLPEQQADTCKAQWDTMADLLNQAGAPPTRSETVQYDAFSSPESISLN
VAGAIDPSEVDAAFVVLPPDQEGFADLASPTETYDELKKALANMGIYSQMAYFDRF
RDAKIFYTRNVALGLLAAAGGVAFTTEHAMPGDADMFIGIDVSRSYPEDGASGQINI
AATATAVYKDGTILGHSSTRPQLGEKLQSTDVRDIMKNAILGYQQVTGESPTHIVIHR
DGFMNEDLDPATEFLNEQGVEYDIVEIRKQPQTRLLAVSDVQYDTPVKSIAAINQNEP
RATVATFGAPEYLATRDGGGLPRPIQIERVAGETDIETLTRQVYLLSQSHIQVHNSTA
RLPITTAYADQASTHATKGYLVQTGAFESNVGFL

【０２３５】

本明細書にさらに提供されるのは、緩やかなＰＡＭ要件を有するＣａｓ９バリアントである（PAMless Ｃａｓ９）。PAMless Ｃａｓ９は、配列番号１において提供されるようなStreptococcus pyogenes Ｃａｓ９と比較して、その３’末端において古典的ＰＡＭ（例えばＮＧＧ）を含まない標的配列に対して、増大した活性、例えば、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも５０倍、少なくとも１００倍、少なくとも５００倍、少なくとも１，０００倍、少なくとも５，０００倍、少なくとも１０，０００倍、少なくとも５０，０００倍、少なくとも１００，０００倍、少なくとも５００，０００倍、または少なくとも１，０００，０００倍、増大した活性を示す。かかる緩やかなＰＡＭ要件を有するＣａｓ９バリアントは、米国仮出願62/245828、62/279346、62/311763、62/322178、および62/357332に記載されている；これらの各々は、本明細書において参考として援用される。いくつかの態様において、本開示において有用なｄＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼは、ＰＡＭ要件を緩和する変異、例えば、配列番号１におけるＡ２６２Ｔ、Ｋ２９４Ｒ、Ｓ４０９Ｉ、Ｅ４８０Ｋ、Ｅ５４３Ｄ、Ｍ６９４ＩまたはＥ１２１９Ｖに対応する変異を、さらに含んでもよい。

【０２３６】

本明細書において記載される核酸塩基エディターにおける使用のために好適な他の非限定的な例示的なＣａｓ９バリアント（ｄＣａｓ９、Ｃａｓ９ニッカーゼ、および代替的なＰＡＭ要件を有するＣａｓ９バリアントを含む）、およびそれらのそれぞれの配列を、以下に提供する。

VRER-nCas9 (D10A/D1135V/G1218R/R1335E/T1337R) S. pyogenesＣａｓ９ニッカーゼ

【数３４】

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR
KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA
KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN
LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK
YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL
GELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGA
SAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFK
TNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT
LFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVI
EMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQEL
DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK
FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD
FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKA
TAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQ
TGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME
RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASARELQKGNELALPSKYVNFLYLA
SHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENI
IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKEYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD（配列番号
821）（一重下線：HNHドメイン；二重下線：RuvCドメイン）

VQR-nCas9（D10A/D1135V/R1335Q/T1337R）S．pyogenesＣａｓ９ニッカーゼ

【数３５】

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR
KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA
KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN
LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK
YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL
GELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGA
SAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFK
TNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT
LFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVI
EMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQEL
DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK
FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD
FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKA
TAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQ
TGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME
RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLA
SHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENI
IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号
822) (一重下線：HNHドメイン；二重下線：RuvCドメイン)

EQR-nCas9 (D10A/D1135E/R1335Q/T1337R) S. pyogenes Ｃａｓ９ニッカーゼ

【数３６】

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR
KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA
KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDN
LLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK
YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL
GELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGA
SAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFK
TNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT
LFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVI
EMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQEL
DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK
FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD
FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKA
TAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQ
TGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFESPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME
RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLA
SHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENI
IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号
823) (一重下線：HNHドメイン；二重下線：RuvCドメイン)

KKH-nCas9 (D10A/E782K/N968K/R1015H) S. aureusＣａｓ９ニッカーゼ

【数３７】

MKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKK
LLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQI
SRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLE
TRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENE
KLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIEN
AELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIA
IFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQK
MINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIP
RSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEER
DINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGY
KHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFK
DYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDP
QTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSR
NKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYKN
DLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYE
VKSKKHPQIIKKG (配列番号 268)

Streptococcus thermophilus ＣＲＩＳＰＲ１ Ｃａｓ９（Ｓｔ１Ｃａｓ９）ニッカーゼ（

Ｄ９Ａ）

【数３８】

MSDLVLGLAIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQGRRLTRRKKHRRVRLNRL
FEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFIALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSIGDYAQIVK
ENSKQLETKTPGQIQLERYQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDE
FINRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEFRAAKASYTAQEFNL
LNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAKLFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHT
FEAYRKMKTLETLDIEQMDRETLDKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANS
SIFGKGWHNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIYNPVVAKSVR
QAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKANKDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSV
FHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYTGKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQE
KGQRTPYQALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLVDTRYASR
VVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYHHHAVDALIIAASSQLNLWKKQKN
TLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVFKAPYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYAT
RQAKVGKDKADETYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPNKQI
NEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLGNHIDITPKDSNNKVVLQSVSPWR
ADVYFNKTTGKYEILGLKYADLQFEKGTGTYKISQEKYNDIKKKEGVDSDSEFKFTLYKNDLLLVKDT
ETKEQQLFRFLSRTMPKQKHYVELKPYDKQKFEGGEALIKVLGNVANSGQCKKGLGKSNISIYKVRTD
VLGNQHIIKNEGDKPKLDF (配列番号 269)

Streptococcus thermophilus ＣＲＩＳＰＲ３Ｃａｓ９（Ｓｔ３Ｃａｓ９）ニッカーゼ（Ｄ１０Ａ）

【数３９】

MTKPYSIGLAIGTNSVGWAVITDNYKVPSKKMKVLGNTSKKYIKKNLLGVLLFDSGITAEGRRLKRTA
RRRYTRRRNRILYLQEIFSTEMATLDDAFFQRLDDSFLVPDDKRDSKYPIFGNLVEEKVYHDEFPTIYHL
RKYLADSTKKADLRLVYLALAHMIKYRGHFLIEGEFNSKNNDIQKNFQDFLDTYNAIFESDLSLENSKQ
LEEIVKDKISKLEKKDRILKLFPGEKNSGIFSEFLKLIVGNQADFRKCFNLDEKASLHFSKESYDEDLETL
LGYIGDDYSDVFLKAKKLYDAILLSGFLTVTDNETEAPLSSAMIKRYNEHKEDLALLKEYIRNISLKTYN
EVFKDDTKNGYAGYIDGKTNQEDFYVYLKNLLAEFEGADYFLEKIDREDFLRKQRTFDNGSIPYQIHLQ
EMRAILDKQAKFYPFLAKNKERIEKILTFRIPYYVGPLARGNSDFAWSIRKRNEKITPWNFEDVIDKESS
AEAFINRMTSFDLYLPEEKVLPKHSLLYETFNVYNELTKVRFIAESMRDYQFLDSKQKKDIVRLYFKDK
RKVTDKDIIEYLHAIYGYDGIELKGIEKQFNSSLSTYHDLLNIINDKEFLDDSSNEAIIEEIIHTLTIFEDRE
MIKQRLSKFENIFDKSVLKKLSRRHYTGWGKLSAKLINGIRDEKSGNTILDYLIDDGISNRNFMQLIHDD
ALSFKKKIQKAQIIGDEDKGNIKEVVKSLPGSPAIKKGILQSIKIVDELVKVMGGRKPESIVVEMARENQ
YTNQGKSNSQQRLKRLEKSLKELGSKILKENIPAKLSKIDNNALQNDRLYLYYLQNGKDMYTGDDLDI
DRLSNYDIDHIIPQAFLKDNSIDNKVLVSSASNRGKSDDFPSLEVVKKRKTFWYQLLKSKLISQRKFDNL
TKAERGGLLPEDKAGFIQRQLVETRQITKHVARLLDEKFNNKKDENNRAVRTVKIITLKSTLVSQFRKD
FELYKVREINDFHHAHDAYLNAVIASALLKKYPKLEPEFVYGDYPKYNSFRERKSATEKVYFYSNIMNI
FKKSISLADGRVIERPLIEVNEETGESVWNKESDLATVRRVLSYPQVNVVKKVEEQNHGLDRGKPKGL
FNANLSSKPKPNSNENLVGAKEYLDPKKYGGYAGISNSFAVLVKGTIEKGAKKKITNVLEFQGISILDRI
NYRKDKLNFLLEKGYKDIELIIELPKYSLFELSDGSRRMLASILSTNNKRGEIHKGNQIFLSQKFVKLLYH
AKRISNTINENHRKYVENHKKEFEELFYYILEFNENYVGAKKNGKLLNSAFQSWQNHSIDELCSSFIGPT
GSERKGLFELTSRGSAADFEFLGVKIPRYRDYTPSSLLKDATLIHQSVTGLYETRIDLAKLGEG (配列番号
824)

【０２３７】

いくつかの態様において、本開示において有用な核酸塩基エディターは、（ｉ）ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン；および（ｉｉ）デアミナーゼドメインを含む。いくつかの態様において、融合タンパク質のデアミナーゼドメインは、シトシンデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ１デアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ラットＡＰＯＢＥＣ１である。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ヒトＡＰＯＢＥＣ１である。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ２デアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ３Ａデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ３Ｂデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ３Ｃデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ３Ｄデアミナーゼである。いくつかの態様においては、ＡＰＯＢＥＣ３Ｆデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ３Ｇデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ３Ｈデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ＡＰＯＢＥＣ４デアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、活性化誘導デアミナーゼ（ＡＩＤ）である。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ヤツメウナギＣＤＡ１（ｐｍＣＤＡ１）である。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ヒトＡＰＯＢＥＣ３Ｇまたはその機能的フラグメントである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ヒトＡＰＯＢＥＣ３Ｇにおける Ｄ３１６Ｒ／Ｄ３１７Ｒ変異に対応する変異を含む、ＡＰＯＢＥＣ３Ｇバリアントである。例示的に、本開示の方法により用いることができる非限定的なシトシンデアミナーゼ配列を、以下の例１において提供する。

【０２３８】

いくつかの態様において、シトシンデアミナーゼは、野生型デアミナーゼまたは配列番号２７１～２９２、３０３、および１０７２～１０８３において記載されるようなデアミナーゼである。いくつかの態様において、本明細書において提供される融合タンパク質のシトシンデアミナーゼドメインは、デアミナーゼおよびデアミナーゼに対して相同なタンパク質の、フラグメントを含む。例えば、いくつかの態様において、デアミナーゼドメインは、配列番号２７１～２９２、３０３、および１０７２～１０８３のいずれかにおいて記載されるアミノ酸配列のフラグメントを含んでもよい。いくつかの態様において、デアミナーゼドメインは、配列番号２７１～２９２、３０３、および１０７２～１０８３のいずれかにおいて記載されるアミノ酸配列に対して相同なアミノ酸配列、または配列番号２７１～２９２、３０３、および１０７２～１０８３のいずれかにおいて記載されるアミノ酸配列のフラグメントに対して相同なアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、デアミナーゼ、デアミナーゼのフラグメント、もしくはデアミナーゼの相同体を含むタンパク質またはデアミナーゼは、「デアミナーゼバリアント」として言及される。デアミナーゼバリアントは、デアミナーゼ、またはそのフラグメントに対して相同性を共有する。例えば、デアミナーゼバリアントは、野生型デアミナーゼまたは配列番号２７１～２９２、３０３、および１０７２～１０８３のうちのいずれかにおいて記載されるデアミナーゼに対して、少なくとも約７０％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９６％同一、少なくとも約９７％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一、少なくとも約９９．５％同一、または少なくとも約９９．９％である。いくつかの態様において、デアミナーゼバリアントは、フラグメントが、野生型デアミナーゼまたは配列番号２７１～２９２、３０３、および１０７２～１０８３のうちのいずれかにおいて記載されるようなデアミナーゼの対応するフラグメントに対して、少なくとも約７０％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９６％同一、少なくとも約９７％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一、少なくとも約９９．５％同一、または少なくとも約９９．９％となるような、デアミナーゼのフラグメントを含む。いくつかの態様において、シトシンデアミナーゼは、配列番号２９１または配列番号２９２において記載されるようなＡＰＯＢＥＣ３Ｇバリアントに対して、少なくとも約７０％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９６％同一、少なくとも約９７％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一、少なくとも約９９．５％同一、または少なくとも約９９．９％同一であり、配列番号２９０におけるＤ３１６Ｅ／Ｄ３１７Ｒ変異に対応する変異を含む。

【０２３９】

いくつかの態様において、シトシンデアミナーゼドメインは、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのＮ末端に融合している。例えば、融合タンパク質は、NH_2－［シトシンデアミナーゼ］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン］－ＣＯＯＨの構造を有していてもよい。上の一般的構造において用いられる『］－［』は、任意のリンカー配列の存在を示す。用語「リンカー」とは、本明細書において用いられる場合、２つの分子または部分、例えば融合タンパク質の２つのドメイン、例えばｄＣａｓ９ドメインおよびシトシンデアミナーゼドメインなどを連結する化学基または分子を指す。典型的には、リンカーは、２つの基、分子、または他の部分の間に位置するか、またはこれらに隣接し、共有結合を介して各々に連結し、それにより２つを連結する。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸または複数のアミノ酸（例えば、ペプチドまたはタンパク質）である。いくつかの態様において、リンカーは、有機の分子、基、ポリマー、または化学部分である。いくつかの態様において、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、１００～１５０、または１５０～２００アミノ酸長である。より長いまたはより短

いリンカーもまた、企図される。

【０２４０】

いくつかの態様において、シトシンデアミナーゼドメインとＣａｓ９ドメインとは、リンカーを介して互いに融合する。デアミナーゼドメイン（例えば、ＡＰＯＢＥＣ１）とＣａｓ９ドメインとの間で、多様なリンカーの長さおよび可動性を用いることができる（例えば、非常に可動性が高いリンカー：形態（ＧＧＧＳ）$_n$（配列番号３３７）、（ＧＧＧＧＳ）$_n$（配列番号３０８）、（ＧＧＳ）$_n$（配列番号７８４）、および（Ｇ）$_n$（配列番号７８３）から、より強固なリンカー：形態（ＥＡＡＡＫ）$_n$（配列番号３０９）、ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）（例えば、Guilinger et, al., Nat. Biotechnol. 2014；32（6）：577-82を参照；全内容は、本明細書において参考として援用される）、（ＳＧＧＳ）$_n$ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（ＳＧＧＳ）$_n$（配列番号１０６８）、（ＸＰ）$_n$（配列番号７８５）の範囲、またはこれらのうちのいずれかの組み合わせであり、ここで、Ｘは任意のアミノ酸であり、特定の用途用のデアミナーゼ活性のために最適な長さを達成するため、ｎは、独立して１～３０の整数である。いくつかの態様において、ｎは、独立して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、または３０であるか、または、１つより多くのリンカーもしくは１つより多くのリンカーモチーフが存在する場合、任意のこれらの組み合わせである。いくつかの態様において、リンカーは、（ＧＧＳ）$_n$（配列番号７８４）モチーフを含み、ここで、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５である。いくつかの態様において、リンカーは、（ＧＧＳ）$_n$（配列番号７８４）モチーフを含み、ここで、ｎは、１、３、または７である。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）を含み、これはまた、ＸＴＥＮリンカーとしても言及される。いくつかの態様において、リンカーは、ＡＧＶＦ（配列番号８２５）、ＧＦＬＧ（配列番号８２６）、ＦＫ、ＡＬ、ＡＬＡＬ（配列番号８２７）、またはＡＬＡＬＡ（配列番号８２８）を含む群から選択されるアミノ酸配列を含むが、これらに限定されない。いくつかの態様において、好適なリンカーのモチーフおよび立体配置は、Chen et al., Fusion protein linkers: property, design and functionality. Adv Drug Deliv Rev. 2013；65（10）：1357-69において記載されるものを含み、これは、本明細書において参考として援用される。いくつかの態様において、リンカーは、以下のアミノ酸配列のうちのいずれかを含んでもよい：ＶＰＦＬＬＥＰＤＮＩＮＧＫＴＣ（配列番号３１１）、ＧＳＡＧＳＡＡＧＳＧＥＦ（配列番号３１２）、ＳＩＶＡＱＬＳＲＰＤＰＡ（配列番号３１３）、ＭＫＩＩＥＱＬＰＳＡ（配列番号３１４）、ＶＲＨＫＬＫＲＶＧＳ（配列番号３１５）、ＧＨＧＴＧＳＴＧＳＧＳＳ（配列番号３１６）、ＭＳＲＰＤＰＡ（配列番号３１７）、ＧＳＡＧＳＡＡＧＳＧＥＦ（配列番号３１２）、ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡ（配列番号３１８）、ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＧＧＳＧＧＳ（配列番号３１９）、またはＧＧＳＭ（配列番号３２０）。さらなる好適なリンカー配列は、本開示に基づいて当業者に明らかとなるであろう。

【０２４１】

いくつかの態様において、核酸塩基エディターは、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインおよびアポリポタンパク質Ｂ－ｍＲＮＡ編集複合体１（ＡＰＯＢＥＣ１）デアミナーゼドメインを含み、ここでデアミナーゼドメインは、アミノ酸配列ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）を含むリンカーを介して、ｎａｐＤＮＡｂｐドメインのＮ末端に融合している。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、本明細書で提供されるガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのいずれかの、アミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、デアミナーゼはラットＡＰＯＢＥＣ１（配列番号２８８）である。いくつかの態様において、デアミナーゼはヒトＡＰＯＢＥＣ１（配列番号２８６）である。いくつかの態様において、デアミナーゼはｐｍＣＤＡ１（配列番号２８９）である。いくつかの態様において

、デアミナーゼはヒトＡＰＯＢＥＣ３Ｇ（配列番号２７９）である。いくつかの態様において、デアミナーゼは、（配列番号２９０～２９２）のいずれか１つのヒトＡＰＯＢＥＣ３Ｇバリアントである。いくつかの態様において、融合タンパク質は、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインおよびアポリポタンパク質Ｂ－ｍＲＮＡ編集複合体１触媒ポリペプチド様３Ｇ（ＡＰＯＢＥＣ３Ｇ）デアミナーゼドメインを含み、ここでデアミナーゼドメインは、任意の長さまたは組成のリンカー（例えば、アミノ酸配列、ペプチド、ポリマー、または結合）を介して、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインドメインのＮ末端に融合している。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）を含む。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列$(SGGS)_2$ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ$(SGGS)_2$（配列番号１０６９）を含む。

【０２４２】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインおよびシチジンデアミナーゼ１（ＣＤＡ１）デアミナーゼドメインを含み、ここでデアミナーゼドメインは、アミノ酸配列ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）を含むリンカーを介して、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインドメインのＮ末端に融合している。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列$(SGGS)_2$ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ$(SGGS)_2$（配列番号１０６９）を含む。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、本明細書で提供されるガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのいずれかの、アミノ酸配列を含む。

【０２４３】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質および活性化誘導シチジンデアミナーゼ（ＡＩＤ）デアミナーゼドメインを含み、ここでデアミナーゼドメインは、アミノ酸配列ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）を含むリンカーを介して、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのＮ末端に融合している。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列$(SGGS)_2$ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ$(SGGS)_2$（配列番号１０６９）を含む。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、本明細書で提供されるガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのいずれかの、アミノ酸配列を含む。

【０２４４】

本開示のいくつかの側面は、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質の一定の構成、およびリンカーにより融合されたシチジンデアミナーゼドメインが、標的シチジン残基を効率的に脱アミノ化するのに有用であるという認識に基づく。本開示の他の側面は、次のような認識、すなわち、アミノ酸配列ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）を含むリンカーを介してガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質のＮ末端に融合したアポリポタンパク質Ｂ－ｍＲＮＡ編集複合体１（ＡＰＯＢＥＣ１）デアミナーゼドメインを有する、核酸塩基編集融合タンパク質が、二本鎖ＤＮＡ標的分子内の標的核酸を効率的に脱アミノ化することができた、との認識に関する。いくつかの態様において、融合タンパク質は、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインおよびアポリポタンパク質Ｂ－ｍＲＮＡ編集複合体１（ＡＰＯＢＥＣ１）デアミナーゼドメインを含み、ここでデアミナーゼドメインは、アミノ酸配列ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）を含むリンカーを介して、ｎａｐＤＮＡｂｐのＮ末端に融合している。いくつかの態様において、融合タンパク質は、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインおよびアポリポタンパク質Ｂ－ｍＲＮＡ編集複合

体１（ＡＰＯＢＥＣ１）デアミナーゼドメインを含み、ここでデアミナーゼドメインは、アミノ酸配列（ＳＧＧＳ）$_2$ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（ＳＧＧＳ）$_2$（配列番号１０６９）を含むリンカーを介して、ｎａｐＤＮＡｂｐのＮ末端に融合している。

【０２４５】

所望される標的Ｃ塩基を首尾よく編集するために、Ｃａｓ９とＡＰＯＢＥＣとの間のリンカーを、Komor et al., Nature, 533, 420-424（2016）において記載されるように最適化してもよく、これは、本明細書において参考として援用される。塩基編集のための番号付けスキームは、ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、Ｃａｓ９、ｎＣａｓ９、ｄＣａｓ９）がゲノムでの部位に結合した場合に生じるプログラミング可能なガイドＲＮＡ配列により置き換えられた、ＤＮＡの一本鎖伸長部（Ｒ－ループ）中の標的Ｃの予測される位置に基づく（図６を参照）。便利なことに、標的Ｃのすぐ周囲の配列はまた、ガイドＲＮＡの配列にマッチする。塩基編集のための番号付けスキームは、標準的な２０マーのプログラミング可能な配列に基づき、位置「２１」をＰＡＭ配列の第１のＤＮＡ塩基として定義し、その結果、位置「１」は、２０マーのプログラミング可能なガイドＲＮＡ配列の５’末端にマッチする第１のＤＮＡ塩基に割り当てられる。したがって、全てのＣａｓ９バリアントについて、位置「２１」は、ＰＡＭ配列（例えば、ＮＧＧ、ＮＧＡＮ、ＮＧＮＧ、ＮＧＡＧ、ＮＧＣＧ、ＮＮＧＲＲＴ、ＮＧＲＲＮ、ＮＮＮＲＲＴ、ＮＮＮＧＡＴＴ、ＮＮＡＧＡＡ、ＮＡＡＡＣ）の第１の塩基として定義される。より長いプログラミング可能なガイドＲＮＡ配列が用いられる場合（例えば、２１マー）、５’末端の塩基には、「－１」から始まって次第に減少する負の数が割り当てられる。ＰＡＭ配列の位置が異なるか、またはＰＡＭ配列を必要としない他のＤＮＡ結合ドメインについて、プログラミング可能なガイドＲＮＡ配列は、番号付けのための参照として用いられる。３ａａのリンカーは、２～５塩基編集ウィンドウを生じる（例えば、位置２１におけるＰＡＭ配列に対して相対的な位置２、３、４、または５）。９ａａのリンカーは、３～６塩基編集ウィンドウを生じる（例えば、位置２１におけるＰＡＭ配列に対して相対的な位置３、４、５、または６）。１６ａａのリンカー（例えば、ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号３１０）リンカー）は、４～７塩基編集ウィンドウを生じる（例えば、位置２１におけるＰＡＭ配列に対して相対的な位置４、５、６、または７）。２１ａａのリンカーは、５～８塩基編集ウィンドウを生じる（例えば、位置２１におけるＰＡＭ配列に対して相対的な位置５、６、７、８）。これらのウィンドウの各々は、標的とされた異なるＣ塩基を編集するために有用であり得る。例えば、標的とされたＣ塩基は、隣接ＰＡＭ配列から異なる距離にあってもよく、リンカーの長さを変化させることにより、所望されるＣ塩基の正確な編集が確実となる。当業者は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９技術の教示、特に、米国仮出願62/245828、62/279346、62/311,763、62/322178、62/357352、62/370700および62/398490の、ならびにKomor et al., Nature, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, 533, 420-424（2016）における教示（これらの各々は、本明細書において参考として援用される）に基づいて、その目的のために編集ウィンドウを決定し、所望されるＣ塩基の正確なターゲティングのためのシトシンデアミナーゼ－ｄＣａｓ９タンパク質のリンカーを正しく設計することができるであろう。

【０２４６】

異なるＣａｓ９ドメインは、異なる編集ウィンドウをもたらし得るので、所望される標的Ｃ塩基を首尾よく編集するために、デアミナーゼドメイン（例えば、ＡＰＯＢＥＣ１）に結合させるための適切なＣａｓ９ドメインを選択することができる；これは、以下に記載されている：米国特許第9,068,179号、米国特許出願公開US 2015/0166980、US 2015/0166981、US 2015/0166982、US20150166984、およびUS20150165054、および米国特許仮出願U.S.S.N. 62/245,828（２０１５年１０月２３日出願）；62/279,346（２０１６年１月１５日出願）；62/311,763（２０１６年３月２２日出願）；62/322178（２０１６年４月１３日出願）；62/357,352（２０１６年６月３０日出願）；62,370,700（２０１６年８月３日出願）；62/398,490（２０１６年９月２２日出願）；62/408686（２０１６年１０月１４日出願）；ＰＣＴ出願 PCT/US2016/058344（２０１６年１０月２６日出願）；米国特許

出願15/311,852（２０１６年１０月２２日出願）；およびKomor et al., Nature, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, 533, 420-424 (2016)；それぞれの内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。例えば、ＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－ＳａＣａｓ９ｎ－ＵＧＩは、１～１２塩基編集ウィンドウを生じる（例えば、位置２０～２６におけるＮＮＮＲＲＴ ＰＡＭ配列に対して相対的な位置１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２）。当業者は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９技術の教示に基づいて、その目的のために編集ウィンドウを決定し、所望されるＣ塩基の正確なターゲティングのために、必要とされるＣａｓ９の相同体およびシトシンデアミナーゼに結合したリンカーを決定することができるであろう。

【０２４７】

いくつかの態様において、本開示において有用な融合タンパク質は、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤（ＵＧＩ）ドメインをさらに含む。「ウラシルグリコシラーゼ阻害剤」とは、ウラシル－ＤＮＡグリコシラーゼの活性を阻害するタンパク質を指す。脱アミノ化により誘導されるＣからＴへの塩基変更は、Ｕ：Ｇヘテロ二本鎖をもたらし、これは、細胞のＤＮＡ修復応答を引き起こす。ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（ＵＤＧ）は、細胞におけるＤＮＡからのＵの除去を触媒し、塩基除去修復を開始させ、最も一般的な結果として、Ｕ：Ｇ対のＣ：Ｇ対への復帰変異が起こる。したがって、かかる細胞のＤＮＡ修復応答は、細胞における核酸塩基編集効率の低下の原因となり得る。ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ阻害剤（ＵＧＩ）は、ヒトＵＤＧ活性を強力に遮断することが当該分野において公知である。Komor et al., Nature（2016）において記載されるとおり、ＵＧＩドメインをシチジンデアミナーゼ－ｄＣａｓ９融合タンパク質に融合させることは、ＵＤＧの活性を低下させ、編集効率を著しく増強した。

【０２４８】

好適なＵＧＩタンパク質およびヌクレオチド配列は、本明細書において提供され、さらなる好適なＵＧＩ配列は、当該分野において公知であり、例えば、Wang et al., Uracil-DNA glycosylase inhibitor gene of bacteriophage PBS2 encodes a binding protein specific for uracil-DNA glycosylase. J. Biol. Chem. 264:1163-1171(1989)；Lundquist et al., Site-directed mutagenesis and characterization of uracil-DNA glycosylase inhibitor protein. Role of specific carboxylic amino acids in complex formation with Escherichia coli uracil-DNA glycosylase. J. Biol. Chem. 272:21408-21419(1997)；Ravishankar et al., X-ray analysis of a complex of Escherichia coli uracil DNA glycosylase (EcUDG) with a proteinaceous inhibitor. The structure elucidation of a prokaryotic UDG. Nucleic Acids Res. 26:4880-4887(1998)；およびPutnam et al., Protein mimicry of DNA from crystal structures of the uracil-DNA glycosylase inhibitor protein and its complex with Escherichia coli uracil-DNA glycosylase. J. Mol. Biol. 287:331-346(1999)において公開されるものを含み、これらの各々は、本明細書において参考として援用される。いくつかの態様において、ＵＧＩドメインは、Ｎ末端メチオニン（Ｍ）なしの配列番号３０４のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ＵＧＩは、以下のアミノ酸配列を含む：

桿菌ファージＰＢＳ２（バクテリオファージＰＢＳ２）ウラシル－ＤＮＡグリコシラーゼ阻害剤

ＭＴＮＬＳＤＩＩＥＫＥＴＧＫＱＬＶＩＱＥＳＩＬＭＬＰＥＥＶＥＥＶＩＧＮＫＰＥＳＤＩＬＶＨＴＡＹＤＥＳＴＤＥＮＶＭＬＬＴＳＤＡＰＥＹＫＰＷＡＬＶＩＱＤＳＮＧＥＮＫＩＫＭＬ（配列番号３０４）

【０２４９】

いくつかの態様において、ＵＧＩタンパク質は、野生型ＵＧＩまたは配列番号３０４において記載されるＵＧＩを含む。いくつかの態様において、本開示において有用なＵＧＩタンパク質は、ＵＧＩのフラグメントおよびＵＧＩまたはＵＧＩフラグメントに対して相同なタンパク質を含む。例えば、いくつかの態様において、ＵＧＩは、配列番号３０４において記載されるアミノ酸配列のフラグメントを含む。いくつかの態様において、ＵＧＩ

は、配列番号３０４において記載されるアミノ酸配列に対して相同なアミノ酸配列、または配列番号３０４において記載されるアミノ酸配列のフラグメントに対して相同なアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ＵＧＩもしくはＵＧＩのフラグメントまたはＵＧＩもしくはＵＧＩフラグメントの相同体を含むタンパク質は、「ＵＧＩバリアント」として言及される。ＵＧＩバリアントは、ＵＧＩ、またはそのフラグメントに対して相同性を共有する。例えば、ＵＧＩバリアントは、野生型ＵＧＩまたは配列番号３０４において記載されるＵＧＩに対して、少なくとも約７０％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９６％同一、少なくとも約９７％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一、少なくとも約９９．５％同一、または少なくとも約９９．９％同一である。いくつかの態様において、ＵＧＩバリアントは、フラグメントが、野生型ＵＧＩまたは配列番号３０４において記載されるＵＧＩの対応するフラグメントに対して、少なくとも約７０％同一、少なくとも約８０％同一、少なくとも約９０％同一、少なくとも約９５％同一、少なくとも約９６％同一、少なくとも約９７％同一、少なくとも約９８％同一、少なくとも約９９％同一、少なくとも約９９．５％同一、または少なくとも約９９．９％同一となるような、ＵＧＩのフラグメントを含む。

【０２５０】

さらなるタンパク質は、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤であってもよいことが、理解されるべきである。例えば、ウラシル－ＤＮＡグリコシラーゼ塩基除去修復酵素を阻害すること（例えば、立体的に遮断すること）ができる他のタンパク質は、本開示の範囲内である。いくつかの態様において、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤は、ＤＮＡに結合するタンパク質である。いくつかの態様において、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤は、単一鎖ＤＮＡに結合するタンパク質である。例えば、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤は、Erwinia tasmaniensis単一鎖結合タンパク質であり得る。いくつかの態様において、単一鎖結合タンパク質は、アミノ酸配列（配列番号３０５）を含む。いくつかの態様において、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤は、ウラシルに結合するタンパク質である。いくつかの態様において、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤は、ＤＮＡ中のウラシルに結合するタンパク質である。いくつかの態様において、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤は、触媒不活性型ウラシルＤＮＡ－グリコシラーゼタンパク質である。いくつかの態様において、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤は、ＤＮＡからウラシルを切除しない触媒不活性型ウラシルＤＮＡ－グリコシラーゼタンパク質である。例えば、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤は、ＵｄｇＸである。いくつかの態様において、ＵｄｇＸはアミノ酸配列（配列番号３０６）を含む。別の例として、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤は、触媒不活性型ＵＤＧである。いくつかの態様において、触媒不活性型ＵＤＧはアミノ酸配列（配列番号３０７）を含む。他のウラシルグリコシラーゼ阻害剤は当業者にとって明らかであり、本開示の範囲内であることが理解されるべきである。

【０２５１】

Erwinia tasmaniensis ＳＳＢ（熱安定性単鎖ＤＮＡ結合タンパク質）

ＭＡＳＲＧＶＮＫＶＩＬＶＧＮＬＧＱＤＰＥＶＲＹＭＰＮＧＧＡＶＡＮＩＴＬＡＴＳＥＳ
ＷＲＤＫＱＴＧＥＴＫＥＫＴＥＷＨＲＶＶＬＦＧＫＬＡＥＶＡＧＥＹＬＲＫＧＳＱＶＹＩ
ＥＧＡＬＱＴＲＫＷＴＤＱＡＧＶＥＫＹＴＴＥＶＶＶＮＶＧＧＴＭＱＭＬＧＧＲＳＱＧＧ
ＧＡＳＡＧＧＱＮＧＧＳＮＮＧＷＧＱＰＱＱＰＱＧＧＮＱＦＳＧＧＡＱＱＱＡＲＰＱＱＱ
ＰＱＱＮＮＡＰＡＮＮＥＰＰＩＤＦＤＤＤＩＰ（配列番号３０５）

【０２５２】

ＵｄｇＸ（ＤＮＡ中のウラシルに結合するが、これを除去しない）

ＭＡＧＡＱＤＦＶＰＨＴＡＤＬＡＥＬＡＡＡＡＧＥＣＲＧＣＧＬＹＲＤＡＴＱＡＶＦＧＡ
ＧＧＲＳＡＲＩＭＭＩＧＥＱＰＧＤＫＥＤＬＡＧＬＰＦＶＧＰＡＧＲＬＬＤＲＡＬＥＡＡ
ＤＩＤＲＤＡＬＹＶＴＮＡＶＫＨＦＫＦＴＲＡＡＧＧＫＲＲＩＨＫＴＰＳＲＴＥＶＶＡＣ
ＲＰＷＬＩＡＥＭＴＳＶＥＰＤＶＶＶＬＬＧＡＴＡＡＫＡＬＬＧＮＤＦＲＶＴＱＨＲＧＥ
ＶＬＨＶＤＤＶＰＧＤＰＡＬＶＡＴＶＨＰＳＳＬＬＲＧＰＫＥＥＲＥＳＡＦＡＧＬＶＤＤ

ＬＲＶＡＡＤＶＲＰ（配列番号３０６）
【０２５３】
ＵＤＧ（触媒不活性型ヒトＵＤＧ、ＤＮＡ中のウラシルに結合するが、これを除去しない）
ＭＩＧＱＫＴＬＹＳＦＦＳＰＳＰＡＲＫＲＨＡＰＳＰＥＰＡＶＱＧＴＧＶＡＧＶＰＥＥＳ
ＧＤＡＡＡＩＰＡＫＫＡＰＡＧＱＥＥＰＧＴＰＰＳＳＰＬＳＡＥＱＬＤＲＩＱＲＮＫＡＡ
ＡＬＬＲＬＡＡＲＮＶＰＶＧＦＧＥＳＷＫＫＨＬＳＧＥＦＧＫＰＹＦＩＫＬＭＧＦＶＡＥ
ＥＲＫＨＹＴＶＹＰＰＰＨＱＶＦＴＷＴＱＭＣＤＩＫＤＶＫＶＶＩＬＧＱＥＰＹＨＧＰＮ
ＱＡＨＧＬＣＦＳＶＱＲＰＶＰＰＰＰＳＬＥＮＩＹＫＥＬＳＴＤＩＥＤＦＶＨＰＧＨＧＤ
ＬＳＧＷＡＫＱＧＶＬＬＬＮＡＶＬＴＶＲＡＨＱＡＮＳＨＫＥＲＧＷＥＱＦＴＤＡＶＶＳ
ＷＬＮＱＮＳＮＧＬＶＦＬＬＷＧＳＹＡＱＫＫＧＳＡＩＤＲＫＲＨＨＶＬＱＴＡＨＰＳＰ
ＬＳＶＹＲＧＦＦＧＣＲＨＦＳＫＴＮＥＬＬＱＫＳＧＫＫＰＩＤＷＫＥＬ（配列番号３０７）
【０２５４】
いくつかの態様において、ＵＧＩドメインは、融合タンパク質においてｄＣａｓ９ドメインのＣ末端に融合している。したがって、融合タンパク質は、以下の構造を有するであろう：NH_2－［シトシンデアミナーゼ］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン］－［ＵＧＩ］－ＣＯＯＨ。いくつかの態様において、ＵＧＩドメインは、シトシンデアミナーゼドメインのＮ末端に融合している。したがって、融合タンパク質は、以下の構造を有するであろう：NH_2－［ＵＧＩ］－［シトシンデアミナーゼ］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン］－ＣＯＯＨ。いくつかの態様において、ＵＧＩドメインは、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインとシトシンデアミナーゼドメインとの間で融合している。したがって、融合タンパク質は、以下の構造を有するであろう：NH_2－［シトシンデアミナーゼ］－［ＵＧＩ］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン］－ＣＯＯＨ。本明細書において記載されるリンカー配列はまた、ＵＧＩドメインのシトシンデアミナーゼ－ｄＣａｓ９融合タンパク質への融合のために有用であり得る。
【０２５５】
いくつかの態様において、融合タンパク質は、以下の構造を含む：
［シトシンデアミナーゼ］－［任意のリンカー配列］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質］－［任意のリンカー配列］－［ＵＧＩ］；
［シトシンデアミナーゼ］－［任意のリンカー配列］－［ＵＧＩ］－［任意のリンカー配列］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質］；
［ＵＧＩ］－［任意のリンカー配列］－［シトシンデアミナーゼ］－［任意のリンカー配列］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質］；
［ＵＧＩ］－［任意のリンカー配列］－［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質］－［任意のリンカー配列］－［シトシンデアミナーゼ］；
［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質］－［任意のリンカー配列］－［シトシンデアミナーゼ］－［任意のリンカー配列］－［ＵＧＩ］；
または
［ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質］－［任意のリンカー配列］－［ＵＧＩ］－［任意のリンカー配列］－［シトシンデアミナーゼ］。
【０２５６】
いくつかの態様において、融合タンパク質は、以下の構造を含む：
［シトシンデアミナーゼ］－［任意のリンカー配列］－［Ｃａｓ９ニッカーゼ］－［任意のリンカー配列］－［ＵＧＩ］；
［シトシンデアミナーゼ］－［任意のリンカー配列］－［ＵＧＩ］－［任意のリンカー配列］－［Ｃａｓ９ニッカーゼ］；
［ＵＧＩ］－［任意のリンカー配列］－［シトシンデアミナーゼ］－［任意のリンカー配

列］－［Ｃａｓ９ニッカーゼ］；
［ＵＧＩ］－［任意のリンカー配列］－［Ｃａｓ９ニッカーゼ］－［任意のリンカー配列］－［シトシンデアミナーゼ］；
［Ｃａｓ９ニッカーゼ］－［任意のリンカー配列］－［シトシンデアミナーゼ］－［任意のリンカー配列］－［ＵＧＩ］；または
［Ｃａｓ９ニッカーゼ］－［任意のリンカー配列］－［ＵＧＩ］－［任意のリンカー配列］－［シトシンデアミナーゼ］。

【０２５７】

いくつかの態様において、本明細書において提供される融合タンパク質は、核局在化配列（ＮＬＳ）をさらに含む。いくつかの態様において、ＮＬＳは、融合タンパク質のＮ末端に融合している。いくつかの態様において、ＮＬＳは、融合タンパク質のＣ末端に融合している。いくつかの態様において、ＮＬＳは、ＵＧＩタンパク質のＮ末端に融合している。いくつかの態様において、ＮＬＳは、ＵＧＩタンパク質のＣ末端に融合している。いくつかの態様において、ＮＬＳは、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのＮ末端に融合している。いくつかの態様において、ＮＬＳは、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのＣ末端に融合している。いくつかの態様において、ＮＬＳは、シトシンデアミナーゼのＮ末端に融合している。いくつかの態様において、ＮＬＳは、デアミナーゼのＣ末端に融合している。いくつかの態様において、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している。いくつかの態様において、ＮＬＳは、リンカーなしで融合タンパク質に融合している。非限定的な例示的なＮＬＳ配列は、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号８２９）またはＭＤＳＬＬＭＮＲＲＫＦＬＹＱＦＫＮＶＲＷＡＫＧＲＲＥＴＹＬＣ（配列番号８３０）であってよい。

【０２５８】

いくつかの態様において、本明細書で提供される融合タンパク質のいずれかは、第２のＵＧＩドメインを含む。２つのＵＧＩドメインを含む融合タンパク質は、米国仮出願U.S.S.N. 62/475,830（２０１７年３月２３日出願）；62/490,587； 62/511,934（２０１７年５月２６日出願）； 62/551/951（２０１７年８月３０日出願）；および、Komor et al. (2017) Improved Base Excision Repair Inhibition and Bateriophage Mu Gam Protein Yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. Sci Adv, 3: eaao4774に記載されており、それらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの態様において、第２のＵＧＩドメインは、野生型ＵＧＩまたは配列番号３０４に記載のＵＧＩを含む。いくつかの態様において、本明細書で提供されるＵＧＩタンパク質は、ＵＧＩのフラグメントおよび、ＵＧＩまたはＵＧＩフラグメントに相同なタンパク質を含む。例えば、いくつかの態様において、第２のＵＧＩドメインは、配列番号３０４に記載のアミノ酸配列のフラグメントを含む。いくつかの態様において、ＵＧＩフラグメントは、配列番号３０４に記載のアミノ酸配列の少なくとも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％、または少なくとも９９．５％を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、第２のＵＧＩドメインは、配列番号３０４に記載のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を含むか、または配列番号３０４に記載のアミノ酸配列のフラグメントに相同なアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、ＵＧＩまたはＵＧＩのフラグメント、またはＵＧＩもしくはＵＧＩフラグメントの相同体を含むタンパク質は、「ＵＧＩバリアント」と呼ばれる。ＵＧＩバリアントは、ＵＧＩまたはそのフラグメントと相同性を共有する。例えば、ＵＧＩバリアントは、野生型ＵＧＩまたは配列番号３０４に記載のＵＧＩと、少なくとも７０％同一、少なくとも７５％同一、少なくとも８０％同一、少なくとも８５％同一、少なくとも９０％同一、少なくとも９５％同一、少なくとも９６％同一、少なくとも９７％同一、少なくとも９８％同一、少なくとも９９％同一、少なくとも９９．５％同一、または少なくとも９９．９％同一である。いくつかの態様において、Ｕ

ＧＩバリアントはＵＧＩのフラグメントを含み、ここでフラグメントは、野生型ＵＧＩまたは配列番号３０４に記載のＵＧＩの対応するフラグメントと、少なくとも７０％同一、少なくとも８０％同一、少なくとも９０％同一、少なくとも９５％同一、少なくとも９６％同一、少なくとも９７％同一、少なくとも９８％同一、少なくとも９９％同一、少なくとも９９．５％同一、または少なくとも９９．９％同一であるようになっている。

【０２５９】

いくつかの態様において、融合タンパク質は以下の構造を含む：

［デアミナーゼ］－［任意のリンカー配列］－［ｄＣａｓ９］－［任意のリンカー配列］－［第１のＵＧＩ］－［任意のリンカー配列］－［第２のＵＧＩ］；

［デアミナーゼ］－［任意のリンカー配列］－［Ｃａｓ９ニッカーゼ］－［任意のリンカー配列］－［第１のＵＧＩ］－［任意のリンカー配列］－［第２のＵＧＩ］；または

［デアミナーゼ］－［任意のリンカー配列］－［Ｃａｓ９］－［任意のリンカー配列］－［第１のＵＧＩ］－［任意のリンカー配列］－［第２のＵＧＩ］。

【０２６０】

いくつかの態様において、核酸塩基エディターは、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインおよびアポリポタンパク質Ｂ－ｍＲＮＡ編集複合体１（ＡＰＯＢＥＣ１）デアミナーゼドメインを含み、ここでデアミナーゼドメインは、アミノ酸配列$(SGGS)_2SGSETPGTSESATPES(SGGS)_2$（配列番号１０６９）を含むリンカーを介して、ヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのＮ末端に融合している。いくつかの態様において、ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインは、本明細書で提供されるガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのいずれかの、アミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ラットＡＰＯＢＥＣ１（配列番号２８８）である。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ヒトＡＰＯＢＥＣ１（配列番号２８６）である。いくつかの態様において、デアミナーゼは、（配列番号２９０～２９２）のいずれか１つのヒトＡＰＯＢＥＣ３Ｇバリアントである。いくつかの態様において、核酸塩基エディターは、アミノ酸配列$(GGS)_n$（配列番号７８４）を含むリンカー（式中、ｎは３である）を介してガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインのＣ末端に融合した第１のＵＧＩドメインを含む。いくつかの態様において、核酸塩基エディターは、アミノ酸配列$(GGS)_n$（配列番号７８４）を含むリンカー（式中、ｎは３である）を介して第１のＵＧＩドメインのＣ末端に融合した第２のＵＧＩドメインを含む。

【０２６１】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、配列番号１０８４のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、融合タンパク質は、配列番号１０８４のアミノ酸配列と少なくとも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％、または少なくとも９９．５％同一である、アミノ酸配列を含む。

【０２６２】

いくつかの態様において、本明細書で提供される融合タンパク質のいずれかはさらに、Ｇａｍタンパク質を含み得る。用語「Ｇａｍタンパク質」とは、本明細書において用いられる場合、一般に、二本鎖核酸（例えば、二本鎖ＤＮＡ）の二本鎖切断部の１つ以上の末端に結合することができるタンパク質を指す。いくつかの態様において、Ｇａｍタンパク質は、二本鎖切断の部位において核酸の１つ以上の鎖の分解を防止または阻害する。いくつかの態様において、Ｇａｍタンパク質は、バクテリオファージＭｕからの天然に存在するＧａｍタンパク質、または天然に存在しないそのバリアントである。Ｇａｍタンパク質を含む融合タンパク質は、Komor et al. (2017) Improved Base Excision Repair Inhibition and Bateriophage Mu Gam Protein Yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. Sci Adv, 3: eaao4774に記載され、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの態様において、Ｇａｍタンパク質は、配列

番号３０２７によって提供されるアミノ酸配列と少なくとも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９２％、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％、または少なくとも９９．５％同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、Ｇａｍタンパク質は、配列番号３０２７のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、融合タンパク質（例えば、配列番号３０２８のＢＥ４－Ｇａｍ）はＧａｍタンパク質を含み、ここでＢＥ４のＣａｓ９ドメインは、本明細書で提供されるＣａｓ９ドメインのいずれかで置き換えられる。

【０２６３】

バクテリオファージＭｕからのＧａｍ：

AKPAKRIKSAAAAYVPQNRDAVITDIKRIGDLQREASRLETEMNDAIAEITEKFAARIAPIKTDIETLSKGVQGWCEANR
DELTNGGKVKTANLVTGDVSWRVRPPSVSIRGMDAVMETLERLGLQRFIRTKQEINKEAILLEPKAVAGVAGITVKSGIE
DFSIIPFEQEAGI（配列番号１０７０）

【０２６４】

ＢＥ４－Ｇａｍ：

【数４０】

MAKPAKRIKSAAAAYVPQNRDAVITDIKRIGDLQREASRLETEMNDAIAEITEKFAARIAPIKTDIETLSKGVQG
WCEANRDELTNGGKVKTANLVTGDVSWRVRPPSVSIRGMDAVMETLERLGLQRFIRTKQEINKEAILLEPKAVAG
VAGITVKSGIEDFSIIPFEQEAGISGSETPGTSESATPESSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKET
CLLYEINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVT
LFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCII
LGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS
DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADL
RLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLI
AQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAIL
LSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFI
KPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYY
VGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK
VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKII
KDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVM
GRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQ
ELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT
KAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVR
EINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDW
DPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKY
SLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQS
ITGLYETRIDLSQLGGDSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDE
STDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEE
VIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRK**（配列番号**
1071)

【０２６５】

本開示のいくつかの側面は、ガイドヌクレオチド配列（例えば、ガイドＲＮＡまたはｇＲＮＡ）に会合した核酸塩基エディターを提供する。ｇＲＮＡは、２つ以上のＲＮＡの複合体として、または単一のＲＮＡ分子として存在することができる。単一のＲＮＡ分子として存在するｇＲＮＡは、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）としても言及され得るが、「ｇＲＮＡ」は、単一の分子として、または２つ以上の分子の複合体として存在するガイドＲＮＡを指すように、交換可能に用いられる。典型的には、単一のＲＮＡ種として存在するｇＲＮＡは、２つのドメインを含む：（１）標的核酸に対して相同性を共有する（例えば、およびＣａｓ９複合体の標的への結合を指揮する）ドメイン；および（２）Ｃａｓ９タンパク質に結合するドメイン。いくつかの態様において、ドメイン（２）は、ｔｒａｃｒＲＮＡとして知られる配列に対応し、ステムループ構造を含む。例えば、いくつか

の態様において、ドメイン（２）は、ｔｒａｃｒＲＮＡに対して同一または相同であり、これはJinek et al., Science 337：816-821（2012）において提供されるとおりであり、これは、本明細書において参考として援用される。ｇＲＮＡ（例えばドメイン２を含むもの）の他の例は、２０１３年９月６日に出願された米国仮特許出願、U.S.S.N. 61/874,682、表題「Switchable Cas9 Nucleases And Uses Thereof」、および２０１３年９月６日に出願された米国仮特許出願、U.S.S.N. 61/874,746、表題「Delivery System For Functional Nucleases」において見出すことができ、各々はその全体が本明細書に参照により組み込まれる。ｇＲＮＡは、標的部位を補完するヌクレオチド配列を含み、これは、ヌクレアーゼ／ＲＮＡ複合体の前記標的部位への結合を媒介し、ヌクレアーゼ：ＲＮＡ複合体に配列特異性をもたらす。これらのタンパク質は、原則として、ガイドＲＮＡにより特定される任意の配列に対してターゲティングされることができる。Ｃａｓ９などのＲＮＡによりプログラミング可能なヌクレアーゼを、部位特異的切断のために（例えば、ゲノムを修飾するために）使用する方法は、当該分野において公知である（例えば、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；これらの各々は、本明細書において参考として援用される）。特に、本開示の融合タンパク質をその標的配列にターゲティングして、標的とされたＣ塩基を脱アミノ化するために用いることができるガイドヌクレオチド配列（例えば、ｓｇＲＮＡ）の例は、Komor et al., Nature, 533, 420-424（2016）において記載され、これは、本明細書において参考として援用される。

【０２６６】

ガイドヌクレオチド配列（例えばｓｇＲＮＡ）の具体的な構造は、その標的配列、および標的配列の下流のＰＡＭ配列の相対的な距離に依存する。当業者は、標的配列は、脱アミノ化するために標的とされる各々のおよび全てのＣについて異なるので、ガイドヌクレオチド配列の統一構造は示されないことを理解するであろう。

【０２６７】

しかし、本開示は、当業者が、目的の標的配列に対してかかる教示を用いることができるように、ガイドヌクレオチド配列、例えばｓｇＲＮＡを設計する方法におけるガイドラインを提供する。ｇＲＮＡは、典型的には、Ｃａｓ９の結合を可能にするｔｒａｃｒＲＮＡフレームワーク、および本明細書において開示される融合タンパク質に配列特異性を付与するガイド配列を含む。いくつかの態様において、ガイドＲＮＡは、構造５’－［ガイド配列］－ｔｒａｃｒＲＮＡ－３’を含む。非限定的な例示的なｔｒａｃｒＲＮＡ配列を、表１１において示す。

表１１．ＴｒａｃｒＲＮＡのオルソログおよび配列

【表１１】

生物	tracrRNA 配列	配列番号
S. pyogenes	GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAAGCCACGGUGAAAAAGUUCAACUAUUGCCUGAUCGGAAUAAAUUUGAACGAUACGACAGUCGGUGCUUUUUUU	322
S. pyogenes	GUUUAAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU	323
S. thermophilus CRISPR1	GUUUUUGUACUCUCAAGAUUCAAUAAUCUUGCAGAAGCUACAAAGAUAAGGCUUCAUGCCGAAAUCAACACCCUGUCAUUUUAUGGCAGGGUGUUUU	324
S. thermophilus CRISPR3	GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUGUUAAAACAACACAGCGAGUUAAAAUAAGGCUUAGUCCGUACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU	325
C. jejuni	AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAAAUAAAGAGUUUGCGGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU	326
F. novicida	AUCUAAAAUUAUAAAUGUACCAAAUAAUUAAUGCUCUGUAAUCAUUUAAAAGUAUUUUGAACGGACCUCUGUUUGACACGUCUGAAUAACUAAAA	327
S. thermophilus2	UGUAAGGGACGCCUUACACAGUUACUUAAAUCUUGCAGAAGCUACAAAGAUAAGGCUUCAUGCCGAAAUCAACACCCUGUCAUUUUAUGGCAGGGUGUUUUCGUUAUUU	328
M. mobile	UGUAUUUCGAAAUACAGAUGUACAGUUAAGAAUACAUAAGAAUGAUACAUCACUAAAAAAAGGCUUUAUGCCGUAACUACUACUUAUUUUCAAAAUAAGUAGUUUUUUUU	329
L. innocua	AUUGUUAGUAUUCAAAAUAACAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUUUGUCCGUUAUCAACUUUUAAUUAAGUAGCGCUGUUUCGGCGCUUUUUU	330
S. pyogenes	GUUGGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	331
S. mutans	GUUGGAAUCAUUCGAAACAACACAGCAAGUUAAAAUAAGGCAGUGAUUUUUAAUCCAGUCCGUACACAACUUGAAAAAGUGCGCACCGAUUCGGUGCUUUUUUAUUU	332
S. thermophilus	UUGUGGUUUGAAACCAUUCGAAACAACACAGCGAGUUAAAAUAAGGCUUAGUCCGUACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUUUUU	333
N. meningitidis	ACAUAUUGUCGCACUGCGAAAUGAGAACCGUUGCUACAAUAAGGCCGUCUGAAAAGAUGUGCCGCAACGCUCUGCCCCUUAAAGCUUCUGCUUUAAGGGGCA	334
P. multocida	GCAUAUUGUUGCACUGCGAAAUGAGAGACGUUGCUACAAUAAGGCUUCUGAAAAGAAUGACCGUAACGCUCUGCCCCUUGUGAUUCUUAAUUGCAAGGGGCAUCGUUUUU	335

【０２６８】

ｇＲＮＡのガイド配列は、標的配列に対して相補的な配列を含む。ガイド配列は、典型的には、約２０ヌクレオチド長である。例えば、ガイド配列は、１５～２５ヌクレオチド長であってもよい。いくつかの態様において、ガイド配列は、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、ガイド配列は、２５ヌクレオチド長より長い。かかる好適なガイドＲＮＡ配列は、典型的には、編集されるべき標的ヌクレオチドの上流または下流５０ヌクレオチド以内の核酸配列に対して相補的なガイド配列を含む。

【０２６９】

いくつかの態様において、ガイドＲＮＡは、約１５～１００ヌクレオチド長であり、標的配列に対して相補的な少なくとも１０個の連続するヌクレオチドの配列を含む。いくつかの態様において、ガイドＲＮＡは、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、または５０ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、ガイドＲＮＡは、標的配列に対して相補的な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、または４０個の連続するヌクレオチドの配列を含む。

【０２７０】

組成物

本開示のいくつかの側面は、in vivoまたはex vivoでがんワクチンを生成するために使用され得る組成物に関する。いくつかの態様において、組成物は、（ｉ）本明細書に記載の核酸塩基エディターまたは核酸塩基エディターをコードする核酸分子；および（ｉｉ）核酸塩基エディターを、腫瘍特異的抗原をコードするポリヌクレオチドに標的化するガイドヌクレオチド配列、を含む。ヘテロクリティックまたはクリプティックエピトープを生成するために使用され得るガイドヌクレオチド配列は、配列番号Ｘ－Ｘから選択され得る。特定のヘテロクリティックまたはクリプティックエピトープを生成するためのガイドヌクレオチド配列は、表５および６に見出すことができる。

【０２７１】

いくつかの態様において、本明細書に記載の組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含む。

【０２７２】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容可能な担体」は、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤（例えば、潤滑剤、タルクマグネシウム、カルシウムまたは亜鉛ステアラート、ステアリン酸）などの薬学的に許容可能な材料、組成物またはビヒクル、または、化合物を身体の１つの部位（例えば送達部位）から別の部位（例えば器官、組織または身体の一部）に運搬または輸送することに関与する溶媒封入材料を意味する。薬学的に許容可能な担体は、製剤の他の成分と適合性であり、そして対象の組織に有害ではない（例えば、生理学的適合性、無菌性、生理学的ｐＨなど）という意味で「許容可能」である。薬学的に許容可能な担体として役立ち得る材料のいくつかの例は、以下を含む：（１）ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖；（２）コーンスターチおよびポテトスターチなどのデンプン；（３）カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロースおよび酢酸セルロースなどのセルロースおよびその誘導体；（４）粉末トラガカント；（５）麦芽；（６）ゼラチン；（７）ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、およびタルク等の潤滑剤；（８）カカオバター、座剤用ワックス等の賦形剤；（９）ラッカセイ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油および大豆油などの油；（１０）プロピレングリコールなどのグリコール；（１１）グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等のポリオール；（１２）オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；（１３）寒天；（１４）水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム等の緩衝剤；（１５）アルギン酸；（１６）発熱物質を含まない水；（１７）等張食塩水；（１８）リンガー溶液；（１９）エチルアルコール；（２０）ｐＨ緩衝溶液；（２１）ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ無水物；（２２）ポリペプチドおよびアミノ酸などの増量剤；（２３）血清アルブミン、ＨＤＬおよびＬＤＬなどの血清成分；（２２）エタノールなどのＣ２～Ｃ１２アルコール；および（２３）医薬製剤に使用される他の非毒性適合性物質。湿潤剤、着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、防腐剤および酸化防止剤もまた製剤中に存在することができる。用語「賦形剤」、「担体」、「薬学的に許容可能な担体」などは、ここでは互換的に使用される。

【０２７３】

いくつかの態様において、組成物中の本開示の核酸塩基エディターおよびガイドヌクレオチドは、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラントにより投与

され、インプラントは、多孔質、非多孔質、またはゼラチン質材料であり、これは、シアラスティック（sialastic）膜などの膜、または線維を含む。いくつかの態様において、注射は、肝臓に指向される。

【０２７４】

他の態様において、核酸塩基エディターおよびガイドヌクレオチドは、制御された放出システムで送達される。一態様において、ポンプを使用することができる（例えば、Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Sefton, 1989, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照）。別の態様において、ポリマー材料を使用することができる。（例えば、Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger and Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照。またLevy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105も参照。）他の制御された放出系は、例えば、上記のLangerに論じられている。

【０２７５】

典型的な態様において、医薬組成物は、対象、例えばヒトへの静脈内または皮下投与に適した医薬組成物として日常的な手順に従って製剤化される。典型的には、注射による投与のための組成物は、無菌の等張性の水性緩衝液である。必要に応じて医薬は、可溶化剤、および、注射部位の痛みを和らげるためのリグノカインなどの局所麻酔薬も含み得る。一般に、成分は別々に供給されるか、または例えば活性薬剤の量を示すアンプルまたはサシェなどの密封容器中の乾燥凍結乾燥粉末または無水濃縮物などの単位剤形として一緒に混合されて供給される。医薬を注入により投与する場合、滅菌医薬品グレードの水または生理食塩水を含む注入ボトルを用いて投薬することができる。医薬を注射により投与する場合、成分を投与前に混合することができるように、注射用滅菌水または食塩水のアンプルを提供することができる。

【０２７６】

全身投与用の医薬組成物は、液体、例えば、無菌食塩水、乳酸加リンガー液またはハンクス液であり得る。さらに、医薬組成物は固体形態であり、使用直前に再溶解または懸濁することができる。凍結乾燥形態もまた企図される。

【０２７７】

医薬組成物は、非経口投与にも適している、リポソームまたは微結晶などの脂質粒子またはベシクル内に含有させることができる。粒子は、組成物がその中に含まれている限り、単層または多層などの任意の好適な構造であり得る。 化合物は、フソジェニック脂質ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、低レベル（５～１０モル％）のカチオン性脂質を含有する「安定化プラスミド－脂質粒子」（ＳＰＬＰ）中に捕捉され、そしてポリエチレングリコール（ＰＥＧ）コーティングによって安定化され得る（Zhang Y. P. et al., Gene Ther. 1999, 6:1438-47）。Ｎ－［１－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル－アンモニウムメチルサルフェート、または「ＤＯＴＡＰ」などの正荷電脂質は、かかる粒子およびベシクルに特に好ましい。かかる脂質粒子の調製はよく知られている。例えば、米国特許第4,880,635号；第4,906,477号；第4,911,928号；第4,917,951号；第4,920,016号；および第4,921,757号を参照。

【０２７８】

本開示の医薬組成物は、例えば単位用量として投与または包装することができる。本開示の医薬組成物に関して使用される場合の用語「単位用量」は、対象に対する単位投与量として好適な物理的に別々の単位を指し、各単位は、必要な希釈剤、すなわち、担体またはビヒクルに関連して、所望の治療効果を生じるように計算された既定量の活性材料を含む。

【０２７９】

いくつかの態様において、本明細書において記載される核酸塩基エディターまたはガイドヌクレオチドは、治療剤部分、例えば抗炎症剤に抱合していてもよい。かかる治療剤部分を、例えばＦｃドメインを含むポリペプチドに抱合させるための技術は、周知である；例えば、Amonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」（Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら（編）、1985年、pp. 243-56、Alan R. Liss, Inc.中）；Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」（Controlled Drug Delivery（第２版）、Robinsonら（編）、1987年、pp. 623-53、Marcel Dekker, Inc.中）；Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy：A Review」（Monoclonal Antibodies '84：Biological And Clinical Applications、Pincheraら（編）、1985年、pp. 475-506中）；「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、（Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら（編）、1985年、pp. 303-16, Academic Press中）；およびThorpeら（1982年）「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev., 62：119-158を参照。

【０２８０】

さらに、本開示の組成物は、キットに組み立てられてもよい。いくつかの態様において、キットは、本明細書において記載される核酸塩基エディターの発現のための核酸ベクターを含む。いくつかの態様において、キットは、核酸塩基エディターを所望される標的配列にターゲティングするためのガイドヌクレオチド配列の発現のための、適切なガイドヌクレオチド配列（例えば、ｇＲＮＡ）または核酸ベクターをさらに含む。

【０２８１】

本明細書において記載されるキットは、本明細書において記載される方法を行うための構成成分を収容する１つ以上の容器、および任意に使用の説明を含んでもよい。本明細書において記載されるキットのうちのいずれかは、アッセイ方法を行うために必要とされる構成成分をさらに含んでもよい。キットの各々の構成成分は、適用可能である場合は、液体の形態において（例えば溶液において）、または固体の形態において（例えば乾燥粉末）提供されてもよい。ある場合において、構成成分のうちのいくつかは、例えば、好適な溶媒または他の種（例えば、水または特定の有機溶媒）（これらはキットと共に提供されても、提供されなくてもよい）の添加により、再構成可能であるか、他に（例えば、活性形態に）処理可能である。

【０２８２】

いくつかの態様において、キットは、任意に、提供される構成成分の使用のための説明および／または促進物（promotion）を含んでもよい。本明細書において用いられる場合、「説明」は、説明および／または促進物の構成成分を定義し得、典型的には、本開示のパッケージング上の、またはこれに関連した、書面の説明を含む。説明はまた、ユーザーが、説明がキットに関連するものであることを明らかに理解するように、任意の様式において提供される、任意の口頭または電子的な説明、例えば、視聴覚的（例えば、ビデオテープ、ＤＶＤなど）、インターネット、および／またはwebベースのコミュニケーションなどを含んでもよい。書面の説明は、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関により定められた様式におけるものであってよく、これはまた、動物への投与のための製造、使用または販売の機関による承認を反映していてもよい。本明細書において用いられる場合、「促進される（promoted）」とは、ビジネスを行う全ての方法を含み、これは、教育の方法、病院および他の臨床施設、科学研究、薬物の発見または開発、学術研究、製薬業の活動を含み、これは、医薬品の販売、および広告または他の促進活動を含み、これは、本開示に関連する任意の様式における書面、口頭および電子的コミュニケーションを含む。さらに、キットは、本明細書において記載されるような特定の用途に依存して、他の構成成分を含んでもよい。

【０２８３】

キットは、本明細書において提供される構成成分のうちのいずれか１つ以上を、１つ以

上の容器中で含んでもよい。構成成分は、無菌調製し、シリンジ中にパッケージングし、保冷で輸送してもよい。あるいは、それを、貯蔵のためのバイアルまたは他の容器中に収容してもよい。第２の容器が、無菌調製された他の構成成分を有していてもよい。あるいは、キットは、あらかじめ混合され、バイアル、チューブまたは他の容器中で輸送される活性剤を含んでもよい。

【０２８４】

キットは、ブリスターパウチ、シュリンクラップされたパウチ、真空密封可能なパウチ、密封可能な熱成形されたトレイ、または類似のパウチもしくはトレイの形態などの、多様な形態を有していてもよく、パウチ内に緩く包装した付属品、１つ以上のチューブ、容器、箱またはバッグを含む。キットは、付属品を添加した後で殺菌してもよく、それにより、容器中の個々の付属品を、他の方法で開封することを可能にする。キットは、任意の適切な滅菌技術、例えば放射線照射殺菌、加熱殺菌、または当該分野において公知の他の殺菌方法を用いて殺菌することができる。キットはまた、特定の用途に依存して、他の構成成分、例えば、容器、細胞培地、塩、バッファー、試薬、シリンジ、針、消毒剤を適用または除去するためのガーゼなどのファブリック、使い捨て手袋、投与前の剤のための支持体などを含んでもよい。

【０２８５】

治療薬

本明細書に記載の組成物またはがんワクチン（例えば、改変された腫瘍細胞を含む全細胞ワクチン）は、がんを処置するために、それを必要とする対象に治療有効量で投与することができる。本明細書に記載の組成物およびがんワクチンは、腫瘍特異的な適応反応を誘導する。がん細胞は、免疫チェックポイントを利用して免疫監視を回避することが知られている。したがって、いくつかの態様においては、本明細書に記載の組成物またはがんワクチンに加えて、免疫チェックポイントの活性を調節する薬剤も投与し、がんワクチンによって誘導される腫瘍特異的免疫応答を増進する。

【０２８６】

いくつかの態様において、免疫チェックポイントの活性を調節する薬剤は、免疫チェックポイント阻害剤である。「免疫チェックポイント」は免疫系のタンパク質であり、免疫応答シグナル（共刺激分子）を増強するか、または免疫応答シグナルを低下させる。多くのがんは、抑制性免疫チェックポイントタンパク質を利用してＴ細胞シグナルを抑制することにより、免疫系から自身を守る。かかる抑制性チェックポイントタンパク質には、限定はされないが、以下が含まれる：細胞傷害性Ｔリンパ球関連タンパク質４（ＣＴＬＡ－４）、プログラム死１受容体（ＰＤ－１）、Ｔ細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン３（ＴＩＭ３）、リンパ球活性化遺伝子３（ＬＡＧ３）、Ｖセットドメイン含有Ｔ細胞活性化阻害剤１（ＶＴＶＮ１またはＢ７－Ｈ４）、分化クラスター２７６（ＣＤ２７６またはＢ７－Ｈ３）、ＢおよびＴリンパ球アテニュエーター（ＢＴＬＡ）、ガレクチン－９（ＧＡＬ９）、チェックポイントキナーゼ１（Ｃｈｋ１）、アデノシンＡ２Ａ受容体（Ａ２ａＲ）、インドールアミン２，３－ジオキシゲナーゼ（ＩＤＯ）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（ＫＩＲ）、リンパ球活性化遺伝子３（ＬＡＧ３）、およびＴ細胞活性化のＶドメインＩｇサプレッサー（ＶＩＳＴＡ）。

【０２８７】

これらの免疫チェックポイントタンパク質のいくつかは、それらの免疫抑制活性のために、それらの同族結合パートナーまたはリガンドを必要とする。例えば、Ａ２ＡＲはアデノシンＡ２Ａの受容体であり、Ａ２ＡのＡ２ＡＲへの結合は、負の免疫フィードバックループを活性化する。別の例として、ＰＤ－１はその２つのリガンドＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２と会合して、Ｔ細胞の活性化を妨げることにより免疫系を下方制御する。ＰＤ－１は、リンパ節の抗原特異的Ｔ細胞のプログラム細胞死を促進し、同時にサプレッサーＴ細胞のプログラム細胞死を減少させ、こうして免疫抑制機能を達成する。さらに別の例として、ＣＴＬＡ４はＴ細胞の表面に存在し、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面の結合パートナーＣＤ８０またはＣＤ８６に結合すると、Ｔ細胞に抑制シグナルを伝達し、それによって

免疫応答を低減する。

【０２８８】

がん細胞は、免疫チェックポイントタンパク質を利用して、免疫系による攻撃を受けないようにすることが知られている。したがって、免疫チェックポイント阻害剤を使用して、がんに対する免疫応答を高め、こうしてがんを処置することが記載されている。本開示の組成物中の免疫療法剤もまた、免疫チェックポイント阻害剤であり得る。いくつかの態様において、免疫チェックポイントは、以下のいずれか１つ以上を抑制する：細胞傷害性Ｔリンパ球関連タンパク質４（ＣＴＬＡ－４）、プログラム死１受容体（ＰＤ－１）、Ｔ細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン３（ＴＩＭ３）、リンパ球活性化遺伝子３（ＬＡＧ３）、Ｖセットドメイン含有Ｔ細胞活性化阻害剤１（ＶＴＶＮ１またはＢ７－Ｈ４）、分化クラスター２７６（ＣＤ２７６またはＢ７－Ｈ３）、ＢおよびＴリンパ球アテニュエーター（ＢＴＬＡ）、ガレクチン－９（ＧＡＬ９）、チェックポイントキナーゼ１（Ｃｈｋ１）、アデノシンＡ２Ａ受容体（Ａ２ａＲ）、インドールアミン２，３－ジオキシゲナーゼ（ＩＤＯ）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（ＫＩＲ）、リンパ球活性化遺伝子３（ＬＡＧ３）、およびＴ細胞活性化のＶドメインＩｇサプレッサー（ＶＩＳＴＡ）。

【０２８９】

「免疫チェックポイント阻害剤」は、免疫チェックポイント阻害剤の活性を防止または弱める分子であり、例えば、免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントタンパク質の、その同族結合パートナー、例えばＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、またはＡ２ａＲへの結合を阻害し得る。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、小分子である。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、核酸アプタマー（例えば、免疫チェックポイントタンパク質のいずれか１つを標的とするｓｉＲＮＡ）である。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、組換えタンパク質である。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、抗体である。いくつかの態様において、抗体は、抗ＣＴＬＡ－４、抗ＰＤ－１、抗ＰＤ－Ｌ１、抗ＴＩＭ３、抗ＬＡＧ３、抗Ｂ７－Ｈ３、抗Ｂ７－Ｈ４、抗ＢＴＬＡ、抗ＧＡＬ９、抗Ｃｈｋ、抗Ａ２ａＲ、抗ＩＤＯ、抗ＫＩＲ、抗ＬＡＧ３、抗ＶＩＳＴＡ抗体、または前述の抗体の任意の２つ以上の組み合わせを含む。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、抗ＰＤ１、抗ＰＤ－Ｌ１、抗ＣＴＬＡ－４、または前述の抗体の任意の２つ以上の組み合わせを含む。例えば、抗ＰＤ－１抗体は、ペンブロリズマブ（Keytruda（登録商標））またはニボルマブ（Opdivo（登録商標））であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、イピリムマブ（Yervoy（登録商標））である。したがって、いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、イピリムマブ、または前述の抗体の２つ以上の任意の組み合わせを含む。本明細書に記載の実施例は、限定することを意味するものではなく、当技術分野で知られている任意の免疫チェックポイント阻害剤およびそれらの任意の組み合わせが、本開示に従って使用され得る。

【０２９０】

いくつかの態様において、免疫チェックポイントは、免疫チェックポイント遺伝子（例えば、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＢＴＬＡ、ＧＡＬ９、Ｃｈｋ１、またはＡ２ａＲ）のいずれか１つを、当技術分野で知られている遺伝子編集方法のいずれかを使用して（例えば、任意の遺伝子のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９媒介性切断）破壊することにより、阻害し得る。

【０２９１】

いくつかの態様において、アジュバントがさらに対象に投与される。アジュバントは、免疫原または抗原と一緒に投与された場合に、免疫応答を高める物質である。アジュバントはいくつかの方法で機能すると考えられており、例えば抗原の表面積を増加させること、体内での抗原の保持を延長することなどにより、リンパ系が抗原にアクセスできる時間を許容し、抗原の放出を遅らせ、抗原をマクロファージに標的化し、マクロファージを活

性化し、または他の方法で免疫系の細胞の非特異的活性化を誘導する；例えば、H. S. Warren et al, Annu. Rev. immunol., 4:369 (1986)を参照。現在、ワクチンにおけるアジュバントの重要な役割は、ＣＤ４＋ Ｔ細胞サブセットの分化を誘導することであるが、アジュバントが如何にしてこの機能を果たすかは、ほとんどわかっていない。

【０２９２】

したがって、特定の種類の免疫応答を誘導および増加させるアジュバントの能力、およびその能力の同定は、特定の病原体に対するワクチン使用のための特定のアジュバントの選択における、重要な要因である。典型的なアジュバントには、水と油のエマルジョン、例えばフロイントのアジュバント、および水酸化アルミニウムまたはミョウバンなどの化合物が含まれる。現在、ミョウバンは、米国でヒトワクチンのために承認された唯一のアジュバントである。ミョウバンは、ＴＨ２細胞の産生を誘導することが判明している。

【０２９３】

最も効果的なアジュバントの多くには、細菌またはその産物が含まれる：例えば、Mycobacterium bovisの弱毒株、bacillus Calmette-Guerin（ＢＣＧ）などの微生物；微生物成分、例えばミョウバン沈殿ジフテリアトキソイド、細菌性リポ多糖およびエンドトキシン。ただし、細菌が果たす役割は明確ではない。最近、多くの細菌またはその産物、リポ多糖、黄色ブドウ球菌、結核菌、およびC. parvumが、マクロファージによるＩＬ－１２産生を刺激することが注目されているA. D'Andrea et al, J. Exp. Med., 176:1387 (1992)。

【０２９４】

がんまたは腫瘍には、限定はされないが、新生物、悪性腫瘍、転移、またはがん性とみなされるような制御されない細胞増殖を特徴とする任意の疾患または障害が含まれる。がんは、原発性または転移性のがんであり得る。がんは、限定はされないが以下を含む：胆道がん；膀胱がん；膠芽腫および髄芽腫を含む脳がん；乳がん；子宮頸がん；絨毛がん；結腸がん；子宮内膜がん；食道がん；胃がん；急性リンパ球性および骨髄性白血病を含む血液腫瘍；多発性骨髄腫；エイズ関連白血病および成人Ｔ細胞白血病リンパ腫；ボーエン病およびパジェット病を含む上皮内腫瘍；肝臓がん；肺がん；ホジキン病およびリンパ球性リンパ腫を含むリンパ腫；神経芽細胞腫；扁平上皮がんを含む口腔がん；上皮細胞、間質細胞、胚細胞および間葉細胞から発生するものを含む卵巣がん；膵臓がん；前立腺がん；直腸がん；平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、および骨肉腫を含む肉腫；黒色腫、カポジ肉腫、基底細胞がん、および扁平上皮がんを含む皮膚がん；セミノーマ、非セミノーマ、奇形腫、絨毛がんなどの胚腫瘍を含む精巣がん；間質腫瘍および胚細胞腫瘍；甲状腺腺がんおよび髄質がんを含む甲状腺がん；および、腺がんやウィルムス腫瘍などの腎がん。一般的に発生するがんとしては、乳がん、前立腺がん、肺がん、卵巣がん、大腸がん、および脳がんが含まれる。

【０２９５】

「治療有効量」とは、本明細書において用いられる場合、単独で、または１つ以上の他の治療剤と組み合わせて、対象に対して治療効果を与えるために必要とされる、本開示の各々の塩基編集剤の量を指す。有効量は、当業者により認識されるとおり、処置されている特定の状態、状態の重篤度、年齢、身体的状態、サイズ、性別および体重を含む個々の対象のパラメータ、処置の期間、同時治療（あれば）の性質、投与の特定の経路、および、健康管理者の知識および専門知識の範囲内である同様の要因に依存して、変化する。これらの要因は、当業者には周知であり、慣用的な実験のみを用いて取り組むことができる。一般に、個々の構成成分の最大用量またはこれらの組み合わせ、すなわち、健全な医学的判断に従った最も高い安全な用量を用いることが好ましい。しかし、当業者により理解されるであろうが、対象は、医学的理由、精神的理由、または実質的に任意の他の理由のために、より低い用量または耐用可能な用量を主張する場合がある。半減期などの経験的考慮は、一般に、投与量の決定に寄与するであろう。例えば、ヒト化抗体または完全ヒト抗体からの領域を含むポリペプチドなどのヒト免疫系に適合性の治療剤は、ポリペプチドの半減期を延長するために、用いることができる。

【０２９６】
投与の頻度は、治療の経過にわたり決定および調整することができ、一般に、必ずしもではないが、疾患の処置および／または抑制および／または寛解および／または遅延に基づく。あるいは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの持続的な連続放出処方物が適切である場合がある。持続放出を達成するための多様な処方物およびデバイスは、当該分野において公知である。いくつかの態様において、投与量は、１日１回、２日に１回、３日に１回、４日に１回、５日に１回、または６日に１回である。いくつかの態様において、投与頻度は、１週間に１回、２週間に１回、４週間に１回、５週間に１回、６週間に１回、７週間に１回、８週間に１回、９週間に１回、もしくは１０週間に１回；または１か月に１回、２か月に１回、もしくは３か月に１回、またはそれより長くである。この治療の進行は、慣用的な技術およびアッセイにより、容易にモニタリングされる。
【０２９７】
投与レジメン（用いられるポリペプチドを含む）は、経時的に変更することができる。いくつかの態様において、正常な体重の成人対象について、約０．０１～１０００ｍｇ／ｋｇの範囲の用量を投与することができる。いくつかの態様において、用量は、１～２００ｍｇである。特定の投与レジメン、すなわち、用量、タイミングおよび反復は、特定の対象および対象の病歴、ならびにポリペプチドまたはポリヌクレオチドの特性（ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの半減期、および当該分野において周知の他の考慮点など）に依存するであろう。
【０２９８】
本開示の目的のために、本明細書において記載されるとおりの治療剤の適切な投与量は、使用される特定の剤（またはその組成物）、処方および投与の経路、疾患の型および重篤度、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが予防目的または治療目的のいずれのために投与されるか、先の治療、対象の病歴、およびアンタゴニストに対する応答、および主治医の裁量に依存するであろう。典型的には、医師は、所望される結果を達成する投与量に達するまで、ポリペプチドを投与するであろう。
【０２９９】
１つ以上の薬剤の投与は、例えば、患者の生理学的状態、投与の目的が治療的であるか予防的であるか、および熟練の医師にとって公知の他の要因に依存して、連続的であっても間欠的であってもよい。薬剤(例えば、がんワクチン)の投与は、本質的に、予め選択された期間にわたって連続的であってもよく、または、一連の間隔を空けた用量、例えば、疾患を発症する前、発症中、または発症後のいずれかであってもよい。本明細書において用いられる場合、用語「処置する」とは、疾患または疾患の症状、または疾病素因を、治癒させる（cure）か、治す（heal）か、緩和する（alleviate）か、軽減する（relieve）か、変化させるか、治療する（remedy）か、寛解させる（ameliorate）か、改善するか、またはこれに影響を及ぼすことを意味する。本明細書において用いられる場合、用語「処置すること」とは、本明細書に記載の組成物またはがんワクチンの、それを必要とする対象への適用または投与を指す。
【０３００】
「それを必要とする対象」とは、疾患、疾患の症状または疾病素因を有する個体を意味する。いくつかの態様において、対象は、哺乳動物である。いくつかの態様において、対象は、非ヒト霊長類である。いくつかの態様において、対象は、ヒトである。疾患を緩和させることは、疾患の発症もしくは進行を遅延させること、または疾患の重篤度を低下させることを含む。疾患を緩和させることは、必ずしも治癒的な結果を必要としない。
【０３０１】
そこにおいて用いられる場合、疾患の発症を「遅延させること」とは、疾患の進行を、延期させるか、妨害するか、遅める（slow）か、遅らせる（retard）か、安定化させるか、および／または延期させることを意味する。遅延は、病歴および／または処置されている個体に依存して、多様な時間の長さのものであってよい。疾患の発症を「遅延させる」かもしくは緩和する、または疾患の開始（onset）を遅延させる方法は、当該方法を用い

ない場合と比較して、所与の時間枠において疾患の１つ以上の症状を発症する可能性を低下させるか、および／または、所与の時間枠において症状の程度を軽減する方法である。かかる比較は、典型的には、統計学的に有意な結果を生じるために十分に多くの数の対象を用いる臨床研究に基づく。

【０３０２】

疾患の「発症」または「進行」は、初期症状および／またはその後に続く疾患の進行を意味する。疾患の発症は、当該分野において周知の標準的な臨床技術を用いて検出可能であり、評価することができる。しかし、発症はまた、検出不可能であり得る進行を指す。本開示の目的のために、発症または進行とは、症状の生物学的経過を指す。「発症」は、発生（occurrence）、再発および開始を含む。

【０３０３】

本明細書において用いられる場合、疾患の「開始」または「発生」は、最初の開始および／または再発を含む。医学の分野における当業者に公知の慣用的な方法を用いて、処置されるべき疾患の型または疾患の部位に依存して、単離されたポリペプチドまたは医薬組成物を対象に投与することができる。この組成物はまた、他の慣用的な経路を介して投与することができ、例えば、経口で、非経口で、吸入スプレーにより、局所的に、直腸内で、鼻内で、頬側内で、膣内で、または移植されたリザーバを介して、投与することができる。

【０３０４】

用語「非経口的」とは、本明細書において用いられる場合、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑膜内、胸骨内、くも膜下内、病巣内、および頭蓋内への、注射または注入技術を含む。加えて、それは、注射可能なデポーの投与の経路、例えば１、３または６か月のデポーによる注射可能または生分解性の材料および方法を介して、対象に投与することができる。

【０３０５】

さらなる詳細がなくとも、当業者は、上の記載に基づいて、本開示をその最大限の範囲まで利用することができると考えられる。以下の具体的な態様は、したがって、単に説明的なものとして解釈されるべきであり、決して本開示の残りを限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書において引用される全ての刊行物は、本明細書において言及される目的または主題のために参考として援用される。

【実施例】

【０３０６】

本明細書の開示がより完全に理解され得るために、以下の例を記載する。本願において記載される合成例は、本明細書において提供される化合物および方法を説明するために提供され、決してそれらの範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【０３０７】

例１：ガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメイン、デアミナーゼ、および塩基エディター

好適なガイドヌクレオチド配列によりプログラミング可能なＤＮＡ結合タンパク質ドメインの非限定的な例が提供される。本開示は、Ｃａｓ９バリアント、例えば１つ以上の生物からのＣａｓ９タンパク質を提供し、これは１つ以上の変異を含み得る（例えば、ｄＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼを創るため）。いくつかの態様において、以下でアステリスク（asterek）により同定されているＣａｓ９タンパク質のアミノ酸残基の１つ以上は、変異させられ得る。いくつかの態様において、配列番号１によって提供されるアミノ酸配列のＤ１０および／またはＨ８４０残基、または配列番号１１～２６０によって提供されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異は、変異している。いくつかの態様において、配列番号１によって提供されるアミノ酸配列のＤ１０残基、または配列番号１１～２６０によって提供されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異は、Ｄ以外のいずれかのアミノ酸残基に変異している。いくつかの態様において、配列番号１によって提供されるアミノ酸配列のＤ１０残基、または配列番号１１～２６０によって提供され

るアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異は、Ａに変異している。いくつかの態様において、配列番号１によって提供されるアミノ酸配列のＨ８４０残基、または配列番号１１～２６０によって提供されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する残基は、Ｈである。いくつかの態様において、配列番号１によって提供されるアミノ酸配列のＨ８４０残基、または配列番号１１～２６０によって提供されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異は、Ｈ以外のいずれかのアミノ酸残基に変異している。いくつかの態様において、配列番号１によって提供されるアミノ酸配列のＨ８４０残基、または配列番号１１～２６０によって提供されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する変異は、Ａに変異している。いくつかの態様において、配列番号１によって提供されるアミノ酸配列のＤ１０残基、または配列番号１１～２６０によって提供されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する残基は、Ｄである。

【０３０８】

様々な種からのいくつものＣａｓ９配列をアラインメントして、配列番号１または配列番号１１のＤ１０およびＨ８４０の対応する相同なアミノ酸残基が他のＣａｓ９タンパク質中に同定され、相同なアミノ酸残基の対応する変異を有するＣａｓ９バリアントの生成を許し得るかどうかを決定した。アラインメントはNCBI Constraint-based Multiple Alignment Tool（COBALT（st-va.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobaltにおいてアクセス可能）を用いて、次のパラメータによって実施した。アラインメントパラメータ：Gap Penalties -11, -1；End-Gap Penalties -5, -1。ＣＤＤパラメータ：Use RPS BLAST on；Blast E-value 0.003；Find Conserved columns and Recompute on。クエリクラスタリングパラメータ：Use query clusters on；Word Size 4；Max cluster distance 0.8；Alphabet Regular。

【０３０９】

４つのＣａｓ９配列の例示的なアラインメントを下に提供する。アラインメント中のＣａｓ９配列は、配列１（Ｓ１）：配列番号１１|WP_010922251|gi 499224711|ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus pyogenes］；配列２（Ｓ２）：配列番号１２|WP_039695303|gi 746743737|ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus gallolyticus］；配列３（Ｓ３）：配列番号１３|WP_045635197|gi 782887988|ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mitis］；配列４（Ｓ４）：配列番号１４|5AXW_A|gi 924443546|Staphylococcus AureusＣａｓ９である。ＨＮＨドメイン（太字かつ下線）およびＲｕｖＣドメイン（枠囲み）が４つの配列のそれぞれについて同定されている。Ｓ１中のアミノ酸残基１０および８４０とアラインメントされた配列中の相同なアミノ酸とは、それぞれのアミノ酸残基の次のアステリスクによって同定されている。

【数４１－１】

```
S1 1    --MDKK-YSIGLD*IGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI--GALLFDSG--ETAEATRLKRTARRRYT  73
S2 1    --MTKKNYSIGLD*IGTNSVGWAVITDDYKVPAKKMKVLGNTDKKYIKKNLL--GALLFDSG--ETAEATRLKRTARRRYT  74
S3 1    --M-KKGYSIGLD*IGTNSVGFAVITDDYKVPSKKMKVLGNTDKRFIKKNLI--GALLFDEG--TTAEARRLKRTARRRYT  73
S4 1    GSHMKRNYILGLD*IGITSVGYGII--DYET----------------RDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKR  61

S1 74   RRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL 153
S2 75   RRKNRLRYLQEIFANEIAKVDESFFQRLDESFLTDDDKTFDSHPIFGNKAEEDAYHQKFPTIYHLRKHLADSSEKADLRL 154
S3 74   RRKNRLRYLQEIFSEEMSKVDSSFFHRLDDSFLIPEDKRESKYPIFATLTEEKEYHKQFPTIYHLRKQLADSKEKTDLRL 153
S4 62   RRRHRIQRVKKLL---------------FDYNLLTD---------------------HSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEE 107

S1 154  IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEK  233
S2 155  VYLALAHMIKFRGHFLIEGELNAENTDVQKIFADFVGVYNRTFDDSHLSEITVDVASILTEKISKSRRLENLIKYYPTEK  234
S3 154  IYLALAHMIKYRGHFLYEEAFDIKNNDIQKIFNEFISIYDNTFEGSSLSGQNAQVEAIFTDKISKSAKRERVLKLFPDEK  233
S4 108  FSAALLHLAKRRG----------------------VHNVNEVEEDT---------------------------------  131

S1 234  KNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEIT 313
S2 235  KNTLFGNLIALALGLQPNFKTNFKLSEDAKLQFSKDTYEEDLEELLGKIGDDYADLFTSAKNLYDAILLSGILTVDDNST 314
S3 234  STGLFSEFLKLIVGNQADFKKHFDLEDKAPLQFSKDTYDEDLENLLGQIGDDFTDLFVSAKKLYDAILLSGILTVTDPST 313
S4 132  -----GNELS-----------------TKEQISRN------------------------------------------- 144

S1 314  KAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM--DGTEELLV  391
S2 315  KAPLSASMIKRYVEHHEDLEKLKEFIKANKSELYHDIFKDKNKNGYAGYIENGVKQDEFYKYLKNILSKIKIDGSDYFLD  394
S3 314  KAPLSASMIERYENHQNDLAALKQFIKNNLPEKYDEVFSDQSKDGYAGYIDGKTTQETFYKYIKNLLSKF--EGTDYFLD  391
S4 145  ----SKALEEKYVAELQ-------------------------------------------------LERLKKDG------  165

S1 392  KLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEE  471
S2 395  KIEREDFLRKQRTFDNGSIPHQIHLQEMHAILRRQGDYYPFLKEKQDRIEKILTFRIPYYVGPLVRKDSRFAWAEYRSDE  474
S3 392  KIEREDFLRKQRTFDNGSIPHQIHLQEMNAILRRQGEYYPFLKDNKEKIEKILTFRIPYYVGPLARGNRDFAWLTRNSDE  471
S4 166  --EVRGSINRFKTSD---------YVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGP--GEGSPFGW------K  227

S1 472  TITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDL 551
S2 475  KITPWNFDKVIDKEKSAEKFITRMTLNDLYLPEEKVLPKHSHVYETYAVYNELTKIKYVNEQGKE-SFFDSNMKQEIFDH 553
S3 472  AIRPWNFEEIVDKASSAEDFINKMTNYDLYLPEEKVLPKHSLLYETFAVYNELTKVKFIAEGLRDYQFLDSGQKKQIVNQ 551
```

【数４１－２】

```
S4 228  DIKEW----------------YEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEK---LEYYEKFQIIEN 289

S1 552  LFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDR---FNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED  628
S2 554  VFKENRKVTKEKLLNYLNKEFPEYRIKDLIGLDKENKSFNASLGTYHDLKKIL-DKAFLDDKVNEEVIEDIIKTLTLFED  632
S3 552  LFKENRKVTEKDIIHYLHN-VDGYDGIELKGIEKQ---FNASLSTYHDLLKIIKDKEFMDDAKNEAILENIVHTLTIFED  627
S4 290  VFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEF---TNLKVYHDIKDITARKEII---ENAELLDQIAKILTIYQS  363

S1 629  REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKR-RRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKED 707
S2 633  KDMIHERLQKYSDIFTANQLKKLER-RHYTGWGRLSYKLINGIRNKENNKTILDYLIDDGSANRNFMQLINDDTLPFKQI 711
S3 628  REMIKQRLAQYDSLFDEKVIKALTR-RHYTGWGKLSAKLINGICDKQTGNTILDYLIDDGKINRNFMQLINDDGLSFKEI 706
S4 364  SEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDE------LWHTNDNQIAIFNRLKLVP--------- 428

S1 708  IQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTT------QKGQKNSRERM 781
S2 712  IQKSQVVGDVDDIEAVVHDLPGSPAIKKGILQSVKIVDELVKVMG-GNPDNIVIEMARENQTT------NRGRSQSQQRL 784
S3 707  IQKAQVIGKTDDVKQVVQELSGSPAIKKGILQSIKIVDELVKVMG-HAPESIVIEMARENQTT------ARGKKNSQQRY 779
S4 429  -KKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYG--LPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTN 505

S1 782  KRIEEGIKELGSQIL--------KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD----YDVDH*IVPQSFLKDD  850
S2 785  KKLQNSLKELGSNILNEEKPSYIEDKVENSHLQNDQLFLYYIQNGKDMYTGDELDIDHLSD----YDIDH*IIPQAFIKDD  860
S3 780  KRIEDSLKILASGL---DSNILKENPTDNNQLQNDRLFLYYLQNGKDMYTGEALDINQLSS----YDIDH*IIPQAFIKDD  852
S4 506  ERIEEIIRTTGK----------------ENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDH*IIPRSVSFDN  570

S1 851  SIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN-LTKAERGGL-SELD------KAGFIKRQLV 922
S2 861  SIDNRVLTSSAKNRGKSDDVPSLDIVRARKAEWVRLYKSGLISKRKFDN-LTKAERGGL-TEAD------KAGFIKRQLV 932
S3 853  SLDNRVLTSSKDNRGKSDNVPSIEVVQKRKAFWQQLLDSKLISERKFNN-LTKAERGGL-DERD------KVGFIKRQLV 924
S4 571  SFNNKVLVKQEEASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLV 650

S1 923  ETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP 1002
S2 933  ETRQITKHVAQILDARFNTEHDENDKVIRDVKVITLKSNLVSQFRKDFEFYKVREINDYHHAHDAYLNAVVGTALLKKYP 1012
S3 925  ETRQITKHVAQILDARYNTEVNEKDKKNRTVKIITLKSNLVSNFRKEFRLYKVREINDYHHAHDAYLNAVVAKAILKKYP 1004
S4 651  DTRYATRGLMNLLRSYFRVN-------NLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIA---------- 712

S1 1003 KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ--EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKG--- 1077
S2 1013 KLASEFVYGEYKKYDIRKFITNSSD-----KATAKYFFYSNLMNFFKTKVKYADGTVFERPIIETNAD-GEIAWNKQ--- 1083
S3 1005 KLEPEFVYGEYQKYDLKRYISRSKDPKEVEKATEKYFFYSNLLNFFKEEVHYADGTIVKRENIEYSKDTGEIAWNKE--- 1081
S4 713  --NADFIFKEWKKLDKAKKVMENQM-------------------------FEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIK  764

S1 1078 -----RDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD---WDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKV 1149
S2 1084 -----IDFEKVRKVLSYPQVNIVKKVETQTGGFSKESILPKGDSDKLIPRKTKKVYWDTKKYGGFDSPTVAYSVFVVADV 1158
S3 1082 -----KDFAIIKKVLSLPQVNIVKKREVQTGGFSKESILPKGNSDKLIPRKTKDILLDTTKYGGFDSPVIAYSILLIADI 1156
S4 765  HIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKL----KKLIN-KSP----EKLLMYHH  835

S1 1150 EKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPI-DFLEAKG-----YKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG 1223
S2 1159 EKGKAKKLKTVKELVGISIMERSFFEENPV-EFLENKG-----YHNIREDKLIKLPKYSLFEFEGGRRRLLASASELQKG 1232
S3 1157 EKGKAKKLKTVKTLVGITIMEKAAFEENPI-TFLENKG-----YHNVRKENILCLPKYSLFELENGRRRLLASAKELQKG 1230
S4 836  DPQTYQKLK---------LIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKV  907

S1 1224 NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKH------ 1297
S2 1233 NEMVLPGYLVELLYHAHRADNF-----NSTEYLNYVSEHKKEFEKVLSCVEDFANLYVDVEKNLSKIRAVADSM------ 1301
```

【数４１－３】

```
S3 1231 NEIVLPVYLTTLLYHSKNVHKL-----DEPGHLEYIQKHRNEFKDLLNLVSEFSQKYVLADANLEKIKSLYADN------ 1299
S4 908  VKLSLKPYRFD-VYLDNGVYKFV-----TVKNLDVIK--KENYYEVNSKAYEEAKKLKKISNQAEFIASFYNNDLIKING  979

S1 1298 RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIT--------GLYETRI----DLSQL 1365
S2 1302 DNFSIEEISNSFINLLTLTALGAPADFNFLGEKIPRKRYTSTKECLNATLIHQSIT--------GLYETRI----DLSKL 1369
S3 1300 EQADIEILANSFINLLTFTALGAPAAFKFFGKDIDRKRYTTVSEILNATLIHQSIT--------GLYETWI----DLSKL 1367
S4 980  ELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYR-EYLENMNDKRPPRIIKTIASKT---QSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKK 1055

S1 1366 GGD  1368
S2 1370 GEE  1372
S3 1368 GED  1370
S4 1056 G--  1056
```

【０３１０】

アラインメントは、当分野において公知のアラインメントプログラムおよびアルゴリズムを用いて、参照配列または参照残基とアラインメントするアミノ酸配列または残基を同定することによって、参照Ｃａｓ９アミノ酸配列またはアミノ酸残基に対して相同であるアミノ酸配列およびアミノ酸残基が、異なる種からのＣａｓ９配列を包含するがこれに限定されないＣａｓ９配列バリアントから同定され得るということを実証している。本開示は、配列番号１１～１４中のアステリスクによって同定されているアミノ酸残基の１つ以上（例えば、それぞれＳ１、Ｓ２、Ｓ３、およびＳ４）がここに記載されるように変異した、Ｃａｓ９バリアントを提供する。配列番号１１～１４においてアステリスクによって同定されている残基に対応する配列番号１のＣａｓ９の残基Ｄ１０およびＨ８４０は、ここにおいて「相同な」または「対応する」残基と言われる。かかる相同な残基は、例えば上に記載されているように配列アラインメントによって、参照配列または残基とアラインメントする配列または残基を同定することによって同定され得る。類似に、ここにおける配列番号１中の同定された変異、例えば配列番号１の残基１０および８４０の変異に対応するＣａｓ９配列の変異は、ここにおいて「相同な」または「対応する」変異と言われる。例えば、上の４つのアラインメントされた配列について、配列番号１またはＳ１（配列番号１１）のＤ１０Ａ変異に対応する変異は、Ｓ２ではＤ１１Ａ、Ｓ３ではＤ１０Ａ、Ｓ４ではＤ１３Ａであり；配列番号１またはＳ１（配列番号１１）のＨ８４０Ａに対応する変異は、Ｓ２ではＨ８５０Ａ、Ｓ３ではＨ８４２Ａ、Ｓ４ではＨ５６０Ａである。

【０３１１】

異なる種からの合計２５０個のＣａｓ９配列（配列番号１１～２６０）が提供される。配列番号１の残基１０および８４０に対して相同なアミノ酸残基は、上で概要を述べたものと同じ様式において同定することができる。これらのＣａｓ９配列の全てを、本開示に従って用いることができる。

WP_010922251.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus pyogenes］配列番号１１
WP_039695303.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus gallolyticus］配列番号１２
WP_045635197.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mitis］配列番号１３
5AXW_A：Cas9、A鎖、結晶構造［Staphylococcus Aureus］配列番号１４
WP_009880683.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus pyogenes］配列番号１５
WP_010922251.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus pyogenes］配列番号１６
WP_011054416.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py

ogenes］配列番号１７
WP_011284745.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号１８
WP_011285506.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号１９
WP_011527619.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号２０
WP_012560673.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号２１
WP_014407541.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号２２
WP_020905136.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号２３
WP_023080005.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号２４
WP_023610282.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号２５
WP_030125963.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号２６
WP_030126706.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号２７
WP_031488318.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号２８
WP_032460140.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号２９
WP_032461047.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号３０
WP_032462016.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号３１
WP_032462936.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号３２
WP_032464890.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号３３
WP_033888930.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号３４
WP_038431314.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号３５
WP_038432938.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号３６
WP_038434062.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus py
ogenes］配列番号３７
BAQ51233.1：CRISPR関連タンパク質、Csn1ファミリー［Streptococcus pyogenes］配列番
号３８
KGE60162.1：仮説上のタンパク質MGAS2111_0903［Streptococcus pyogenes MGAS2111］配
列番号３９
KGE60856.1：CRISPR関連エンドヌクレアーゼタンパク質［Streptococcus pyogenes SS144
7］配列番号４０
WP_002989955.1：多種：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococ
cus］配列番号４１
WP_003030002.1：多種：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococ

cus］配列番号４２
WP_003065552.1：多種：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus］配列番号４３
WP_001040076.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号４４
WP_001040078.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号４５
WP_001040080.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号４６
WP_001040081.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号４７
WP_001040083.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号４８
WP_001040085.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号４９
WP_001040087.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号５０
WP_001040088.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号５１
WP_001040089.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号５２
WP_001040090.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号５３
WP_001040091.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号５４
WP_001040092.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号５５
WP_001040094.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号５６
WP_001040095.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号５７
WP_001040096.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号５８
WP_001040097.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号５９
WP_001040098.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号６０
WP_001040099.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号６１
WP_001040100.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号６２
WP_001040104.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号６３
WP_001040105.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号６４
WP_001040106.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号６５
WP_001040107.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus agalactiae］配列番号６６
WP_001040108.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag

alactiae］配列番号６７
WP_001040109.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号６８
WP_001040110.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号６９
WP_015058523.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号７０
WP_017643650.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号７１
WP_017647151.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号７２
WP_017648376.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号７３
WP_017649527.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号７４
WP_017771611.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号７５
WP_017771984.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号７６
CFQ25032.1：CRISPR関連タンパク質［Streptococcus agalactiae］配列番号７７
CFV16040.1：CRISPR関連タンパク質［Streptococcus agalactiae］配列番号７８
KLJ37842.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus agalactiae］配列番号７９
KLJ72361.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus agalactiae］配列番号８０
KLL20707.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus agalactiae］配列番号８１
KLL42645.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus agalactiae］配列番号８２
WP_047207273.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号８３
WP_047209694.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号８４
WP_050198062.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号８５
WP_050201642.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号８６
WP_050204027.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号８７
WP_050881965.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号８８
WP_050886065.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus ag
alactiae］配列番号８９
AHN30376.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus agalactiae 138P］配列番号９
０
EAO78426.1：網状赤血球結合タンパク質［Streptococcus agalactiae H36B］配列番号９
１
CCW42055.1：CRISPR関連タンパク質、SAG0894ファミリー［Streptococcus agalactiae IL
RI112］配列番号９２
WP_003041502.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus an
ginosus］配列番号９３
WP_037593752.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus an
ginosus］配列番号９４
WP_049516684.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus anginosus］配列番号９５

GAD46167.1：仮説上のタンパク質ANG6_0662［Streptococcus anginosus T5］配列番号９６
WP_018363470.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus caballi］配列番号９７
WP_003043819.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus canis］配列番号９８
WP_006269658.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus constellatus］配列番号９９
WP_048800889.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus constellatus］配列番号１００
WP_012767106.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus dysgalactiae］配列番号１０１
WP_014612333.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus dysgalactiae］配列番号１０２
WP_015017095.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus dysgalactiae］配列番号１０３
WP_015057649.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus dysgalactiae］配列番号１０４
WP_048327215.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus dysgalactiae］配列番号１０５
WP_049519324.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus dysgalactiae］配列番号１０６
WP_012515931.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus equi］配列番号１０７
WP_021320964.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus equi］配列番号１０８
WP_037581760.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus equi］配列番号１０９
WP_004232481.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus equinus］配列番号１１０
WP_009854540.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus gallolyticus］配列番号１１１
WP_012962174.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus gallolyticus］配列番号１１２
WP_039695303.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus gallolyticus］配列番号１１３
WP_014334983.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus infantarius］配列番号１１４
WP_003099269.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus iniae］配列番号１１５
AHY15608.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus iniae］配列番号１１６
AHY17476.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus iniae］配列番号１１７
ESR09100.1：仮説上のタンパク質IUSA1_08595［Streptococcus iniae IUSA1］配列番号１１８
AGM98575.1：CRISPR関連タンパク質Cas9/Csn1、サブタイプII/NMEMI［Streptococcus iniae SF1］配列番号１１９
ALF27331.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus intermedius］配列番号１２０
WP_018372492.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus massiliensis］配列番号１２１
WP_045618028.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mi

tis］配列番号１２２
WP_045635197.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mi
tis］配列番号１２３
WP_002263549.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１２４
WP_002263887.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１２５
WP_002264920.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１２６
WP_002269043.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１２７
WP_002269448.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１２８
WP_002271977.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１２９
WP_002272766.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１３０
WP_002273241.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１３１
WP_002275430.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１３２
WP_002276448.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１３３
WP_002277050.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１３４
WP_002277364.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１３５
WP_002279025.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１３６
WP_002279859.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１３７
WP_002280230.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１３８
WP_002281696.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１３９
WP_002282247.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１４０
WP_002282906.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１４１
WP_002283846.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１４２
WP_002287255.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１４３
WP_002288990.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１４４
WP_002289641.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１４５
WP_002290427.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu
tans］配列番号１４６
WP_002295753.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mu

tans］配列番号１４７
WP_002296423.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１４８
WP_002304487.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１４９
WP_002305844.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１５０
WP_002307203.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１５１
WP_002310390.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１５２
WP_002352408.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１５３
WP_012997688.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１５４
WP_014677909.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１５５
WP_019312892.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１５６
WP_019313659.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１５７
WP_019314093.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１５８
WP_019315370.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１５９
WP_019803776.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１６０
WP_019805234.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１６１
WP_024783594.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１６２
WP_024784288.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１６３
WP_024784666.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１６４
WP_024784894.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１６５
WP_024786433.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus mutans］配列番号１６６
WP_049473442.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus mutans］配列番号１６７
WP_049474547.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus mutans］配列番号１６８
EMC03581.1：仮説上のタンパク質SMU69_09359［Streptococcus mutans NLML4］配列番号１６９
WP_000428612.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus oralis］配列番号１７０
WP_000428613.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus oralis］配列番号１７１
WP_049523028.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus parasanguinis］配列番号１７２
WP_003107102.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus pa

rauberis］配列番号１７３
WP_054279288.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus phocae］配列番号１７４
WP_049531101.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus pseudopneumoniae］配列番号１７５
WP_049538452.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus pseudopneumoniae］配列番号１７６
WP_049549711.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus pseudopneumoniae］配列番号１７７
WP_007896501.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus pseudoporcinus］配列番号１７８
EFR44625.1：CRISPR関連タンパク質、Csn1ファミリー［Streptococcus pseudoporcinus SPIN 20026］配列番号１７９
WP_002897477.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus sanguinis］配列番号１８０
WP_002906454.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus sanguinis］配列番号１８１
WP_009729476.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus sp. F0441］配列番号１８２
CQR24647.1：CRISPR関連タンパク質［Streptococcus sp. FF10］配列番号１８３
WP_000066813.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus sp. M334］配列番号１８４
WP_009754323.1 ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus sp. taxon 056］配列番号１８５
WP_044674937.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus suis］配列番号１８６
WP_044676715.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus suis］配列番号１８７
WP_044680361.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus suis］配列番号１８８
WP_044681799.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Streptococcus suis］配列番号１８９
WP_049533112.1：CRISPR関連タンパク質Csn1［Streptococcus suis］配列番号１９０
WP_029090905.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Brochothrix thermosphacta］配列番号１９１
WP_006506696.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Catenibacterium mitsuokai］配列番号１９２
AIT42264.1：Cas9hc：NLS：HA［クローニングベクターpYB196］配列番号１９３
WP_034440723.1：ＩＩ型CRISPRエンドヌクレアーゼCas9［Clostridiales bacterium S5-A11］配列番号１９４
AKQ21048.1：Cas9［CRISPR媒介型遺伝子ターゲティングベクターp（bhsp68-Cas9）］配列番号１９５
WP_004636532.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Dolosigranulum pigrum］配列番号１９６
WP_002364836.1：多種：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus］配列番号１９７
WP_016631044.1：多種：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus］配列番号１９８
EMS75795.1：仮説上のタンパク質H318_06676［Enterococcus durans IPLA 655］配列番号１９９

WP_002373311.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecalis］配列番号２００
WP_002378009.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecalis］配列番号２０１
WP_002407324.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecalis］配列番号２０２
WP_002413717.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecalis］配列番号２０３
WP_010775580.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecalis］配列番号２０４
WP_010818269.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecalis］配列番号２０５
WP_010824395.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecalis］配列番号２０６
WP_016622645.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecalis］配列番号２０７
WP_033624816.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecalis］配列番号２０８
WP_033625576.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecalis］配列番号２０９
WP_033789179.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecalis］配列番号２１０
WP_002310644.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecium］配列番号２１１
WP_002312694.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecium］配列番号２１２
WP_002314015.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecium］配列番号２１３
WP_002320716.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecium］配列番号２１４
WP_002330729.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecium］配列番号２１５
WP_002335161.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecium］配列番号２１６
WP_002345439.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecium］配列番号２１７
WP_034867970.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecium］配列番号２１８
WP_047937432.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus faecium］配列番号２１９
WP_010720994.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus hirae］配列番号２２０
WP_010737004.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus hirae］配列番号２２１
WP_034700478.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus hirae］配列番号２２２
WP_007209003.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus italicus］配列番号２２３
WP_023519017.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus mundtii］配列番号２２４

WP_010770040.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus phoeniculicola］配列番号２２５
WP_048604708.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus sp. AM1］配列番号２２６
WP_010750235.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Enterococcus villorum］配列番号２２７
AII16583.1：Cas9エンドヌクレアーゼ［発現ベクターpCas9］配列番号２２８
WP_029073316.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Kandleria vitulina］配列番号２２９
WP_031589969.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Kandleria vitulina］配列番号２３０
KDA45870.1：CRISPR関連タンパク質Cas9/Csn1、サブタイプII/NMEMI［Lactobacillus animalis］配列番号２３１
WP_039099354.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Lactobacillus curvatus］配列番号２３２
AKP02966.1：仮説上のタンパク質ABB45_04605［Lactobacillus farciminis］配列番号２３３
WP_010991369.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria innocua］配列番号２３４
WP_033838504.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria innocua］配列番号２３５
EHN60060.1：CRISPR関連タンパク質、Csn1ファミリー［Listeria innocua ATCC 33091］配列番号２３６
EFR89594.1：crispr関連タンパク質，Csn1ファミリー［Listeria innocua FSL S4-378］配列番号２３７
WP_038409211.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria ivanovii］配列番号２３８
EFR95520.1：crispr関連タンパク質Csn1［Listeria ivanovii FSL F6-596］配列番号２３９
WP_003723650.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria monocytogenes］配列番号２４０
WP_003727705.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria monocytogenes］配列番号２４１
WP_003730785.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria monocytogenes］配列番号２４２
WP_003733029.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria monocytogenes］配列番号２４３
WP_003739838.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria monocytogenes］配列番号２４４
WP_014601172.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria monocytogenes］配列番号２４５
WP_023548323.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria monocytogenes］配列番号２４６
WP_031665337.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria monocytogenes］配列番号２４７
WP_031669209.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria monocytogenes］配列番号２４８
WP_033920898.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria monocytogenes］配列番号２４９
AKI42028.1：CRISPR関連タンパク質［Listeria monocytogenes］配列番号２５０

AKI50529.1：CRISPR関連タンパク質［Listeria monocytogenes］配列番号２５１
EFR83390.1：crispr関連タンパク質Csn1［Listeria monocytogenes FSL F2-208］配列番号２５２
WP_046323366.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Listeria seeligeri］配列番号２５３
AKE81011.1：Cas9［植物多重ゲノム編集ベクターpYLCRISPR/Cas9Pubi-H］配列番号２５４
CUO82355.1：細菌において保存されているまだ特徴づけられていないタンパク質［Roseburia hominis］配列番号２５５
WP_033162887.1：ＩＩ型CRISPR RNAガイド型エンドヌクレアーゼCas9［Sharpea azabuensis］配列番号２５６
AGZ01981.1：Cas9エンドヌクレアーゼ［合成コンストラクト］配列番号２５７
AKA60242.1：ヌクレアーゼ欠損Cas9［合成コンストラクト］配列番号２５８
AKS40380.1：Cas9［合成プラスミドpFC330］配列番号２５９
4UN5_B：Cas9、Ｂ鎖、結晶構造、配列番号２６０

【０３１２】

好適なデアミナーゼドメインの非限定的な例を提供する。

ヒトＡＩＤ

【数４２】

MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGYLRNKNGCHVELLFLRYISD
WDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGNPNLSLRIFTARLYFCEDRKAEPEGLRRLHRAGV
QIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHENSVRLSRQLRRILLPLYEVDDLRDAFRTLGL（
配列番号303)（下線：核局剤シグナル；二重下線：核外輸送シグナル）

マウスＡＩＤ

【数４３】

MDSLLMKQKKFLYHFKNVRWAKGRHETYLCYVVKRRDSATSCSLDFGHLRNKSGCHVELLFLRYISD
WDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVAEFLRWNPNLSLRIFTARLYFCEDRKAEPEGLRRLHRAGV
QIGIMTFKDYFYCWNTFVENRERTFKAWEGLHENSVRLTRQLRRILLPLYEVDDLRDAFRMLGF（
配列番号271)（下線：核局剤シグナル；二重下線：核外輸送シグナル）

イヌＡＩＤ

【数４４】

MDSLLMKQRKFLYHFKNVRWAKGRHETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGHLRNKSGCHVELLFLRYISD
WDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGYPNLSLRIFAARLYFCEDRKAEPEGLRRLHRAGV
QIAIMTFKDYFYCWNTFVENREKTFKAWEGLHENSVRLSRQLRRILLPLYEVDDLRDAFRTLGL（
配列番号272)（下線：核局剤シグナル；二重下線：核外輸送シグナル）

ウシＡＩＤ

【数４５】

MDSLLKKQRQFLYQFKNVRWAKGRHETYLCYVVKRRDSPTSFSLDFGHLRNKAGCHVELLFLRYISD
WDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGYPNLSLRIFTARLYFCDKERKAEPEGLRRLHRAG
VQIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHENSVRLSRQLRRILLPLYEVDDLRDAFRTLGL
（配列番号　273)（下線：核局剤シグナル；二重下線：核外輸送シグナル）

ラットＡＩＤ
【数４６】
MAVGSKPKAALVGPHWERERIWCFLCSTGLGTQQTGQTSRWLRPAATQDPVSPPRSLLMKQRKFLYH
FKNVRWAKGRHETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGYLRNKSGCHVELLFLRYISDWDLDPGRCYRVTWF
TSWSPCYDCARHVADFLRGNPNLSLRIFTARLTGWGALPAGLMSPARPSDYFYCWNTFVENHERTFKA
WEGLHENSVRLSRRLRRILLPLYEVDDLRDAFRTLGL（配列番号　1072）

マウスＡＰＯＢＥＣ－３
【数４７】
MGPFCLGCSHRKCYSPIRNLISQETFKFHFKNLGYAKGRKDTFLCYEVTRKDCDSPVSLHHGVFKNKD
NI*HAEICFLYWFHDKVLKVLSPREEFKITWYMSWSPCFEC*AEQIVRFLATHHNLSLDIFSSRLYNVQDPETQ
QNLCRLVQEGAQVAAMDLYEFKKCWKKFVDNGGRRFRPWKRLLTNFRYQDSKLQEILRPCYIPVPSS
SSSTLSNICLTKGLPETRFCVEGRRMDPLSEEEFYSQFYNQRVKHLCYYHRMKPYLCYQLEQFNGQAPL
KGCLLSEKGKQ*HAEILFLDKIRSMELSQVTITCYLTWSPCPNC*AWQLAAFKRDRPDLILHIYTSRLYFHWK
RPFQKGLCSLWQSGILVDVMDLPQFTDCWTNFVNPKRPFWPWKGLEIISRRTQRRLRRIKESWGLQDL
VNDFGNLQLGPPMS（配列番号　274）（斜体：核酸編集ドメイン　）

ラットＡＰＯＢＥＣ－３
【数４８】
MGPFCLGCSHRKCYSPIRNLISQETFKFHFKNLRYAIDRKDTFLCYEVTRKDCDSPVSLHHGVFKNKDN
I*HAEICFLYWFHDKVLKVLSPREEFKITWYMSWSPCFEC*AEQVLRFLATHHNLSLDIFSSRLYNIRDPENQQ
NLCRLVQEGAQVAAMDLYEFKKCWKKFVDNGGRRFRPWKKLLTNFRYQDSKLQEILRPCYIPVPSSSS
STLSNICLTKGLPETRFCVERRRVHLLSEEEFYSQFYNQRVKHLCYYHGVKPYLCYQLEQFNGQAPLKG
CLLSEKGKQ*HAEILFLDKIRSMELSQVIITCYLTWSPCPNC*AWQLAAFKRDRPDLILHIYTSRLYFHWKRPF
QKGLCSLWQSGILVDVMDLPQFTDCWTNFVNPKRPFWPWKGLEIISRRTQRRLHRIKESWGLQDLVND
FGNLQLGPPMS（配列番号　275）（斜体：核酸編集ドメイン　）

アカゲザルＡＰＯＢＥＣ－３Ｇ
【数４９】
MVEPMDPRTFVSNFNNRPILSGLNTVWLCCEVKTKDPSGPPLDAKIFQGKVYSKAKY*HPEMRFLRWFH*
*KWRQLHHDQEYKVTWYVSWSPCTRC*ANSVATFLAKDPKVTLTIFVARLYYFWKPDYQQALRILCQKRG
GPHATMKIMNYNEFQDCWNKFVDGRGKPFKPRNNLPKHYTLLQATLGELLRHLMDPGTFTSNFNNKP
WVSGQHETYLCYKVERLHNDTWVPLNQHRGFLRNQAPNIHGFPKGR*HAELCFLDLIPFWKLDGQQYRV*
*TCFTSWSPCFSC*AQEMAKFISNNEHVSLCIFAARIYDDQGRYQEGLRALHRDGAKIAMMNYSEFEYCW
DTFVDRQGRPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAI（配列番号　276）（斜体：核酸編集ドメイン；
下線：細胞質局在シグナル　）

チンパンジーＡＰＯＢＥＣ－３Ｇ

【数５０】

MKPHFRNPVERMYQDTFSDNFYNRPILSHRNTVWLCYEVKTKGPSRPPLDAKIFRGQVYSKLKY*HPEM*
*RFFHWFSKWRKLHRDQEYEVTWYISWSPCTKC*TRDVATFLAEDPKVTLTIFVARLYYFWDPDYQEALRS
LCQKRDGPRATMKIMNYDEFQHCWSKFVYSQRELFEPWNNLPKYYILLHIMLGEILRHSMDPPTFTSN
FNNELWVRGRHETYLCYEVERLHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGR*HAELCFLDVIPFWKLD*
*LHQDYRVTCFTSWSPCFSC*AQEMAKFISNNKHVSLCIFAARIYDDQGRCQEGLRTLAKAGAKISIMTYSE
FKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLEEHSQALSGRLRAILQNQGN（配列番号 277)（斜体：核酸編集ドメイン；下線：細胞質局在シグナル）

ミドリザルＡＰＯＢＥＣ－３Ｇ

【数５１】

MNPQIRNMVEQMEPDIFVYYFNNRPILSGRNTVWLCYEVKTKDPSGPPLDANIFQGKLYPEAKD*HPEM*
*KFLHWFRKWRQLHRDQEYEVTWYVSWSPCTRC*ANSVATFLAEDPKVTLTIFVARLYYFWKPDYQQALRI
LCQERGGPHATMKIMNYNEFQHCWNEFVDGQGKPFKPRKNLPKHYTLLHATLGELLRHVMDPGTFTS
NFNNKPWVSGQRETYLCYKVERSHNDTWVLLNQHRGFLRNQAPDRHGFPKGR*HAELCFLDLIPFWKL*
*DDQQYRVTCFTSWSPCFSC*AQKMAKFISNNKHVSLCIFAARIYDDQGRCQEGLRTLHRDGAKIAVMNYS
EFEYCWDTFVDRQGRPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAI（配列番号 278)（斜体：核酸編集ドメイン；下線：細胞質局在シグナル）

ヒトＡＰＯＢＥＣ－３Ｇ

【数５２】

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPPLDAKIFRGQVYSELKY*HPEM*
*RFFHWFSKWRKLHRDQEYEVTWYISWSPCTKC*TRDMATFLAEDPKVTLTIFVARLYYFWDPDYQEALRS
LCQKRDGPRATMKIMNYDEFQHCWSKFVYSQRELFEPWNNLPKYYILLHIMLGEILRHSMDPPTFTFN
FNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGR*HAELCFLDVIPFWKLD*
*LDQDYRVTCFTSWSPCFSC*AQEMAKFISKNKHVSLCIFTARIYDDQGRCQEGLRTLAEAGAKISIMTYSE
FKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQDLSGRLRAILQNQEN（配列番号 279)（斜体：核酸編集ドメイン；下線：細胞質局在シグナル）

ヒトＡＰＯＢＥＣ－３Ｆ

【数５３】

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPRLDAKIFRGQVYSQPEH*HAEM*
*CFLSWFCGNQLPAYKCFQITWFVSWTPCPDC*VAKLAEFLAEHPNVTLTISAARLYYYWERDYRRALCRL
SQAGARVKIMDDEEFAYCWENFVYSEGQPFMPWYKFDDNYAFLHRTLKEILRNPMEAMYPHIFYFHF
KNLRKAYGRNESWLCFTMEVVKHHSPVSWKRGVFRNQVDPETHC*HAERCFLSWFCDDILSPNTNYEVT*
*WYTSWSPCPEC*AGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLYYFWDTDYQEGLRSLSQEGASVEIMGYKDFKYCW
ENFVYNDDEPFKPWKGLKYNFLFLDSKLQEILE（配列番号 280)（斜体：核酸編集ドメイン）

ヒトＡＰＯＢＥＣ－３Ｂ：

【数５４】

MNPQIRNPMERMYRDTFYDNFENEPILYGRSYTWLCYEVKIKRGRSNLLWDTGVFRGQVYFKPQY*HA*
*EMCFLSWFCGNQLPAYKCFQITWFVSWTPCPDC*VAKLAEFLSEHPNVTLTISAARLYYYWERDYRRALC
RLSQAGARVTIMDYEEFAYCWENFVYNEGQQFMPWYKFDENYAFLHRTLKEILRYLMDPDTFTFNFN
NDPLVLRRRQTYLCYEVERLDNGTWVLMDQHMGFLCNEAKNLLCGFY*GRHAELRFLDLVPSLQLDPA*
*QIYRVTWFISWSPCFSWGC*AGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYD
EFEYCWDTFVYRQGCPFQPWDGLEEHSQALSGRLRAILQNQGN（配列番号　281）（斜体：核酸編集ドメイン　）

ラットＡＰＯＢＥＣ－３Ｂ：

【数５５】

MQPQGLGPNAGMGPVCLGCSHRRPYSPIRNPLKKLYQQTFYFHFKNVRYAWGRKNNFLCYEVNGMD
CALPVPLRQGVFRKQGHIHAELCFIYWFHDKVLRVLSPMEEFKVTWYMSWSPCSKCAEQVARFLAAH
RNLSLAIFSSRLYYYLRNPNYQQKLCRLIQEGVHVAAMDLPEFKKCWNKFVDNDGQPFRPWMRLRINF
SFYDCKLQEIFSRMNLLREDVFYLQFNNSHRVKPVQNRYYRRKSYLCYQLERANGQEPLKGYLLYKK
GEQHVEILFLEKMRSMELSQVRITCYLTWSPCPNCARQLAAFKKDHPDLILRIYTSRLYFYWRKKFQKG
LCTLWRSGIHVDVMDLPQFADCWTNFVNPQRPFRPWNELEKNSWRIQRRLRRIKESWGL（配列番号　1073）

ウシＡＰＯＢＥＣ－３Ｂ：

【数５６】

DGWEVAFRSGTVLKAGVLGVSMTEGWAGSGHPGQGACVWTPGTRNTMNLLREVLFKQQFGNQPRV
PAPYYRRKTYLCYQLKQRNDLTLDRGCFRNKKQRHAEIRFIDKINSLDLNPSQSYKIICYITWSPCPNCA
NELVNFITRNNHLKLEIFASRLYFHWIKSFKMGLQDLQNAGISVAVMTHTEFEDCWEQFVDNQSRPFQP
WDKLEQYSASIRRRLQRILTAPI（配列番号　1074）

チンパンジーＡＰＯＢＥＣ－３Ｂ：

【数５７】

MNPQIRNPMEWMYQRTFYYNFENEPILYGRSYTWLCYEVKIRRGHSNLLWDTGVFRGQMYSQPEHH
AEMCFLSWFCGNQLSAYKCFQITWFVSWTPCPDCVAKLAKFLAEHPNVTLTISAARLYYYWERDYRR
ALCRLSQAGARVKIMDDEEFAYCWENFVYNEGQPFMPWYKFDDNYAFLHRTLKEIIRHLMDPDTFTF
NFNNDPLVLRRHQTYLCYEVERLDNGTWVLMDQHMGFLCNEAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQ
LDPAQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGQVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQMLRDAGAQVS
IMTYDEFEYCWDTFVYRQGCPFQPWDGLEEHSQALSGRLRAILQVRASSLCMVPHRPPPPPQSPGPCLP
LCSEPPLGSLLPTGRPAPSLPFLLTASFSFPPPASLPPLPSLSLSPGHLPVPSFHSLTSCSIQPPCSSRIRETEG
WASVSKEGRDLG（配列番号　1075）

ヒトＡＰＯＢＥＣ－３Ｃ：

【数５８】

MNPQIRNPMKAMYPGTFYFQFKNLWEANDRNETWLCFTVEGIKRRSVVSWKTGVFRNQVDSETH*CH*
*AERCFLSWFCDDILSPNTKYQVTWYTSWSPCPDC*AGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLYYFQYPCYQEGLR
SLSQEGVAVEIMDYEDFKYCWENFVYNDNEPFKPWKGLKTNFRLLKRRLRESLQ（配列番号　282）
（斜体：核酸編集ドメイン　）

ゴリラＡＰＯＢＥＣ－３Ｃ：
【数５９】

MNPQIRNPMKAMYPGTFYFQFKNLWEANDRNETWLCFTVEGIKRRSVVSWKTGVFRNQVDSETHCH
AERCFLSWFCDDILSPNTNYQVTWYTSWSPCPECAGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLYYFQDTDYQEG
LRSLSQEGVAVKIMDYKDFKYCWENFVYNDDEPFKPWKGLKYNFRFLKRRLQEILE（配列番号
1076）

ヒトＡＰＯＢＥＣ－３Ａ：
【数６０】

MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFY
GR*HAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFISWSPCFSWGC*AGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKE
ALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGN（
配列番号283）（斜体：核酸編集ドメイン　）

アカゲザルＡＰＯＢＥＣ－３Ａ：
【数６１】

MDGSPASRPRHLMDPNTFTFNFNNDLSVRGRHQTYLCYEVERLDNGTWVPMDERRGFLCNKAKNVP
CGDYGCHVELRFLCEVPSWQLDPAQTYRVTWFISWSPCFRRGCAGQVRVFLQENKHVRLRIFAARIYD
YDPLYQEALRTLRDAGAQVSIMTYEEFKHCWDTFVDRQGRPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQG
N（配列番号　1077）

ウシＡＰＯＢＥＣ－３Ａ：
【数６２】

MDEYTFTENFNNQGWPSKTYLCYEMERLDGDATIPLDEYKGFVRNKGLDQPEKPCHAELYFLGKIHS
WNLDRNQHYRLTCFISWSPCYDCAQKLTTFLKENHHISLHILASRIYTHNRFGCHQSGLCELQAAGARI
TIMTFEDFKHCWETFVDHKGKPFQPWEGLNVKSQALCTELQAILKTQQN（配列番号　1078）

ヒトＡＰＯＢＥＣ－３Ｈ：
【数６３】

MALLTAETFRLQFNNKRRLRRPYYPRKALLCYQLTPQNGSTPTRGYFENKKKC*HAEICFINEIKSMGLD*
*ETQCYQVTCYLTWSPCSSC*AWELVDFIKAHDHLNLGIFASRLYYHWCKPQQKGLRLLCGSQVPVEVMG
FPKFADCWENFVDHEKPLSFNPYKMLEELDKNSRAIKRRLERIKIPGVRAQGRYMDILCDAEV（
配列番号284）（斜体：核酸編集ドメイン　）

アカゲザルＡＰＯＢＥＣ－３Ｈ：

【数６４】

MALLTAKTFSLQFNNKRRVNKPYYPRKALLCYQLTPQNGSTPTRGHLKNKKKDHAEIRFINKIKSMGL
DETQCYQVTCYLTWSPCPSCAGELVDFIKAHRHLNLRIFASRLYYHWRPNYQEGLLLLCGSQVPVEVM
GLPEFTDCWENFVDHKEPPSFNPSEKLEELDKNSQAIKRRLERIKSRSVDVLENGLRSLQLGPVTPSSSIR
NSR（配列番号　1079)

ヒトＡＰＯＢＥＣ－３Ｄ

【数６５】

MNPQIRNPMERMYRDTFYDNFENEPILYGRSYTWLCYEVKIKRGRSNLLWDTGVFRGPVLPKRQSNH
RQEVYFRFEN*HAEMCFLSWFCGNRLPANRRFQITWFVSWNPCLPC*VVKVTKFLAEHPNVTLTISAARLY
YYRDRDWRWVLLRLHKAGARVKIMDYEDFAYCWENFVCNEGQPFMPWYKFDDNYASLHRTLKEIL
RNPMEAMYPHIFYFHFKNLLKACGRNESWLCFTMEVTKHHSAVFRKRGVFRNQVDPETHC*HAERCFL*
*SWFCDDILSPNTNYEVTWYTSWSPCPEC*AGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLCYFWDTDYQEGLCSLSQEG
ASVKIMGYKDFVSCWKNFVYSDDEPFKPWKGLQTNFRLLKRRLREILQ（配列番号　285)（斜体：
核酸編集ドメイン　）

ヒトＡＰＯＢＥＣ－１

【数６６】

MTSEKGPSTGDPTLRRRIEPWEFDVFYDPRELRKEACLLYEIKWGMSRKIWRSSGKNTTNHVEVNFIKK
FTSERDFHPSMSCSITWFLSWSPCWECSQAIREFLSRHPGVTLVIYVARLFWHMDQQNRQGLRDLVNS
GVTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPPGDEAHWPQYPPLWMMLYALELHCIILSLPPCLKISRRWQNHLTF
FRLHLQNCHYQTIPPHILLATGLIHPSVAWR（配列番号　286)

マウスＡＰＯＢＥＣ－１

【数６７】

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRK*ETC*LLYEINWGGRHSVWRHTSQNTSNHVEVNFLEK
FTTERYFRPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRHPYVTLFIYIARLYHHTDQRNRQGLRDLISSGVTI
QIMTEQEYCYCWRNFVNYPPSNEAYWPRYPHLWVKLYVLELYCIILGLPPCLKILRRKQPQLTFFTITL
QTCHYQRIPPHLLWATGLK（配列番号　287)

ラットＡＰＯＢＥＣ－１

【数６８】

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRK*ETC*LLYEINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKF
TTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTI
QIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQ
SCHYQRLPPHILWATGLK（配列番号　288)

ヒトＡＰＯＢＥＣ－２：

【数６９】

MAQKEEAAVATEAASQNGEDLENLDDPEKLKELIELPPFEIVTGERLPANFFKFQFRNVEYSSGRNKTF
LCYVVEAQGKGGQVQASRGYLEDEHAAAHAEEAFFNTILPAFDPALRYNVTWYVSSSPCAACADRIIK
TLSKTKNLRLLILVGRLFMWEEPEIQAALKKLKEAGCKLRIMKPQDFEYVWQNFVEQEEGESKAFQPW
EDIQENFLYYEEKLADILK（配列番号 1080）

マウスＡＰＯＢＥＣ－２：

【数７０】

MAQKEEAAEAAAPASQNGDDLENLEDPEKLKELIDLPPFEIVTGVRLPVNFFKFQFRNVEYSSGRNKTF
LCYVVEVQSKGGQAQATQGYLEDEHAGAHAEEAFFNTILPAFDPALKYNVTWYVSSSPCAACADRIL
KTLSKTKNLRLLILVSRLFMWEEPEVQAALKKLKEAGCKLRIMKPQDFEYIWQNFVEQEEGESKAFEP
WEDIQENFLYYEEKLADILK（配列番号 1081）

ラットＡＰＯＢＥＣ－２：

【数７１】

MAQKEEAAEAAAPASQNGDDLENLEDPEKLKELIDLPPFEIVTGVRLPVNFFKFQFRNVEYSSGRNKTF
LCYVVEAQSKGGQVQATQGYLEDEHAGAHAEEAFFNTILPAFDPALKYNVTWYVSSSPCAACADRIL
KTLSKTKNLRLLILVSRLFMWEEPEVQAALKKLKEAGCKLRIMKPQDFEYLWQNFVEQEEGESKAFEP
WEDIQENFLYYEEKLADILK（配列番号 1082）

ウシＡＰＯＢＥＣ－２：

【数７２】

MAQKEEAAAAAEPASQNGEEVENLEDPEKLKELIELPPFEIVTGERLPAHYFKFQFRNVEYSSGRNKTF
LCYVVEAQSKGGQVQASRGYLEDEHATNHAEEAFFNSIMPTFDPALRYMVTWYVSSSPCAACADRIV
KTLNKTKNLRLLILVGRLFMWEEPEIQAALRKLKEAGCRLRIMKPQDFEYIWQNFVEQEEGESKAFEP
WEDIQENFLYYEEKLADILK（配列番号 1083）

ヤツメウナギＣＤＡ１（ｐｍＣＤＡ１）

【数７３】

MTDAEYVRIHEKLDIYTFKKQFFNNKKSVSHRCYVLFELKRRGERRACFWGYAVNKPQSGTERGIHAE
IFSIRKVEEYLRDNPGQFTINWYSSWSPCADCAEKILEWYNQELRGNGHTLKIWACKLYYEKNARNQI
GLWNLRDNGVGLNVMVSEHYQCCRKIFIQSSHNQLNENRWLEKTLKRAEKRRSELSIMIQVKILHTTK
SPAV（配列番号 289）

ヒトＡＰＯＢＥＣ３Ｇ　Ｄ３１６Ｒ＿Ｄ３１７Ｒ

【数７４】

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPPLDAKIFRGQVYSELKYHPEM
RFFHWFSKWRKLHRDQEYEVTWYISWSPCTKCTRDMATFLAEDPKVTLTIFVARLYYFWDPDYQEAL
RSLCQKRDGPRATMKIMNYDEFQHCWSKFVYSQRELFEPWNNLPKYYILLHIMLGEILRHSMDPPTFTF
NFNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGRHAELCFLDVIPFWK
LDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCIFTARIYRRQGRCQEGLRTLAEAGAKISIMT
YSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQDLSGRLRAILQNQEN (配列番号 290)

ヒトＡＰＯＢＥＣ３Ｇ Ａ鎖

【数７５】

MDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGRHAELCFL
DVIPFWKLDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCIFTARIYDDQGRCQEGLRTLAEAG
AKISIMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQDLSGRLRAILQ (配列番号 291)

ヒトＡＰＯＢＥＣ３Ｇ Ａ鎖 Ｄ１２０Ｒ＿Ｄ１２１Ｒ

【数７６】

MDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGRHAELCFL
DVIPFWKLDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCIFTARIYRRQGRCQEGLRTLAEAG
AKISIMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQDLSGRLRAILQ (配列番号 292)

【０３１３】

融合タンパク質／核酸塩基エディターの非限定的な例を提供する。Escherichia coli発現のためのＨｉｓ$_6$－ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９（配列番号２９３）

【数７７】

MGSSHHHHHHMSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNTN
KHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQG
LRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQ
PQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYK
VPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDD
SFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFR
GHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKN
GLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSD
ILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY
KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSL
LYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEIS
GVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQ
LKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDS
LHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGI
KELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKV
LTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVE
TRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKR
PLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK
KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLP
KYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYL
DEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYT
STKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKKKRKV

【０３１４】
哺乳動物発現のためのｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９－ＮＬＳ（配列番号２９４）
【数７８】

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKF
TTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTI
QIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQ
SCHYQRLPPHILWATGLKSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLN
PDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITK
APLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYN
ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASL
GTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGS
PAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEH
PVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS
DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQIL
DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK
LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
WDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA
YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR
KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKR
VILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIH
QSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKKKRKV

【０３１５】
哺乳動物発現のためのｈＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９－ＮＬＳ（配列番号２９５）

【数７９】

MTSEKGPSTGDPTLRRRIEPWEFDVFYDPRELRKEACLLYEIKWGMSRKIWRSSGKNTTNHVEVNFIKKF
TSERDFHPSMSCSITWFLSWSPCWECSQAIREFLSRHPGVTLVIYVARLFWHMDQQNRQGLRDLVNSG
VTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPPGDEAHWPQYPPLWMMLYALELHCIILSLPPCLKISRRWQNHLTFFR
LHLQNCHYQTIPPHILLATGLIHPSVAWRSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP
SKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHR
LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL
NPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSL
GLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS
ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL
VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFA
WMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG
MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF
LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGK
TILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN
GRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQL
LNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITL
KSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEI
GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV
QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS
SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKL
KGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNL
GAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSPKKKRKV

【０３１６】

ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９－ＵＧＩ－ＮＬＳ（配列番号２９６）

【数８０】

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKF
TTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTI
QIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQ
SCHYQRLPPHILWATGLKSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLN
PDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITK
APLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYN
ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASL
GTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGS
PAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEH
PVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS
DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQIL
DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK
LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
WDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA
YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR
KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKR
VILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIH
QSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDES
TDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV

【０３１７】
ｒＡＰＯＢＥＣ１－ＸＴＥＮ－Ｃａｓ９ニッカーゼ－ＵＧＩ－ＮＬＳ（ＢＥ３、配列番号２９７）
【数８１】

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKF
TTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTI
QIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQ
SCHYQRLPPHILWATGLKSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL
VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLN
PDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITK
APLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKM
DGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYN
ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASL
GTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTITLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGS
PAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEH
PVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS
DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQIL
DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK
LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
WDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA
YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR
KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKR
VILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIH
QSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDES
TDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV

【０３１８】
ｐｍＣＤＡ１－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９－ＵＧＩ（細菌）（配列番号２９８）

【数８２】

MTDAEYVRIHEKLDIYTFKKQFFNNKKSVSHRCYVLFELKRRGERRACFWGYAVNK
PQSGTERGIHAEIFSIRKVEEYLRDNPGQFTINWYSSWSPCADCAEKILEWYNQELRG
NGHTLKIWACKLYYEKNARNQIGLWNLRDNGVGLNVMVSEHYQCCRKIFIQSSHNQ
LNENRWLEKTLKRAEKRRSELSIMIQVKILHTTKSPAVSGSETPGTSESATPESDKKYS
IGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRL
KRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNI
VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGL
FGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK
NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFD
QSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP
HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS
EETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK
VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV
EDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHL
FDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIH
DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYL
YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN
VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR
QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYH
HAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFF
YSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVK
KTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKG
KSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRK
RMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLD
EIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYF
DTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSMTNLSDIIEKETGK
QLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVI
QDSNGENKIKML

【０３１９】

ｐｍＣＤＡ１－ＸＴＥＮ－ｎＣａｓ９－ＵＧＩ－ＮＬＳ（哺乳動物コンストラクト）（配列番号２９９）：

【数８３】

MTDAEYVRIHEKLDIYTFKKQFFNNKKSVSHRCYVLFELKRRGERRACFWGYAVNK
PQSGTERGIHAEIFSIRKVEEYLRDNPGQFTINWYSSWSPCADCAEKILEWYNQELRG
NGHTLKIWACKLYYEKNARNQIGLWNLRDNGVGLNVMVSEHYQCCRKIFIQSSHNQ
LNENRWLEKTLKRAEKRRSELSIMIQVKILHTTKSPAVSGSETPGTSESATPESDKKYS
IGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRL
KRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNI
VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGL
FGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK
NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFD
QSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP
HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS
EETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK
VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV
EDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHL
FDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIH
DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK

PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYL
YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN
VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR
QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYH
HAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFF
YSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVK
KTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKG
KSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRK
RMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLD
EIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYF
DTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQL
VIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQD
SNGENKIKMLSGGSPKKKRKV

【０３２０】

ｈｕＡＰＯＢＥＣ３Ｇ－ＸＴＥＮ－ｄＣａｓ９－ＵＧＩ（細菌）（配列番号３００）

【数８４】

MDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHG
FLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCI
FTARIYDDQGRCQEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLD
EHSQDLSGRLRAILQSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPS
KKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS
NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVD
STDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPIN
ASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE
DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS
ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLK
DNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAI
VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF
LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS
RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLH
EHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR
ERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD
YDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAK
LITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND
KLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKL
ESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPL
IETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI
ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEK
NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV
NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL
SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSGGSMTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPE
SDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKML

【０３２１】

ｈｕＡＰＯＢＥＣ３Ｇ－ＸＴＥＮ－ｎＣａｓ９－ＵＧＩ－ＮＬＳ（哺乳動物コンストラクト）（配列番号３０１）

【数８５】

MDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHG
FLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCI
FTARIYDDQGRCQEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLD
EHSQDLSGRLRAILQSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPS
KKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS
NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVD
STDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPIN
ASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE
DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS
ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLK
DNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAI
VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF
LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS
RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLH
EHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR
ERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD
YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAK
LITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND
KLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKL
ESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPL
IETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI
ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEK
NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV
NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL
SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPES
DILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV

【０３２２】

ｈｕＡＰＯＢＥＣ３Ｇ（Ｄ３１６Ｒ＿Ｄ３１７Ｒ）－ＸＴＥＮ－ｎＣａｓ９－ＵＧＩ－ＮＬＳ（哺乳動物コンストラクト）（配列番号３０２）

【数８６】

MDPPTFTFNFNNEPWVRGRHETYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHG
FLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCI
FTARIYRRQGRCQEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLDE
HSQDLSGRLRAILQSGSETPGTSESATPESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSK
KFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSN
EMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDS
TDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINA
SGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED
AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSA
SMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFI
KPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLK
DNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAI
VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDF
LDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS
RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLH
EHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSR
ERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD

YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAK
LITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND
KLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKL
ESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPL
IETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI
ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEK
NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV
NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL
SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPES
DILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV

塩基エディター４（ＢＥ４；ＡＰＯＢＥＣ１－リンカー（３２　ａａ）－Ｃａｓ９ｎ（Ｄ１０Ａ）－リンカー（９　ａａ）－ＵＧＩ－リンカー（９　ａａ）－ＵＧＩ）

【数８７】

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKF
TTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTI
QIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQ
SCHYQRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVI
TDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEM
AKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALA
HMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQL
PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS
DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGA
SQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNR
EKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEK
VLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIEC
FDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDD
KVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV
SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERM
KRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDD
SIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFI
KRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAH
DAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLA
NGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARK
KDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVK
KDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVE
QHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTI
DRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILML
PEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGS
TNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVI
QDSNGENKIKMLSGGSPKKKRK (配列番号 1084)

【０３２３】

例２：ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ゲノム／塩基編集技術を使用した抗がんワクチン接種

本明細書に記載されるのは、免疫系を刺激して腫瘍を処置し、転移性病変を予防する新しい方法である。これは、悪性細胞のゲノムとプロテオームを個人化された内在性抗がんワクチンにin vivoで変えることによる。

【０３２４】

本明細書に提供されるのは、がん患者の免疫系によってそうでなければ「自己」として寛容される腫瘍特異的タンパク質に対する、頑健なＴ細胞およびＢ細胞媒介免疫応答を高めるための、新しい免疫腫瘍学的方法論である[1－3]（図１、表１～３）。この方法論は、プログラミング可能なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９のゲノム編集および塩基編集ツールに固有に適しており[4－10]、腫瘍特異的遺伝子[11]の翻訳配列を変更して、高度に免疫原性のヘテロクリティックおよびクリプティックペプチドエピトープをin situで生産するために利用される（表５および７、図１）。ヘテロクリティックエピトープは、ＭＨＣ－ＩおよびＭＨＣ－ＩＩ抗原提示経路を介して強力な免疫反応を誘導するように操作された内在性ペプチド配列の変更バージョンであり[12]、これはまた、親の野生型ペプチド配列に対する交差反応応答を生成する（図２Ａ）[2，13，14]。例えば、メラニン細胞分化および黒色腫マーカーＭＡＲＴ－１[26－36]のペプチドエピトープＥＡＡＧＩＧＩＬＴＶは、免疫原性が弱いのに対し、ＭＨＣアンカー位置のＭＡＲＴ－１（２７Ｌ）ＥＬＡＧＩＧＩＬＴＶの疎水性残基[15，16]で操作された同様のペプチドのワクチン接種は、黒色腫に対する堅牢なＴ細胞免疫応答を促進する（表５）[17，18]。クリプティックエピトープは、異常なｍＲＮＡスプライシング、代替オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）、およびタンパク質の脱グリコシド化[19]などのがん細胞で高められるプロセスを介して、非翻訳ゲノム配列から発生する。例えば、ＬＡＧＥ－１免疫原性抗原は、遺伝子ＮＹ－ＥＳＯ－１[22－24]のＯＲＦ－２[20，21]から発現する（表７）。ゲノム／塩基編集を使用したこれらの免疫原性タンパク質配列の導入は、がん特異的抗原に対する「自己」寛容を破るように設計されており[1－3]、これは、免疫細胞の腫瘍への浸潤を駆動し、悪性細胞の異物としての認識を複数のメカニズムを通して促進することが知られている（図

３）[25,26]。ゲノム／塩基編集を使用した抗がんワクチン接種は、自己免疫の副作用を防ぐために腫瘍細胞によって優先的または排他的に発現される遺伝子を標的とすることにより、がん特異的となる[2,27]。抗がんワクチン接種戦略は、黒色腫（表１）[28-30]および結腸直腸腫瘍、胃がん、および高頻度で非同義ヒッチハイカー変異を蓄積するその他の高度に変異誘発されたがんの処置に、特に有用である（図４）[31]。このような場合、細胞系統に固有の翻訳された「ネオエピトープ」[32,33]への適応免疫応答の広がりは、寛解を促進し[34]、転移病変を防ぐ[35-39]（アブスコパル（abscopal）効果）（図３）。重要なことには、最近ＦＤＡが承認した、Ｔ細胞刺激の閾値を下げるチェックポイント阻害剤（抗ＰＤ１および抗ＣＴＬＡ４抗体）[27,40]が、抗がんワクチンとの併用の可能性を示しており[41-46]、より広範ながんの種類に対する予防接種の臨床的有効性を高める得ることである[47,48]。

【０３２５】

ゲノム／塩基編集によりプログラミングされるヘテロクリティックおよびクリプティックエピトープは、各患者の悪性腫瘍および免疫系に適合するように個人化され得るか、あるいはガイドＲＮＡカクテルが開発されてヒトの集団を広くカバーする最も頻繁なＨＬＡアレルスーパータイプに関与し得る（図２Ｂ）。ゲノム編集ツールの送達に関する最近の進歩により、抗がんワクチン接種が可能になっている。これらの方法には、エレクトロポレーションを使用した細胞内送達[49,50]、ウイルスベクター[51,52]、細胞透過性ペプチド[53,54]、リポソーム[55,56]、ポリマー[57]、膜変形[58]、およびナノ粒子[59]が含まれる；カーゴ（cargo）の種類としては、ＲＮＡ転写物、ＤＮＡ発現ベクター、または精製されたＣａｓ９タンパク質－ガイドＲＮＡ複合体が含まれ[60]、またはカチオン性脂質小胞内である[61,62]。したがって、ワクチン接種の処置は、腫瘍細胞[63]、腫瘍を起源とする組織[64]に対して直接in vivoで、あるいは照射された全細胞ワクチンの再注入のためにex vivoで[65-67]実行され得る。

【０３２６】

本明細書でさらに提供されるのは、文献または前臨床例がある既知のエピトープを複製または厳密に模倣するための、腫瘍関連遺伝子におけるゲノム標的部位の多くの具体例（表１～３）、およびこれらの翻訳された配列の変更をプログラムするように設計されたガイドＲＮＡ（表５および７）である。ゲノム編集反応が、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ツールの１つのために設計された：（ｉ）核酸塩基上の化学反応を触媒する「塩基エディター」（例：シチジンデアミナーゼ－Ｃａｓ９融合物[4]）；または（ｉｉ）ＤＮＡ切断活性を備えた操作されたヌクレアーゼ（例：ＷＴ Ｃａｓ９[5-7]、Ｃａｓ９ニッカーゼ[8]またはＦｏｋ１－ヌクレアーゼ－ｄＣａｓ９融合物[9,10]）。がん特異的遺伝子を変更してヘテロクリティック／クリプティックエピトープを生産する、他の潜在的に有用なゲノム編集反応の例を、表５および７に示す。拡張により、Ｃａｓ９ツールおよびホモロジー指向修復（ＨＤＲ）経路も活用し、ヘテロクリティックエピトープをＤＮＡ鋳型を介して、いくつかの技術を用いてインデルの割合を低下することにより、導入し得る[68-70]。最後に、偏りのないハイスループットな様式でヘテロクリティックおよびクリプティックエピトープのレパートリーを拡大するために、前述のツールを使用して、目的の腫瘍関連遺伝子にわたるすべてのＰＡＭ部位を標的化するガイドＲＮＡのライブラリーをスクリーニングすることができ、これは、表５および７に示すゲノム／塩基編集反応を使用して複製可能である[71,72]。

参考文献

【表１２－１】

REFERENCES

1. Melero, I. *et al.* Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nature reviews. Clinical oncology* **11**, 509-524, (2014).
2. Pardoll, D. M. Inducing autoimmune disease to treat cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 5340-5342, (1999).
3. Buonaguro, L., Petrizzo, A., Tornesello, M. L. & Buonaguro, F. M. Translating

【表１２－２】

tumor antigens into cancer vaccines. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **18**, 23-34, (2011).

4. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **advance online publication**, (2016).
5. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819-823, (2013).
6. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821, (2012).
7. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823-826, (2013).
8. Ran, F. A. *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**, 1380-1389, (2013).
9. Guilinger, J. P., Thompson, D. B. & Liu, D. R. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature biotechnology* **32**, 577-582, (2014).
10. Tsai, S. Q. *et al.* Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature biotechnology* **32**, 569-576, (2014).
11. Vigneron, N., Stroobant, V., Van den Eynde, B. J. & van der Bruggen, P. Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer immunity* **13**, 15, (2013).
12. Borbulevych, O. Y., Baxter, T. K., Yu, Z., Restifo, N. P. & Baker, B. M. Increased immunogenicity of an anchor-modified tumor-associated antigen is due to the enhanced stability of the peptide/MHC complex: implications for vaccine design. *J Immunol* **174**, 4812-4820, (2005).
13. Bakker, A. B. *et al.* Analogues of CTL epitopes with improved MHC class-I binding capacity elicit anti-melanoma CTL recognizing the wild-type epitope. *International journal of cancer* **70**, 302-309, (1997).
14. Purcell, A. W., McCluskey, J. & Rossjohn, J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 404-414, (2007).
15. Chowell, D. *et al.* TCR contact residue hydrophobicity is a hallmark of immunogenic CD8+ T cell epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E1754-1762, (2015).

【表１２－３】

16. Ruppert, J. *et al.* Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* **74**, 929-937, (1993).

17. Madura, F. *et al.* Structural basis for ineffective T-cell responses to MHC anchor residue-improved "heteroclitic" peptides. *European journal of immunology* **45**, 584-591, (2015).

18. Rivoltini, L. *et al.* A superagonist variant of peptide MART1/Melan A27-35 elicits anti-melanoma CD8+ T cells with enhanced functional characteristics: implication for more effective immunotherapy. *Cancer research* **59**, 301-306, (1999).

19. Andersen, R. S. *et al.* High frequency of T cells specific for cryptic epitopes in melanoma patients. *Oncoimmunology* **2**, e25374, (2013).

20. Rimoldi, D. *et al.* Efficient simultaneous presentation of NY-ESO-1/LAGE-1 primary and nonprimary open reading frame-derived CTL epitopes in melanoma. *J Immunol* **165**, 7253-7261, (2000).

21. Mandic, M. *et al.* The alternative open reading frame of LAGE-1 gives rise to multiple promiscuous HLA-DR-restricted epitopes recognized by T-helper 1-type tumor-reactive CD4+ T cells. *Cancer research* **63**, 6506-6515, (2003).

22. Campos-Perez, J. *et al.* DNA fusion vaccine designs to induce tumor-lytic CD8+ T-cell attack via the immunodominant cysteine-containing epitope of NY-ESO 1. *International journal of cancer* **133**, 1400-1407, (2013).

23. Webb, A. I. *et al.* Functional and structural characteristics of NY-ESO-1-related HLA A2-restricted epitopes and the design of a novel immunogenic analogue. *The Journal of biological chemistry* **279**, 23438-23446, (2004).

24. Chen, J. L. *et al.* Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL. *J Immunol* **165**, 948-955, (2000).

25. Lally, K. M. *et al.* Unmasking cryptic epitopes after loss of immunodominant tumor antigen expression through epitope spreading. *International journal of cancer* **93**, 841-847, (2001).

26. Fridman, W. H. *et al.* The ultimate goal of curative anti-cancer therapies: inducing an adaptive anti-tumor immune response. *Frontiers in immunology* **2**, 66, (2011).

27. Attia, P. *et al.* Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 6043-6053, (2005).

【表１２－４】

28. Rosenberg, S. A. *et al.* Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature medicine* **4**, 321-327, (1998).

29. Slingluff, C. L., Jr. *et al.* Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **21**, 4016-4026, (2003).

30. Slingluff, C. L., Jr. *et al.* Immunologic and clinical outcomes of vaccination with a multiepitope melanoma peptide vaccine plus low-dose interleukin-2 administered either concurrently or on a delayed schedule. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**, 4474-4485, (2004).

31. Lawrence, M. S. *et al.* Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* **499**, 214-218, (2013).

32. Duan, F. *et al.* Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *J Exp Med* **211**, 2231-2248, (2014).

33. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**, 69-74, (2015).

34. Gubin, M. M. *et al.* Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* **515**, 577-581, (2014).

35. Kreiter, S. *et al.* Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* **520**, 692-696, (2015).

36. Chandra, R. A. *et al.* A systematic evaluation of abscopal responses following radiotherapy in patients with metastatic melanoma treated with ipilimumab. *Oncoimmunology* **4**, e1046028, (2015).

37. Ma, Y. *et al.* Chemotherapy and radiotherapy: cryptic anticancer vaccines. *Seminars in immunology* **22**, 113-124, (2010).

38. Karbach, J. *et al.* Long-term complete remission following radiosurgery and immunotherapy in a melanoma patient with brain metastasis: immunologic correlates. *Cancer immunology research* **2**, 404-409, (2014).

39. Demaria, S. *et al.* Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *International journal of radiation oncology, biology,*

【表１２－５】

physics **58**, 862-870, (2004).

40. Wong, R. M. *et al.* Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *International immunology* **19**, 1223-1234, (2007).
41. Fu, J. *et al.* Preclinical evidence that PD1 blockade cooperates with cancer vaccine TEGVAX to elicit regression of established tumors. *Cancer research* **74**, 4042-4052, (2014).
42. Gibney, G. T. *et al.* Safety, correlative markers, and clinical results of adjuvant nivolumab in combination with vaccine in resected high-risk metastatic melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **21**, 712-720, (2015).
43. Soares, K. C. *et al.* PD-1/PD-L1 blockade together with vaccine therapy facilitates effector T-cell infiltration into pancreatic tumors. *J Immunother* **38**, 1-11, (2015).
44. Le, D. T. *et al.* Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. *J Immunother* **36**, 382-389, (2013).
45. Sierro, S. R. *et al.* Combination of lentivector immunization and low-dose chemotherapy or PD-1/PD-L1 blocking primes self-reactive T cells and induces anti-tumor immunity. *European journal of immunology* **41**, 2217-2228, (2011).
46. Hodi, F. S. *et al.* Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4712-4717, (2003).
47. Morse, M. A. & Lyerly, H. K. Checkpoint blockade in combination with cancer vaccines. *Vaccine* **33**, 7377-7385, (2015).
48. Vanneman, M. & Dranoff, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature reviews. Cancer* **12**, 237-251, (2012).
49. Bakondi, B. *et al.* In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **24**, 556-563, (2016).
50. Chen, S., Lee, B., Lee, A. Y., Modzelewski, A. J. & He, L. Highly Efficient Mouse Genome Editing by CRISPR Ribonucleoprotein Electroporation of Zygotes. *The*

【表１２－６】

Journal of biological chemistry, (2016).

51. Maggio, I. *et al.* Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cel *Scientific reports* **4**, 5105, (2014).
52. Wang, W. *et al.* CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *PloS one* **9**, e11598 (2014).
53. Ramakrishna, S. *et al.* Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome research* **24**, 1020-1027, (2014).
54. Liu, J., Gaj, T., Patterson, J. T., Sirk, S. J. & Barbas, C. F., 3rd. Cell-penetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering. *PloS one* **9**, e85755, (2014).
55. Ye, L. *et al.* Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Delta32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 9591-9596, (2014).
56. Allen, T. M. & Cullis, P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews* **65**, 36-48, (2013).
57. *Efficient Delivery of Sigma CRISPRs via a Non-Liposomal Polymeric Transfection Reagent, TransIT®-CRISPR*, <www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/transit-crispr- transfection-reagent.html> (2016).
58. Han, X. *et al.* CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation. *Science advances* **1**, e1500454, (2015).
59. Cox, D. B., Platt, R. J. & Zhang, F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine* **21**, 121-131, (2015).
60. Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J. & Kim, J. S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome research* **24**, 1012-1019, (2014).
61. Zuris, J. A. *et al.* Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nature biotechnology* **33**, 73-80, (2015).

【表１２－７】

62. Wang, M. *et al.* Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (2016).

63. Villarreal, D. O. *et al.* Alarmin IL-33 acts as an immunoadjuvant to enhance antigen-specific tumor immunity. *Cancer research* **74**, 1789-1800, (2014).

64. Ginsberg, B. A. *et al.* Immunologic response to xenogeneic gp100 DNA in melanoma patients: comparison of particle-mediated epidermal delivery with intramuscular injection. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 4057-4065, (2010).

65. Geary, S. M., Lemke, C. D., Lubaroff, D. M. & Salem, A. K. Proposed mechanisms of action for prostate cancer vaccines. *Nature reviews. Urology* **10**, 149-160, (2013).

66. Dranoff, G. *et al.* Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 3539-3543, (1993).

67. Chiang, C. L., Benencia, F. & Coukos, G. Whole tumor antigen vaccines. *Seminars in immunology* **22**, 132-143, (2010).

68. Chu, V. T. *et al.* Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature biotechnology* **33**, 543-548, (2015).

69. Yu, C. *et al.* Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell stem cell* **16**, 142-147, (2015).

70. Paquet, D. *et al.* Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* **533**, 125-129, (2016).

71. Chen, S. *et al.* Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell* **160**, 1246-1260, (2015).

72. Shalem, O., Sanjana, N. E. & Zhang, F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature reviews. Genetics* **16**, 299-311, (2015).

73. Overwijk, W. W. & Restifo, N. P. B16 as a mouse model for human melanoma. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* **Chapter 20**, Unit 20 21, (2001).

74. Saenger, Y. M. *et al.* Improved tumor immunity using anti-tyrosinase related

【表１２－８】

protein-1 monoclonal antibody combined with DNA vaccines in murine melanoma. *Cancer research* **68**, 9884-9891, (2008).

75. Yu, Z. *et al.* Poor immunogenicity of a self/tumor antigen derives from peptide-MHC-I instability and is independent of tolerance. *The Journal of clinical investigation* **114**, 551-559, (2004).

76. Robbins, P. F. *et al.* The intronic region of an incompletely spliced gp100 gene transcript encodes an epitope recognized by melanoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* **159**, 303-308, (1997).

77. Pinilla, C. *et al.* Combinatorial peptide libraries as an alternative approach to the identification of ligands for tumor-reactive cytolytic T lymphocytes. *Cancer research* **61**, 5153-5160, (2001).

78. Wang, R. F., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Robbins, P. F. & Rosenberg, S. A Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J Exp Med* **183**, 1131-1140, (1996).

79. Lupetti, R. *et al.* Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP) 2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage. *J Exp Med* **188**, 1005-1016, (1998).

80. Visseren, M. J. *et al.* Affinity, specificity and T-cell-receptor diversity of melanoma-specific CTL generated in vitro against a single tyrosinase epitope. *International journal of cancer* **72**, 1122-1128, (1997).

81. Valmori, D. *et al.* Analysis of the cytolytic T lymphocyte response of melanoma patients to the naturally HLA-A*0201-associated tyrosinase peptide 368-376. *Cancer research* **59**, 4050-4055, (1999).

82. Rubio-Godoy, V. *et al.* Toward synthetic combinatorial peptide libraries in positional scanning format (PS-SCL)-based identification of CD8+ Tumor-reactive T-Cell Ligands: a comparative analysis of PS-SCL recognition by a single tumor-reactive CD8+ cytolytic T-lymphocyte clone. *Cancer research* **62**, 2058-2063, (2002).

83. Skipper, J. C. *et al.* An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* **183**, 527-534, (1996).

84. Bernatchez, C. *et al.* Altered decamer and nonamer from an HLA-A0201-

【表１２－９】

restricted epitope of Survivin differentially stimulate T-cell responses in different individuals. *Vaccine* **29**, 3021-3030, (2011).

85. Hirohashi, Y. *et al.* An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**, 1731-1739, (2002).

86. Gross, D. A. *et al.* High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *The Journal of clinical investigation* **113**, 425-433, (2004).

87. Scardino, A. *et al.* HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol* **168**, 5900-5906, (2002).

88. Aurisicchio, L. *et al.* A novel minigene scaffold for therapeutic cancer vaccines. *Oncoimmunology* **3**, e27529, (2014).

89. Bae, J., Martinson, J. A. & Klingemann, H. G. Identification of novel CD33 antigen-specific peptides for the generation of cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia. *Cellular immunology* **227**, 38-50, (2004).

90. Bae, J., Martinson, J. A. & Klingemann, H. G. Heteroclitic CD33 peptide with enhanced anti-acute myeloid leukemic immunogenicity. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 7043-7052, (2004).

91. Smith, H. A., Rekoske, B. T. & McNeel, D. G. DNA vaccines encoding altered peptide ligands for SSX2 enhance epitope-specific CD8+ T-cell immune responses. *Vaccine* **32**, 1707-1715, (2014).

92. Oka, Y., Tsuboi, A., Oji, Y., Kawase, I. & Sugiyama, H. WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. *Current opinion in immunology* **20**, 211-220, (2008).

93. Pinilla-Ibarz, J. *et al.* Improved human T-cell responses against synthetic HLA-0201 analog peptides derived from the WT1 oncoprotein. *Leukemia* **20**, 2025-2033, (2006).

94. Di Stasi, A., Jimenez, A. M., Minagawa, K., Al-Obaidi, M. & Rezvani, K. Review of the Results of WT1 Peptide Vaccination Strategies for Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia from Nine Different Studies. *Frontiers in immunology* **6**, 36, (2015).

95. Tsuboi, A. *et al.* Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A*2402-binding residues. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **51**, 614-620, (2002).

【表１２－１０】

96. Trojan, A. *et al.* Generation of cytotoxic T lymphocytes against native and altered peptides of human leukocyte antigen-A*0201 restricted epitopes from the human epithelial cell adhesion molecule. *Cancer research* **61**, 4761-4765, (2001).

97. Volpe, G. *et al.* Alternative BCR/ABL splice variants in Philadelphia chromosome-positive leukemias result in novel tumor-specific fusion proteins that may represent potential targets for immunotherapy approaches. *Cancer research* **67**, 5300-5307, (2007).

98. Casnici, C. et al. Out of frame peptides from BCR/ABL alternative splicing are immunogenic in HLA A2.1 transgenic mice. Cancer letters 276, 61-67, (2009).

99. Casnici, C. *et al.* Immunologic evaluation of peptides derived from BCR/ABL-out-of-frame fusion protein in HLA A2.1 transgenic mice. *J Immunother* **35**, 321-328, (2012).

100. Tangri, S. *et al.* Structural features of peptide analogs of human histocompatibility leukocyte antigen class I epitopes that are more potent and immunogenic than wild-type peptide. *J Exp Med* **194**, 833-846, (2001).

101. Barve, M. *et al.* Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T-lymphocyte vaccine, in metastatic non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 4418-4425, (2008).

102. Graff-Dubois, S. *et al.* Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol* **169**, 575-580, (2002).

103. Tourdot, S. *et al.* A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2. 1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. *European journal of immunology* **30**, 3411-3421, (2000).

104. Tsang, K. Y., Palena, C., Gulley, J., Arlen, P. & Schlom, J. A human cytotoxic T-lymphocyte epitope and its agonist epitope from the nonvariable number of tandem repeat sequence of MUC-1. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 2139-2149, (2004).

105. Geynisman, D. M. *et al.* A randomized pilot phase I study of modified carcinoembryonic antigen (CEA) peptide (CAP1-6D)/montanide/GM-CSF- vaccine in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Journal for immunotherapy of cancer*

【表１２－１１】

1, 8, (2013).

106. Kleinstiver, B. P. *et al.* Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* **523**, 481-485, (2015).

107. Guevara-Patino, J. A. *et al.* Optimization of a self antigen for presentation of multiple epitopes in cancer immunity. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1382-1390, (2006).

108. Duan, F. *et al.* Immune rejection of mouse tumors expressing mutated self. *Cancer research* **69**, 3545-3553, (2009).

109. Myers, C. E. *et al.* Variation in cytotoxic T-lymphocyte responses to peptides derived from tyrosinase-related protein-2. *Human immunology* **69**, 24-31, (2008).

110. Castle, J. C. *et al.* Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer research* **72**, 1081-1091, (2012).

111. Cho, H. I. & Celis, E. Optimized peptide vaccines eliciting extensive CD8 T-cell responses with therapeutic antitumor effects. *Cancer research* **69**, 9012-9019, (2009).

【０３２７】

均等物および範囲

請求項において、「a」、「an」、および「the」などの冠詞は、そうでないと示されていない限り、または文脈から明らかでない限り、１以上を意味し得る。グループの１以上のメンバーの間の「or」を含む請求項または説明は、そうでないと示されていない限り、または文脈から明らかでない限り、１以上の、またはすべてのグループメンバーが所与の製品またはプロセスに存在し、用いられ、またはそうでなければ関連がある場合に、満足すると考えられる。本開示は、そのグループの正確に１のメンバーが所与の製品またはプロセスに存在し、用いられ、またはそうでなければ関連がある態様を含む。本開示は、１より多くの、またはすべてのグループメンバーが、所与の製品またはプロセスに存在し、用いられ、またはそうでなければ関連する態様も含む。

【０３２８】

さらに本開示は、列記された請求項の１つ以上からの１つ以上の限定要因、要素、節、および説明的用語が、別の請求項に導入されるところの、全てのバリエーション、組み合わせ、および順列を包含する。例えば、別の請求項に従属する任意の請求項は、同じ基礎請求項に従属する任意の他の請求項において見出される１つ以上の限定要因を含むように、改変することができる。要素がリストとして、例えばマーカッシュ群形式において提示される場合、要素の各下位群もまた開示され、任意の要素を群から除外することができる。一般的に、本開示または本開示の側面が、特定の要素および／または特徴を含むものとして言及される場合、本開示または本開示の側面のある態様は、かかる要素および／または特徴からなるか、またはこれらから本質的になることが、理解されるべきである。単純化を目的として、これらの態様は、本明細書において、特に文言としては（haec verba）記載されていない。

【０３２９】

また、用語「含むこと（comprising）」および「含有すること（containing）」は、オープンであることを意図され、さらなる要素またはステップの包含を許容することに留意する。範囲が示される場合、エンドポイントが含まれる。さらに、別段に示されるかまたは文脈および当業者の理解から別が明らかでない限り、範囲として表される値は、本開示

の異なる態様において記述される範囲内の任意の特定の値または部分範囲を、文脈が明らかに別を示さない限り、当該範囲の下限の単位の１０分の１まで想定し得る。

【０３３０】

本願は、多様な発行された特許、公開された特許出願、学術文献、および他の刊行物を参照し、これらの全ては、本明細書において参考として援用される。援用される参考文献のうちのいずれかと本明細書との間に矛盾が存在する場合、本明細書が支配すべきである。加えて、先行技術の範囲内に該当する本開示の任意の特定の態様は、請求項のうちの任意の１つ以上から明示的に除外することができる。かかる態様は、当業者に公知であるとみなされるので、除外が本明細書において明示的に記載されない場合であっても、それらを除外することができる。本開示の任意の特定の態様は、任意の理由のために、先行技術の存在に関連するか否かにかかわらず、任意の請求項から除外することができる。

【０３３１】

当業者は、本明細書において記載される特定の態様に対する多くの均等物を認識するか、または慣用的な実験のみを用いてこれらを確認することができるであろう。本明細書において記載される態様の範囲は、上の説明に限定されることを意図せず、むしろ、添付の請求の範囲において記載される通りである。当業者は、以下の請求の範囲において定義されるとおりの、本開示の精神または範囲から逸脱することなく、この説明に対する多様な変更および改変を行い得ることを理解するであろう。

【図１】

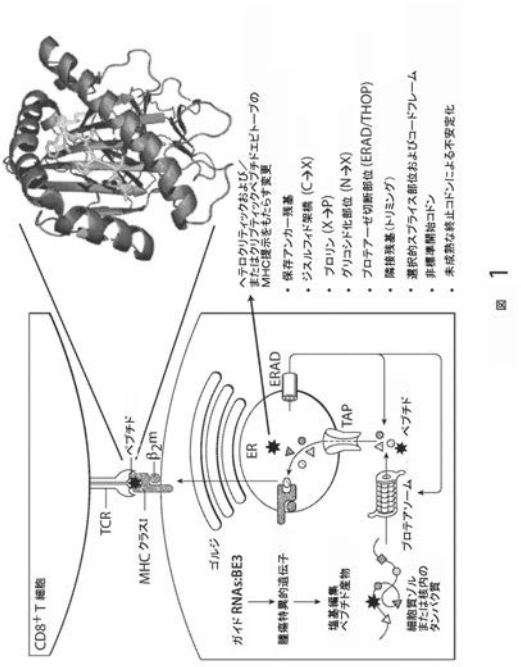


図 1

【図２Ａ】

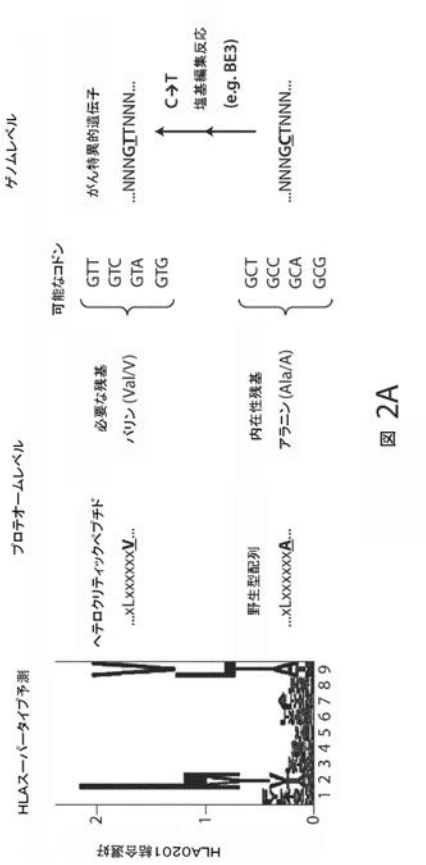


図 2A

【図２Ｂ】

HLA	スーパータイプのメンバーである共通アレル	ペプチド結合特異性	集団での適用範囲
A1	A*010102, A*2501, A*2601, A*2602, A*2604, A*3201, A*3601, A*4301, A*8001	XTXXXXXX. Y I W F	14.7–47.1%
A2	A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A*0205, A*0206, A*0207, A*6802, A*6901	XLXXXXXX. L I V M A T	39.0–45.9%
A3	A*0301, A*01101, A*3101, A*3303, A*6801	XAXXXXXX. F L I M V Y W	37.5–52.7%
A24	A*2402-04, A*3001-03	XFXXXXXX. F Y I	23.9–58.6%
B7	B*0702-05, B*1508, B*3501-03, B*51, B*5301, B*5401, B*5501-02, B*5601-02, B*6701, B*7801	XPXXXXXX. A L I V M Y F W	43.0–57.1%
B27	B*1401-02, B*1503, B*1509, B*1510, B*1518, B*3801-02, B*3901-04, B*4801-02, B*7301, B*2701-08	XRXXXXXX. F H L K Y	13.3–35.3%
B44	B*3701, B*4402-05, B*4001, B*4006	XEXXXXXX. Y F W	21.2–43.0%
B58	B*1516-17, B*5701-02, B*58	XAXXXXXX. F S W T Y	1.6–25.1%
B62	B*1501-02, B*1513	XQXXXXXX. F L W Y	4.8–36.5%

図 2B

【図３】

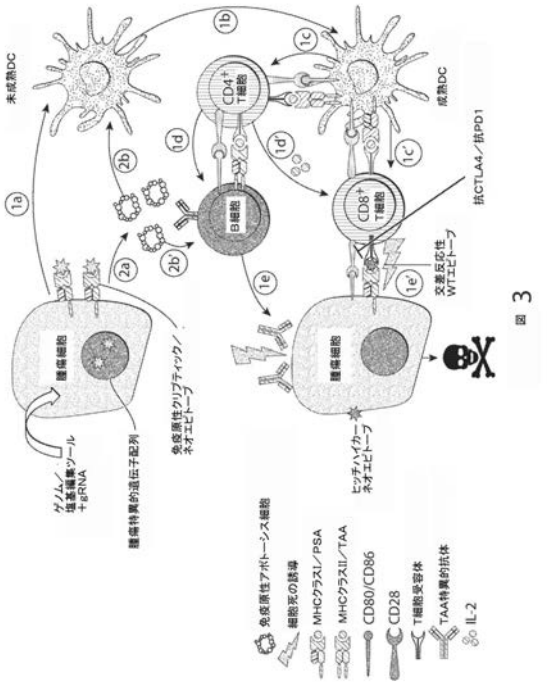


図 3

【図４】

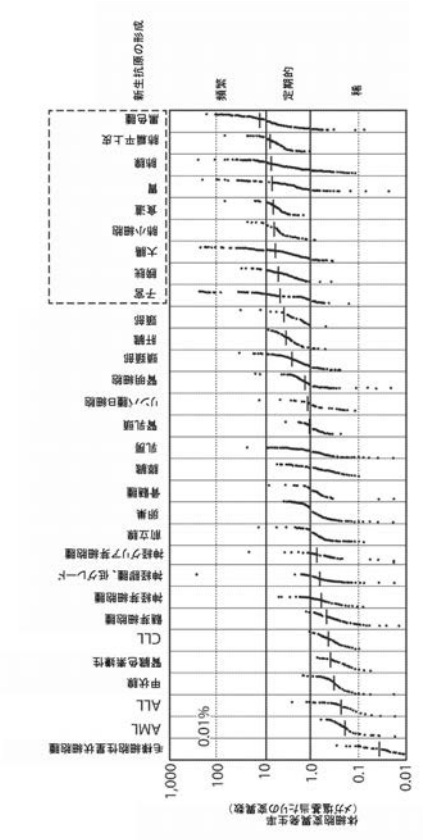


図 4

【配列表】
2020510038000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/021880

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 9 068 179 B1 (HARVARD COLLEGE [US]) 30 June 2015 (2015-06-30) column 1, line 47 - column 4, line 28 column 5, line 4 - column 15, line 64 column 20, line 9 - column 34, line 11; examples ----- -/--	1-208

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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

"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	Date of mailing of the international search report
11 June 2018	20/06/2018

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Montero Lopez, B

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/021880

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FISCHER ELIANE ET AL: "Cryptic Epitopes Induce High-Titer Humoral Immune Response in Patients with Cancer", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 185, no. 5, September 2010 (2010-09), pages 3095-3102, XP002781813, ISSN: 0022-1767 page 3095, right-hand column, paragraph 1 - paragraph 3 page 3098, left-hand column, paragraph 2 - page 309, right-hand column, paragraph 1 page 3099, right-hand column, last paragraph - page 3101, left-hand column, last paragraph	1-208
A	KOMOR ALEXIS C ET AL: "CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes", CELL, vol. 168, no. 1-2, 12 January 2017 (2017-01-12), pages 20-36, XP002781814, page 28, right-hand column, paragraph 2 - page 29, left-hand column, paragraph 3	1-208
A	WO 01/36452 A2 (EPIMMUNE INC [US]; TANGRI SHABNAM [US]; SETTE ALESSANDRO [US]; ISHIOKA) 25 May 2001 (2001-05-25) page 3, line 23 - page 4, line 17 page 8, line 5 - line 17	1-208
A	TOURDOT SOPHIE ET AL: "A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: Implication in the identification of cryptic tumor epitopes", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 30, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 3411-3421, XP002781815, ISSN: 0014-2980 page 3411, right-hand column, paragraph 2 page 3412, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 page 3416, right-hand column, paragraph 2 page 3418, right-hand column, last paragraph - page 3419, left-hand column, paragraph 2	1-208

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2018/021880

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 9068179 B1	30-06-2015	AU 2014362208 A1	30-06-2016
		CA 2933625 A1	18-06-2015
		CN 105934516 A	07-09-2016
		EP 3080265 A1	19-10-2016
		JP 2017500035 A	05-01-2017
		US 2015165054 A1	18-06-2015
		US 2015166980 A1	18-06-2015
		US 2015166981 A1	18-06-2015
		US 2015166982 A1	18-06-2015
		US 2015166983 A1	18-06-2015
		US 2015166984 A1	18-06-2015
		US 2015166985 A1	18-06-2015
		US 2016304846 A1	20-10-2016
		WO 2015089406 A1	18-06-2015
WO 0136452 A2	25-05-2001	AT 445643 T	15-10-2009
		AU 1661201 A	30-05-2001
		CA 2386341 A1	25-05-2001
		DK 1230268 T3	08-02-2010
		EP 1230268 A2	14-08-2002
		EP 2177534 A2	21-04-2010
		JP 4776131 B2	21-09-2011
		JP 2003521243 A	15-07-2003
		JP 2011101654 A	26-05-2011
		US 2003143672 A1	31-07-2003
		US 2009169574 A1	02-07-2009
		WO 0136452 A2	25-05-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K	***45/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	38/43		
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	38/46		
A61P	***37/04***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	45/00		
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/00		
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04		
C12N	*15/55*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
C12N	*15/11*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
			Ｃ１２Ｎ	15/62	ＺＮＡＺ	
			Ｃ１２Ｎ	15/55		
			Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ	

(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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72)発明者　リウ，デイビッド　アール.
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２４２０、レキシントン、ホイットマン　サークル　３

Ｆターム(参考) 4C084 AA02 AA19 BA02 BA08 BA22 BA23 BA41 CA18 CA53 DC01
DC22 DC26 MA02 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB021 ZB051 ZB091
ZB261 ZC412 ZC751
4C085 AA03 AA04 AA13 AA14 BB01 BB11 BB22 BB23 CC21 CC23
DD62 EE03 GG01 GG02 GG04