

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-544013
(P2024-544013A)

(43)公表日 令和6年11月26日(2024.11.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	47/44 (2017.01)	A 6 1 K	47/44		4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/15 (2006.01)	C 0 7 K	14/15		4 C 0 7 6
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全194頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-533014(P2024-533014)	(71)出願人	515025398
(86)(22)出願日	令和4年12月2日(2022.12.2)		ザ ブロード インスティテュート, イン
(85)翻訳文提出日	令和6年8月2日(2024.8.2)		コーポレーテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2022/080856		THE BROAD INSTITUTE
(87)国際公開番号	WO2023/102550		, INC.
(87)国際公開日	令和5年6月8日(2023.6.8)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
(31)優先権主張番号	63/285,995		2142、ケンブリッジ、メイン スト
(32)優先日	令和3年12月3日(2021.12.3)		リート 415、ルーム 7003
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		415 Main Street, Roo
			m 7003, Cambridge, M
(31)優先権主張番号	63/298,611		assachusetts 02142
(32)優先日	令和4年1月11日(2022.1.11)		United States of Am
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		erica
		(71)出願人	507044516
(31)優先権主張番号	63/298,621		プレジデント アンド フェローズ オブ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 有効な I N V I V O 送達のための組成物および方法

(57)【要約】

本明細書に開示されているのは、細胞中へのカーゴ(一例として、治療用カーゴ)の効率的な送達に関する、実例としてはin vivo送達のための、組成物、方法、キット、およびシステムである。本開示は、治療用カーゴを送達するための脂質含有粒子(一例として、ウイルス様粒子)を提供する。本開示はまた、本明細書に提供される脂質含有粒子をコードするポリヌクレオチドも提供し、これは、該脂質含有粒子を生産するのに有用なこともある。また提供されるのは、本明細書に提供される脂質含有粒子を使用して細胞中の核酸分子を編集する方法、ならびに脂質含有粒子を含む細胞およびキットもある。

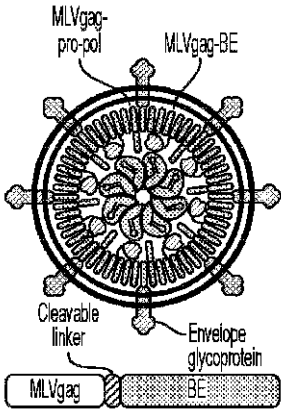


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂質含有粒子であって、

- a. ヒト内在性レトロウイルス (HERV) エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子;
 - b. 核外移行配列 (NES) ヘカップリングされた原形質膜局在化タンパク質を含む融合タンパク質; および
 - c. 治療用カーゴ
- を含む、前記脂質含有粒子。

【請求項 2】

原形質膜局在化タンパク質が、ヒト内在性レトロウイルス (HERV) 構造タンパク質、任意に HERV gag; ヒト化ウイルス構造タンパク質; プレクストリン相同 (PH) ドメイン; または非免疫原性原形質膜動員タンパク質を含む、請求項 1 に記載の脂質含有粒子。

【請求項 3】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ (任意に IIS 型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T 細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項 1~2 のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項 4】

融合タンパク質が、治療用カーゴをさらに含む、請求項 3 に記載の脂質含有粒子。

【請求項 5】

融合タンパク質が、N 末端から C 末端へ順に配置された、原形質膜局在化タンパク質、NES、および治療用カーゴを含む、請求項 4 に記載の脂質含有粒子。

【請求項 6】

融合タンパク質が、切断可能リンカーをさらに含み、任意にここで切断可能リンカーが、原形質膜局在化タンパク質と治療用カーゴとの間に位置し、任意にここで切断可能リンカーが、NES と治療用カーゴとの間に位置し、および任意にここで融合タンパク質が、切断可能リンカーの核局在化配列 (NLS) C 末端をさらに含む、請求項 5 に記載の脂質含有粒子。

【請求項 7】

脂質含有粒子が、細胞; ウイルス様粒子 (VLP); プロテオ-リピドビヒクル (PLV); リポソーム、任意に脂質ナノ粒子; または細胞外小胞、任意にエキソソームもしくはエクソソームを含む、請求項 1~6 のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項 8】

融合タンパク質が、カーゴをさらに含み、ここでカーゴが、治療用カーゴに対する結合パートナーである、請求項 1~7 のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項 9】

組成物であって、

- a. ヒト内在性レトロウイルス (HERV) エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子をコードする、第 1 の核酸分子; および
 - b. 核外移行配列 (NES) ヘカップリングされた原形質膜局在化タンパク質およびカーゴを含む融合タンパク質をコードする、第 2 の核酸分子、ここでカーゴが、治療用カーゴまたは治療用カーゴに対する結合パートナーを含む、
- を含む、前記組成物。

【請求項 10】

原形質膜局在化タンパク質が、ヒト内在性レトロウイルス (HERV) 構造タンパク質、任意に HERV gag; ヒト化ウイルス構造タンパク質; プレクストリン相同 (PH) ドメイン; または非免疫原性原形質膜動員タンパク質を含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 1 1】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ(任意にIIS型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項9～10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 2】

融合タンパク質が、N末端からC末端へ順に配置された、原形質膜局在化タンパク質、NES、および治療用カーゴを含む、請求項9～11のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 1 3】

融合タンパク質が、切断可能リンカーをさらに含み、任意にここで切断可能リンカーが、原形質膜局在化タンパク質と治療用カーゴとの間に位置し、任意にここで切断可能リンカーが、NESと治療用カーゴとの間に位置し、および任意にここで融合タンパク質が、切断可能リンカーの核局在化配列(NLS)C末端を含む、請求項12に記載の組成物。

【請求項 1 4】

組成物が、脂質含有粒子であり、任意にここで脂質含有粒子が、細胞;ウイルス様粒子(VLP);プロテオ-リピドビヒクル(PLV);リポソーム、任意に脂質ナノ粒子;または細胞外小胞、任意にエキソソームもしくはエクトソームを含む、請求項9～13のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 1 5】

脂質含有粒子であって、

- a. ヒト内在性レトロウイルス(HERV)エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子;および
 - b. 切断可能リンカーヘカップリングされた原形質膜局在化タンパク質を含む融合タンパク質;および
 - c. 治療用カーゴ
- を含む、前記脂質含有粒子。

【請求項 1 6】

原形質膜局在化タンパク質が、ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質を含む、請求項15に記載の脂質含有粒子。

30

【請求項 1 7】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ(任意にIIS型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項15～16のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項 1 8】

融合タンパク質が、治療用カーゴをさらに含む、請求項15～17のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

40

【請求項 1 9】

融合タンパク質が、N末端からC末端へ順に配置された、原形質膜局在化タンパク質、切断可能リンカー、および治療用カーゴを含み、任意にここで融合タンパク質が、切断可能リンカーの核局在化配列(NLS)C末端をさらに含む、請求項18に記載の脂質含有粒子。

【請求項 2 0】

脂質含有粒子が、細胞;ウイルス様粒子(VLP);プロテオ-リピドビヒクル(PLV);リポソーム、任意に脂質ナノ粒子;または細胞外小胞、任意にエキソソームもしくはエクトソームを含む、請求項15～19のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

50

【請求項 2 1】

融合タンパク質が、カーゴをさらに含み、ここでカーゴが、治療用カーゴに対する結合パートナーである、請求項 15～20 のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項 2 2】

組成物であって、

- a. ヒト内在性レトロウイルス (HERV) エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子をコードする、第 1 の核酸分子; および
 - b. 切断可能リンカーヘカップリングされた原形質膜局在化タンパク質およびカーゴを含む融合タンパク質をコードする、第 2 の核酸分子、ここでカーゴが、治療用カーゴかまたは治療用カーゴに対する結合パートナーを含む、
- を含む、前記組成物。

10

【請求項 2 3】

原形質膜局在化タンパク質が、ヒト化レトロウイルス構造タンパク質; ヒト内在性レトロウイルス (HERV) 構造タンパク質、任意に HERV gag; プレクストリン相同 (PH) ドメイン; または非免疫原性原形質膜動員タンパク質を含む、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ (任意に IIS 型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T 細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、もしくは小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項 22～23 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 2 5】

融合タンパク質が、N 末端から C 末端へ順に配置された、原形質膜局在化タンパク質、切断可能リンカー、および治療用カーゴを含み、任意にここで融合タンパク質が、切断可能リンカーの核局在化配列 (NLS) C 末端をさらに含む、請求項 22～24 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 6】

組成物が、脂質含有粒子であり、任意にここで脂質含有粒子が、細胞; ウイルス様粒子 (VLP); プロテオリピドビヒクル (PLV); リボソーム、任意に脂質ナノ粒子; または細胞外小胞、任意にエキソソームもしくはエクトソームを含む、請求項 22～25 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 2 7】

i) ヒト化レトロウイルス構造タンパク質; ヒト内在性レトロウイルス (HERV) 構造タンパク質、任意に HERV gag; プレクストリン相同 (PH) ドメイン; または非免疫原性原形質膜動員タンパク質; および ii) 核外移行配列 (NES) を含む融合タンパク質を含む、脂質含有粒子。

【請求項 2 8】

カーゴをさらに含み、ここでカーゴが、治療用カーゴかまたは治療用カーゴに対する結合パートナーであり、任意にここで治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ (任意に IIS 型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T 細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項 27 に記載の脂質含有粒子。

40

【請求項 2 9】

融合タンパク質が、治療用カーゴをさらに含む、請求項 28 に記載の脂質含有粒子。

【請求項 3 0】

融合タンパク質が、N 末端から C 末端へ順に配置された、i) ヒト化レトロウイルス構造タンパク質; ヒト内在性レトロウイルス (HERV) 構造タンパク質、任意に HERV gag; プレ

50

クストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質、ii)NES、およびiii)治療用カーゴを含む、請求項29に記載の脂質含有粒子。

【請求項31】

融合タンパク質が、切断可能リンカーをさらに含み、任意にここで切断可能リンカーが、i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質と;ii)治療用カーゴとの間に位置し、任意にここで切断可能リンカーが、iii)NESと、iv)治療用カーゴとの間にあり、任意にここで融合タンパク質が、切断可能リンカーの核局在化配列(NLS)C末端をさらに含む、請求項30に記載の脂質含有粒子。

【請求項32】

脂質含有粒子が、細胞;ウイルス様粒子(VLP);プロテオリピドビヒクル(PLV);リポソーム、任意に脂質ナノ粒子;または細胞外小胞、任意にエキソソームもしくはエクトソームを含む、請求項27~31のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項33】

i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質、ii)核外移行配列(NES)、およびiii)カーゴを含む融合タンパク質をコードする核酸分子を含む組成物であって、ここでカーゴが、治療用カーゴかまたは治療用カーゴに対する結合パートナーである、前記組成物。

【請求項34】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ(任意にIIS型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項33に記載の組成物。

【請求項35】

融合タンパク質が、N末端からC末端へ順に配置された、i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質、ii)NES、およびiii)治療用カーゴを含む、請求項33または34に記載の組成物。

【請求項36】

融合タンパク質が、切断可能リンカーをさらに含み、任意にここで切断可能リンカーが、i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質と;ii)治療用カーゴとの間に位置し、任意にここで切断可能リンカーが、iii)NESと、iv)治療用カーゴとの間にあり、および任意にここで融合タンパク質が、切断可能リンカーの核局在化配列(NLS)C末端をさらに含む、請求項35に記載の組成物。

【請求項37】

組成物が、脂質含有粒子であり、任意にここで脂質含有粒子が、細胞;ウイルス様粒子(VLP);プロテオリピドビヒクル(PLV);リポソーム、任意に脂質ナノ粒子;または細胞外小胞、任意にエキソソームもしくはエクトソームを含む、請求項33~36のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項38】

i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質、ii)切断可能リンカー、およびiii)カーゴを含む融合タンパク質を含む脂質含有粒子であって、ここでカーゴが、治療用カーゴかまたは治療用カーゴに対する結合パートナーである、前記脂質含有粒子。

【請求項39】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、

10

20

30

40

50

制限エンドヌクレアーゼ(任意にIIS型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項38に記載の脂質含有粒子。

【請求項40】

切断可能リンカーが、i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質と、ii)治療用カーゴとの間にある、請求項38または39のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項41】

融合タンパク質が、NESをさらに含み、任意にここでNESが、i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質と、ii)治療用カーゴとの間にあり、任意にここでNESが、i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質と、ii)切断可能リンカーとの間にあり、および任意にここで融合タンパク質が、切断可能リンカーの核局在化配列(NLS)C末端をさらに含む、請求項38~40のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項42】

脂質含有粒子が、細胞;ウイルス様粒子(VLP);プロテオリピドビヒクル(PLV);リボソーム、任意に脂質ナノ粒子;または細胞外小胞、任意にエキソソームもしくはエクトソームを含む、請求項38~41のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項43】

i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質、ii)切断可能リンカー、およびiii)カーゴを含む融合タンパク質をコードする核酸分子を含む組成物であって、ここでカーゴが、治療用カーゴかまたは治療用カーゴに対する結合パートナーである、前記組成物。

【請求項44】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ(任意にIIS型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項43に記載の組成物。

【請求項45】

切断可能リンカーが、i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質と、ii)治療用カーゴとの間にある、請求項43または44のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項46】

融合タンパク質が、NESをさらに含み、任意にここでNESが、i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質と、ii)治療用カーゴとの間にあり、任意にここでNESが、i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質と、ii)切断可能リンカーとの間にあり、任意にここで融合タンパク質が、切断可能リンカーの核局在化配列(NLS)C末端をさらに含む、請求項43~45のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項47】

組成物が、脂質含有粒子であり、任意にここで脂質含有粒子が、細胞;ウイルス様粒子(

10

20

30

40

50

VLP);プロテオリピドビヒクル(PLV);リポソーム、任意に脂質ナノ粒子;または細胞外小胞、任意にエキソソームもしくはエクトソームを含む、請求項43~46のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項48】

ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;またはヒト化ウイルス構造タンパク質をさらに含む、請求項1~8、15~21、27~32、または38~42のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項49】

ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;またはヒト化ウイルス構造タンパク質をコードする第3の核酸分子をさらに含む、請求項9~14または請求項22~26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項50】

組成物中の第2の核酸分子と第3の核酸分子との合計に対する第2の核酸分子のパーセンテージが、約、少なくとも、もしくは多くとも、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%である、請求項49に記載の組成物。

【請求項51】

ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;またはヒト化ウイルス構造タンパク質をコードする核酸分子をさらに含む、請求項33~37または請求項43~47のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項52】

融合タンパク質をコードする核酸分子と、ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;またはヒト化ウイルス構造タンパク質をコードする核酸分子との合計に対する、融合タンパク質をコードする核酸分子のパーセンテージが、約、少なくとも、もしくは多くとも、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%である、請求項51に記載の組成物。

【請求項53】

脂質含有粒子が、非ヒトgagタンパク質も非ヒト化gagタンパク質も含まない、請求項1~8、15~21、27~32、38~42、または48のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項54】

組成物が、非ヒトgagタンパク質または非ヒト化gagタンパク質をコードする核酸分子を含まない、請求項9~14、22~26、33~37、または43~47のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項55】

細胞を、請求項1~8、15~21、27~32、38~42、または48のいずれか一項に記載の脂質含有粒子と接触させることを含む、方法。

【請求項56】

請求項1~8、15~21、27~32、38~42、または48のいずれか一項に記載の脂質含有粒子の投与を、これを必要とする対象へすることを含む、方法。

【請求項57】

請求項1~8のいずれか一項に記載の脂質含有粒子を生産する方法であって、

a. 次を発現するシステムを提供すること:

i. ヒト内在性レトロウイルス(HERV)エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子;

ii. 核外移行配列(NES)ヘカップリングされた原形質膜局在化タンパク質を含む、融合タンパク質;および

iii. カーゴ、

ここでシステムが、脂質含有粒子を生産する;および任意に

b. 脂質含有粒子を採取および精製すること

10

20

30

40

50

を含む、前記方法。

【請求項 58】

請求項15～21のいずれか一項に記載の脂質含有粒子を生産する方法であって、

a. 次を発現するシステムを提供すること:

i. ヒト内在性レトロウイルス (HERV) エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子;

ii. 切断可能リンカーヘカップリングされた原形質膜局在化タンパク質を含む、融合タンパク質; および

iii. カーゴ、

ここでシステムが、脂質含有粒子を産生する; および任意に

10

b. 脂質含有粒子を採取および精製すること

を含む、前記方法。

【請求項 59】

請求項27～32のいずれか一項に記載の脂質含有粒子を生産する方法であって、

a. i) ヒト化レトロウイルス構造タンパク質; ヒト内在性レトロウイルス (HERV) 構造タンパク質、任意に HERV gag; プレクストリン相同 (PH) ドメイン; または非免疫原性原形質膜動員タンパク質、および ii) 核外移行配列 (NES) を含む融合タンパク質を発現するシステムを提供すること、ここでシステムが、脂質含有粒子を産生する; および任意に

b. 脂質含有粒子を採取および精製すること

を含む、前記方法。

20

【請求項 60】

請求項38～42のいずれか一項に記載の脂質含有粒子を生産する方法であって、

a. i) ヒト化レトロウイルス構造タンパク質; ヒト内在性レトロウイルス (HERV) 構造タンパク質、任意に HERV gag; プレクストリン相同 (PH) ドメイン; または非免疫原性原形質膜動員タンパク質、ii) 切断可能リンカー、および (iii) カーゴを含む融合タンパク質を発現するシステムを提供すること、ここでシステムが、脂質含有粒子を産生する; 任意に

b. 脂質含有粒子を採取および精製すること

を含む、前記方法。

【請求項 61】

システムが、ヒト内在性レトロウイルス (HERV) 構造タンパク質、任意に HERV gag; またはヒト化ウイルス構造タンパク質をさらに発現する、請求項57～60のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 62】

システムが、生産細胞、無細胞抽出物、または細胞溶解物を含む、請求項57～61のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 63】

タンパク質コアをカプセル化する脂質膜を含む脂質含有粒子であって、ここでタンパク質コアが、群特異抗原 (gag) プロテアーゼ (pro) ポリタンパク質および切断産物を含み、ここで脂質含有粒子が、治療用カーゴをさらに含み、ここで治療用カーゴが、タンパク質コアの内側に存在し、ならびに

40

ここで切断産物が、(i) gagヌクレオカプシドタンパク質の配列および(ii)核外移行配列 (NES) を含み、かつ治療用カーゴを欠く、前記脂質含有粒子。

【請求項 64】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項63に記載の脂質含有粒子。

【請求項 65】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼも、逆転写酵素も、塩基エディタも、プライムエディタ

50

も含まない、請求項63に記載の脂質含有粒子。

【請求項66】

切断産物が、少なくとも2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項63～65のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項67】

切断産物が、2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項63～65のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項68】

脂質含有粒子が、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含む融合タンパク質をさらに含み、ここで第1のポリペプチドが、切断産物の配列を含み、および第2のポリペプチドが、治療用カーゴの配列を含む、請求項63～67のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項69】

融合タンパク質が、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの間に位置づけられる切断可能リンカーをさらに含む、請求項68に記載の脂質含有粒子。

【請求項70】

切断可能リンカーが、プロテアーゼ切断部位を含む、請求項69に記載の脂質含有粒子。

【請求項71】

プロテアーゼ切断部位が、モロニー Maus 白血病ウイルス(MMLV)プロテアーゼ切断部位、またはフレンド Maus 白血病ウイルス(FMLV)プロテアーゼ切断部位である、請求項70に記載の脂質含有粒子。

【請求項72】

プロテアーゼ切断部位が、アミノ酸配列TSTLLMENSS(配列番号1)、PRSSLYPALTP(配列番号2)、VQALVLTQ(配列番号3)、PLQVLTNLNIERR(配列番号4)、または配列番号1～4に定められる配列のいずれか1つと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項70に記載の脂質含有粒子。

【請求項73】

融合タンパク質が、少なくとも2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項68～72のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項74】

融合タンパク質が、2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項68～72のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項75】

融合タンパク質の量に対するタンパク質コアの内側に存在する治療用カーゴの量の比が、少なくとも1.5である、請求項68～74のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項76】

比が、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、または20である、請求項75に記載の脂質含有粒子。

【請求項77】

比が、少なくとも100、1000、または10,000である、請求項75または76に記載の脂質含有粒子。

【請求項78】

細胞中の核酸分子を編集する方法であって、細胞を、請求項63～77のいずれか一項に記載の脂質含有粒子と接触させることを含む、前記方法。

【請求項79】

脂質含有粒子が、同等の脂質含有粒子の効率と比較してより高い効率にて細胞中の核酸

10

20

30

40

50

分子を編集し、および同等の脂質含有粒子において、切断産物が、gagヌクレオカプシドタンパク質を含むが、しかしNESと治療用カーゴとの両方を欠く、請求項78に記載の方法。

【請求項80】

タンパク質コアをカプセル化する脂質膜を含む脂質含有粒子であって、ここでタンパク質コアが、群特異抗原(gag)プロテアーゼ(pro)ポリタンパク質および融合タンパク質を含み、

ここで融合タンパク質が、次:

(a) gagヌクレオカプシドタンパク質の配列、

(b) 治療用カーゴ、

(c) 切断可能リンカー、および

(d) 核外移行配列(NES)

を含み、ならびに

ここで切断可能リンカーが、治療用カーゴとNESとの間に位置づけられる、前記脂質含有粒子。

【請求項81】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項80に記載の脂質含有粒子。

【請求項82】

融合タンパク質の量に対するタンパク質コアの内側に存在する治療用カーゴの量の比が、少なくとも1.5である、請求項80または81に記載の脂質含有粒子。

【請求項83】

比が、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、または20である、請求項82に記載の脂質含有粒子。

【請求項84】

比が、少なくとも100、1000、または10,000である、請求項82に記載の脂質含有粒子。

【請求項85】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼも、逆転写酵素も、塩基エディタも、プライムエディタも含まない、請求項80に記載の脂質含有粒子。

【請求項86】

タンパク質コアが、gagヌクレオカプシドタンパク質の配列およびNESを含み、かつ治療用カーゴを欠く、切断産物をさらに含む、請求項80～85のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項87】

切断可能リンカーが、プロテアーゼ切断部位を含む、請求項80～86のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項88】

プロテアーゼ切断部位が、モロニー Maus 白血病ウイルス(MMLV)プロテアーゼ切断部位、またはフレンド Maus 白血病ウイルス(FMLV)プロテアーゼ切断部位である、請求項87に記載の脂質含有粒子。

【請求項89】

プロテアーゼ切断部位が、アミノ酸配列TSTLLMENS(配列番号1)、PRSSLYPALTP(配列番号2)、VQALVLTQ(配列番号3)、PLQVLTLNIERR(配列番号4)、または配列番号1～4に定められる配列のいずれか1つと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項87に記載の脂質含有粒子。

【請求項90】

融合タンパク質が、少なくとも2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項80～89のいずれか一項に記載の分子アセンブリ。

【請求項91】

融合タンパク質が、2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項80～89のいずれか一項に記載の脂質含有粒子。

【請求項92】

細胞中の核酸分子を編集する方法であって、細胞を、請求項80～91のいずれか一項に記載の脂質含有粒子と接触させることを含む、前記方法。

【請求項93】

脂質含有粒子が、同等の脂質含有粒子の効率と比較してより高い効率にて細胞中の核酸分子を編集し、ならびに同等の脂質含有粒子において、治療用カーゴおよび切断可能リンカーが、融合タンパク質中の切断可能リンカーの同じ側にある、請求項92に記載の方法。

【請求項94】

脂質含有粒子の集団であって、

ここで集団が、タンパク質コアをカプセル化する脂質膜を含む脂質含有粒子を含み、

ここでタンパク質コアが、群特異抗原(gag)プロテアーゼ(pro)ポリタンパク質および融合タンパク質を含み、

ここで集団が、治療用カーゴを含む脂質含有粒子を含み、ここで治療用カーゴが、タンパク質コアの内側に存在し、

ここで融合タンパク質の量に対するタンパク質コアの内側に存在する治療用カーゴの量の比が、脂質含有粒子の集団の中で少なくとも1.5であり、

ここで融合タンパク質が、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含み、ならびに

ここで第1のポリペプチドが、gagヌクレオカプシドタンパク質の配列を含み、および第2のポリペプチドが、治療用カーゴの配列を含む、前記脂質含有粒子の集団。

【請求項95】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項94に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項96】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、逆転写酵素、塩基エディタ、またはプライムエディタを含まない、請求項94に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項97】

融合タンパク質が、NESをさらに含む、請求項94～96のいずれか一項に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項98】

融合タンパク質が、少なくとも2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項97に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項99】

融合タンパク質が、2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項97に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項100】

タンパク質コアが、切断産物をさらに含み、ここで切断産物が、(i) gagヌクレオカプシドタンパク質および(ii)核外移行配列(NES)を含み、かつ治療用カーゴを欠く、請求項

10

20

30

40

50

94～99のいずれか一項に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項101】

切断産物が、少なくとも2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項100に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項102】

切断産物が、2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項100に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項103】

融合タンパク質が、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの間に位置づけられる切断可能リンカーをさらに含む、請求項94～102のいずれか一項に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項104】

切断可能リンカーが、プロテアーゼ切断部位を含む、請求項103に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項105】

プロテアーゼ切断部位が、モロニー Maus 白血病ウイルス(MMLV)プロテアーゼ切断部位、またはフレンド Maus 白血病ウイルス(FMLV)プロテアーゼ切断部位である、請求項104に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項106】

プロテアーゼ切断部位が、アミノ酸配列TSTLLMENSS(配列番号1)、PRSSLYPALTP(配列番号2)、VQALVLTQ(配列番号3)、PLQVLTNIERR(配列番号4)、または配列番号1～4に定められる配列のいずれか1つと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項104に記載の脂質含有粒子の集団。

【請求項107】

細胞の集団中の核酸分子を編集する方法であって、細胞の集団を、請求項94～106のいずれか一項に記載の脂質含有粒子の集団と接触させることを含む、前記方法。

【請求項108】

脂質含有粒子の集団が、同等の脂質含有粒子の集団による編集の効率と比較して、より高い効率にて細胞中の核酸分子を編集し、および同等の脂質含有粒子の集団のタンパク質コア中の融合タンパク質の量に対する同等の脂質含有粒子の集団のタンパク質コアの内側に存在する治療用カーゴの量の比が、同等の脂質含有粒子の集団の中で1.5未満である、請求項107に記載の方法。

【請求項109】

治療用カーゴが、Casタンパク質に由来する、請求項63～77、80～91、または94～106のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項110】

Casタンパク質が、Cas9タンパク質である、請求項109に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項111】

脂質含有粒子が、ガイドRNAをさらに含む、請求項63～77、80～91、94～106、109、または110のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項112】

治療用カーゴが、ガイドRNAへ結合されている、請求項111に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項113】

治療用カーゴが、デアミナーゼドメインへ融合されたヌクレアーゼドメインを含む、請求項63～77、80～91、94～106、または109～112のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1 4】

デアミナーゼドメインが、アデノシンデアミナーゼドメインである、請求項 113 に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 1 5】

デアミナーゼドメインが、シトシンデアミナーゼドメインである、請求項 113 に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 1 6】

治療用カーゴが、塩基エディタを含む、請求項 63～77、80～91、94～104、または 109～115 のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 1 7】

塩基エディタが、ABE8e である、請求項 116 に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 1 8】

治療用カーゴが、核局在化配列(NLS)へ融合されたヌクレアーゼドメインを含む、請求項 63～77、80～91、94～106、または 109～117 のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 1 9】

治療用カーゴが、少なくとも 2 つの NLS を含む、請求項 118 に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 2 0】

脂質含有粒子が、膜融合タンパク質をさらに含む、請求項 63～77、80～91、94～106、または 109～119 のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 2 1】

膜融合タンパク質が、ウイルスエンベロープ糖タンパク質である、請求項 120 に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 2 2】

ウイルスエンベロープ糖タンパク質が、アデノウイルスエンベロープ糖タンパク質、アデノ随伴ウイルスエンベロープ糖タンパク質、レトロウイルスエンベロープ糖タンパク質、またはレンチウイルスエンベロープ糖タンパク質である、請求項 121 に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 2 3】

ウイルスエンベロープ糖タンパク質が、レトロウイルスエンベロープ糖タンパク質である、請求項 121 に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 2 4】

ウイルスエンベロープ糖タンパク質が、水疱性口内炎ウイルス G タンパク質(VSV-G)、ヒヒレトロウイルスエンベロープ糖タンパク質(BaEVRless)、FuG-B2 エンベロープ糖タンパク質、HIV-1 エンベロープ糖タンパク質、またはエコトロピックマウス白血病ウイルス(MLV)エンベロープ糖タンパク質である、請求項 121 に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 2 5】

膜融合タンパク質が、脂質含有粒子を特定の細胞型へ標的化させる、請求項 120～124 のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 2 6】

gag pro ポリタンパク質が、MMLV gag pro ポリタンパク質または FMLV gag pro ポリタンパク質を含む、請求項 63～77、80～91、94～106、または 109～125 のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項 1 2 7】

gag ヌクレオカプシドタンパク質が、MMLV gag ヌクレオカプシドタンパク質または FMLV gag ヌクレオカプシドタンパク質を含む、請求項 63～77、80～91、94～106

10

20

30

40

50

、または109～126のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項128】

融合タンパク質が、構造：

[gagヌクレオカプシドポリタンパク質]-[3X NES]-[切断可能リンカー]-[NLS]-[治療用カーゴ]-[NLS]

を含む、請求項63～77、80～91、94～106、または109～127のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団。

【請求項129】

次を含む組成物：

(i) 群特異抗原(gag)プロテアーゼ(pro)ポリタンパク質をコードする核酸配列を含む第1のポリヌクレオチド；

(ii) 融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第2のポリヌクレオチド、ここで融合タンパク質が、次を含む：

(a) gagヌクレオカプシドタンパク質の配列、

(b) 治療用カーゴ、

(c) 切断可能リンカー、および

(d) 核外移行配列(NES)、ならびに

ここで切断可能リンカーが、治療用カーゴとNESとの間に位置づけられる、前記組成物。

【請求項130】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項129に記載の組成物。

【請求項131】

治療用カーゴタンパク質が、ヌクレアーゼも、逆転写酵素も、塩基エディタも、プライムエディタも含まない、請求項129に記載の組成物。

【請求項132】

組成物が、ガイドRNA(gRNA)をコードする核酸配列を含む第3のポリヌクレオチドをさらに含む、請求項129～131のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項133】

治療用カーゴが、ガイドRNAへ結合されている、請求項132に記載の組成物。

【請求項134】

組成物が、膜融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第4のポリヌクレオチドをさらに含む、請求項129～133のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項135】

膜融合タンパク質が、ウイルスエンベロープ糖タンパク質である、請求項134に記載の組成物。

【請求項136】

ウイルスエンベロープ糖タンパク質が、アデノウイルスエンベロープ糖タンパク質、アデノ随伴ウイルスエンベロープ糖タンパク質、レトロウイルスエンベロープ糖タンパク質、またはレンチウイルスエンベロープ糖タンパク質である、請求項135に記載の組成物。

【請求項137】

ウイルスエンベロープ糖タンパク質が、レトロウイルスエンベロープ糖タンパク質である、請求項136に記載の組成物。

【請求項138】

ウイルスエンベロープ糖タンパク質が、水疱性口内炎ウイルスGタンパク質(VSV-G)、ヒヒレトロウイルスエンベロープ糖タンパク質(BaEVRIless)、FuG-B2エンベロープ糖タンパク質、HIV-1エンベロープ糖タンパク質、またはエコトロピックマウス白血病ウ

10

20

30

40

50

イルス(MLV)エンベロープ糖タンパク質である、請求項136に記載の組成物。

【請求項139】

膜融合タンパク質が、特定の細胞型を標的化する、請求項134～138のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項140】

切断可能リンカーが、プロテアーゼ切断部位を含む、請求項129～139のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項141】

プロテアーゼ切断部位が、モロニー Maus 白血病ウイルス(MMLV)プロテアーゼ切断部位、またはフレンド Maus 白血病ウイルス(FMLV)プロテアーゼ切断部位である、請求項140に記載の組成物。

10

【請求項142】

プロテアーゼ切断部位が、アミノ酸配列TSTLLMENSS(配列番号1)、PRSSLYPALTP(配列番号2)、VQALVLTQ(配列番号3)、PLQVLTNIERR(配列番号4)、または配列番号1～4に定められる配列のいずれか1つと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項140に記載の組成物。

【請求項143】

融合タンパク質が、少なくとも2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項129～142のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項144】

融合タンパク質が、2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項129～142のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項145】

治療用カーゴが、Casタンパク質に由来する、請求項129～144のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項146】

Casタンパク質が、Cas9タンパク質である、請求項129～145のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項147】

治療用カーゴが、デアミナーゼドメインへ融合されたヌクレアーゼドメインを含む、請求項129～146のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項148】

デアミナーゼドメインが、アデノシンデアミナーゼドメインである、請求項147に記載の組成物。

【請求項149】

デアミナーゼドメインが、シトシンデアミナーゼドメインである、請求項147に記載の組成物。

【請求項150】

治療用カーゴが、塩基エディタを含む、請求項129～149のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項151】

塩基エディタが、ABE8eである、請求項150に記載の組成物。

【請求項152】

治療用カーゴが、核局在化配列(NLS)へ融合されたヌクレアーゼドメインを含む、請求項129～151のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項153】

治療用カーゴが、少なくとも2つのNLSを含む、請求項152に記載の組成物。

【請求項154】

50

gag proポリタンパク質が、MMLV gag proポリタンパク質またはFMLV gag proポリタンパク質を含む、請求項129～153のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項155】

gagヌクレオカプシドタンパク質が、MMLV gagヌクレオカプシドタンパク質またはFMLV gagヌクレオカプシドタンパク質を含む、請求項129～154のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項156】

融合タンパク質が、構造：

[gagヌクレオカプシドポリタンパク質]-[3X NES]-[切断可能リンカー]-[NLS]-[治療用カーゴ]-[NLS]

を含む、請求項129～155のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項157】

融合タンパク質であって、次：

- (a) gagヌクレオカプシドタンパク質の配列、
- (b) 治療用カーゴ、
- (c) 切断可能リンカー、および
- (d) 核外移行配列(NES)、

を含む；ここで切断可能リンカーが、治療用カーゴとNESとの間に位置づけられる、前記融合タンパク質。

【請求項158】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項157に記載の融合タンパク質。

【請求項159】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼも、逆転写酵素も、塩基エディタも、プライムエディタも含まない、請求項157に記載の融合タンパク質。

【請求項160】

切断可能リンカーが、プロテアーゼ切断部位を含む、請求項157～159のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項161】

プロテアーゼ切断部位が、モロニー Maus 白血病ウイルス(MMLV)プロテアーゼ切断部位、またはフレンド Maus 白血病ウイルス(FMLV)プロテアーゼ切断部位である、請求項160に記載の融合タンパク質。

【請求項162】

プロテアーゼ切断部位が、アミノ酸配列TSTLLMENSS(配列番号1)、PRSSLYPALTP(配列番号2)、VQALVLTQ(配列番号3)、PLQVLTNIERR(配列番号4)、または配列番号1～4に定められる配列のいずれか1つと少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項160に記載の融合タンパク質。

【請求項163】

融合タンパク質が、少なくとも2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項157～162のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項164】

融合タンパク質が、2つのNES、3つのNES、4つのNES、5つのNES、6つのNES、7つのNES、8つのNES、9つのNES、または10のNESを含む、請求項157～162のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項165】

融合タンパク質が、構造：

10

20

30

40

50

[gagヌクレオカプシドポリタンパク質]-[3X NES]-[切断可能リンカー]-[NLS]-[治療用カーゴ]-[NLS]

を含む、請求項157～164のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項166】

治療用カーゴが、Casタンパク質に由来する、請求項157～165のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項167】

Casタンパク質が、Cas9タンパク質である、請求項166に記載の融合タンパク質。

【請求項168】

治療用カーゴが、デアミナーゼドメインへ融合されたヌクレアーゼドメインを含む、請求項157～167のいずれか一項に記載の融合タンパク質。 10

【請求項169】

デアミナーゼドメインが、アデノシンデアミナーゼドメインである、請求項168に記載の融合タンパク質。

【請求項170】

デアミナーゼドメインが、シトシンデアミナーゼドメインである、請求項168に記載の融合タンパク質。

【請求項171】

デアミナーゼドメインへ融合されたヌクレアーゼドメインが、塩基エディタを含む、請求項168～170のいずれか一項に記載の融合タンパク質。 20

【請求項172】

塩基エディタが、ABE8eである、請求項171に記載の融合タンパク質。

【請求項173】

ヌクレアーゼドメインおよび/または塩基エディタが、核局在化配列(NLS)へ融合されている、請求項168～172のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項174】

ヌクレアーゼドメインおよび/または塩基エディタが、少なくとも2つのNLSを含む、請求項173に記載の融合タンパク質。

【請求項175】

gagヌクレオカプシドタンパク質が、MMLV gagヌクレオカプシドタンパク質またはFMLV gagヌクレオカプシドタンパク質を含む、請求項157～174のいずれか一項に記載の融合タンパク質。 30

【請求項176】

請求項1～175のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団を含む、細胞。

【請求項177】

請求項1～176のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または脂質含有粒子の集団を含む、医薬組成物。

【請求項178】

生産細胞を、請求項129～156のいずれか一項に記載の組成物と接触させることを含む、脂質含有粒子を作製する方法。 40

【請求項179】

治療用カーゴが、ヌクレアーゼも、塩基エディタも、プライムエディタも含まない、請求項1～54のいずれか一項に記載の脂質含有粒子または組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、米国特許法第119条(e)の下で、各々参照により本明細書に組み込まれる、2021年12月3日に提出された米国仮特許出願第63/285,995号、2022年1月11日 50

に出願された米国仮特許出願第63/298,621号、2022年1月11日出願された米国仮特許出願第63/298,611号、2022年1月11日出願された米国仮特許出願第63/298,626号、および2022年11月7日出願された米国仮特許出願第63/423,372号の優先権を主張する。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金番号UG3AI150551、U01AI142756、R35GM118062、RM1HG009490、R01EY009339、およびT32GM095450の下で政府の支持を受けてなされた。政府は、本発明にある特定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

背景

レトロウイルスは、ウイルス様粒子(VLP)にとって魅力的な足場となることができる。レトロウイルスカプシドは、概して、無エンベロープ正二十面体ウイルスの堅固な対称性要件を欠いており(Zhang et al., 2015)、これは、非ネイティブタンパク質カーゴを組み込むための構造的柔軟性の増加を示唆している。くわえて、レトロウイルス向性は、異なるエンベロープ糖タンパク質を有するビリオンのシュードタイプ化によってモジュレートされることができ、これは、特定の細胞型に対するVLPの標的化を可能にすることができる(Cronin et al., 2005)。以前の研究では、所望のタンパク質カーゴをレトロウイルスgagポリタンパク質のC末端へ融合することが、そのカーゴタンパク質をレトロウイルス粒子内に直接パッケージングするのに充分であることが実証されている(Kaczmarek et al., 2011; Voelkel et al., 2010)。より最近では、同様の戦略が、レトロウイルス粒子内にCas9 RNPをパッケージングするために適用されている(Mangeot et al., 2019)。しかしながら、治療レベルのin vivo送達効率を有するVLPが依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0004】

概要

一側面において、本開示は、(a)ヒト内在性レトロウイルス(HERV)エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子と;(b)核外移行配列(NES)にカップリングされた原形質膜局在化タンパク質を含む融合タンパク質と;(c)治療用カーゴと、を含む、脂質含有粒子を提供する。

【0005】

別の側面において、本開示は、(a)ヒト内在性レトロウイルス(HERV)エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子をコードする、第1の核酸分子と;(b)核外移行配列(NES)へカップリングされた原形質膜局在化タンパク質およびカーゴを含む融合タンパク質をコードする、第2の核酸分子、ここで、カーゴが、治療用カーゴかまたは治療用カーゴに対する結合パートナーを含む、第2の核酸分子と、を含む、組成物を提供する。別の側面において、本開示は、核外移行配列(NES)にカップリングされた原形質膜局在化タンパク質と、カーゴと、を含む融合タンパク質をコードする核酸分子を提供し、ここで、カーゴは、治療用カーゴまたは治療用カーゴに対する結合パートナーを含む。

【0006】

さらに別の側面において、本明細書は、(a)ヒト内在性レトロウイルス(HERV)エンベロープタンパク質、(b)ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子と;(c)切断可能リンカーにカップリングされた原形質膜局在化タンパク質を含む融合タンパク質と;(d)治療用カーゴと、を含む、脂質含有粒子を説明する。いくつかの態様において、融合タンパク質は、NESを含む。

【0007】

別の側面において、本開示は、(a)システムを提供する工程であって、(i)ヒト内在性レ

10

20

30

40

50

トロウイルス(HERV)エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子;(ii)核外移行配列(NES)ヘカップリングされた原形質膜局在化タンパク質を含む、融合タンパク質;およびiii.カーゴ、を発現し、ここで、システムが、脂質含有粒子を産生する、システムを提供する工程と;任意に、(b)脂質含有粒子を採取および精製する工程と、を含む、本明細書に記載される脂質含有粒子を生産する方法を提供する。

【0008】

さらなる側面において、本開示は、(a)システムを提供する工程であって、(i)ヒト内在性レトロウイルス(HERV)エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子;(ii)切断可能リンカーヘカップリングされた原形質膜局在化タンパク質を含む、融合タンパク質;およびiii.カーゴ、を発現し、ここで、システムが、脂質含有粒子を産生する、システムを提供することと;任意に、(b)脂質含有粒子を採取および精製することと、を含む、本明細書に記載される脂質含有粒子を生産する方法を説明する。いくつかの態様において、融合タンパク質は、NESを含む。

10

【0009】

別の側面において、本開示は、(a)(i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質、および(ii)核外移行配列(NES)を含む、融合タンパク質を発現するシステムを提供することであって、ここで、システムが、脂質含有粒子を産生する、システムを提供することと、任意に、(b)脂質含有粒子を採取および精製することと、を含む、本明細書に記載される脂質含有粒子を生産する方法を提供する。

20

【0010】

さらに別の側面において、本開示は、(a)(i)ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質、(ii)切断可能リンカー、および(iii)カーゴを含む、融合タンパク質を発現するシステムを提供することであって、ここで、システムが、脂質含有粒子を産生する、システムを提供することと、任意に、(b)脂質含有粒子を採取および精製することと、を含む、本明細書に記載される脂質含有粒子を生産する方法を提供する。いくつかの態様において、融合タンパク質は、NESをさらに含む。

30

【0011】

様々な態様において、原形質膜局在化タンパク質は、ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;ヒト化ウイルス構造タンパク質;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質を含む。

【0012】

治療用カーゴは、様々な態様において、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ(任意に、IIS型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含むことができる。いくつかの態様において、治療用カーゴは、ヌクレアーゼも、逆転写酵素も、塩基エディタも、プライムエディタも含まない。いくつかの態様において、治療用カーゴは、タンパク質(一例として、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ(任意に、IIS型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、または逆転写酵素)である。いくつかの態様において、治療用カーゴは、核酸分子(一例として、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、アプタザイム、アプタマー、またはリボザイム)である。いくつかの態様において、治療用カーゴは、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ(任意に、IIS型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、

40

50

DNA、RNA、レトロトランスポゾン、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せである。

【0013】

様々な態様において、融合タンパク質は、N末端からC末端へ順に配置された、原形質膜局在化タンパク質、NES、および治療用カーゴを含むことができる。融合タンパク質は、切断可能リンカーをさらに含むことができ、任意にここで、切断可能リンカーは、原形質膜局在化タンパク質と治療用カーゴとの間に位置し、任意に、切断可能リンカーは、NESと治療用カーゴとの間に位置し、任意に融合タンパク質は、切断可能リンカーの核局在化配列(NLS)C末端をさらに含む。いくつかの態様において、NLSは、切断可能リンカーの切断後も依然として治療用カーゴに付着(attached)しており、細胞の核への治療用カーゴの送達を可能にするように、融合タンパク質内に位置する。

10

【0014】

様々な態様において、原形質膜局在化タンパク質は、ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、任意にHERV gag;ヒト化ウイルス構造タンパク質;プレクストリン相同(PH)ドメイン;または非免疫原性原形質膜動員タンパク質を含むことができる。

【0015】

様々な態様において、治療用カーゴは、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ(任意に、IIS型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、もしくは小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せである。

20

【0016】

別の側面において、本開示は、タンパク質コアをカプセル化する脂質膜を含む脂質含有粒子であって、ここで、タンパク質コアは、群特異抗原(gag)プロテアーゼ(pro)ポリタンパク質および切断産物を含み、脂質含有粒子は、治療用カーゴをさらに含み、治療用カーゴは、タンパク質コアの内側に存在し、ならびに切断産物は、(i) gagヌクレオカプシドタンパク質の配列および(ii)核外移行配列(NES)を含み、かつ治療用カーゴを欠く、脂質含有粒子を提供する。いくつかの態様において、治療用カーゴは、核局在化配列(NLS)へ融合される。

【0017】

別の側面において、本開示は、タンパク質コアをカプセル化する脂質膜を含む脂質含有粒子であって、ここで、タンパク質コアが、群特異抗原(gag)プロテアーゼ(pro)ポリタンパク質および融合タンパク質を含み、融合タンパク質が、以下:gagヌクレオカプシドタンパク質の配列と、治療用カーゴと、切断可能リンカーと、核外移行配列(NES)と、を含み、ここで、切断可能リンカーが、治療用カーゴとNESとの間に位置づけられる、脂質含有粒子を提供する。

30

【0018】

別の側面において、本開示は、脂質含有粒子の集団であって、ここで、集団が、タンパク質コアをカプセル化する脂質膜を含む脂質含有粒子を含み、タンパク質コアが、群特異抗原(gag)プロテアーゼ(pro)ポリタンパク質および融合タンパク質を含み、集団が、治療用カーゴを含む脂質含有粒子を含み、治療用カーゴが、タンパク質コアの内側に存在し、融合タンパク質の量に対するタンパク質コアの内側に存在する治療用カーゴの量の比が、脂質含有粒子の集団の中で少なくとも1.5であり、融合タンパク質が、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含み、ならびに第1のポリペプチドが、gagヌクレオカプシドタンパク質の配列を含み、かつ第2のポリペプチドが、治療用カーゴの配列を含む、集団を提供する。

40

【0019】

別の側面において、本開示は、組成物であって、以下:(i)群特異抗原(gag)プロテアーゼ(pro)ポリタンパク質をコードする核酸配列を含む第1のポリヌクレオチド;(ii)融合タンパク質をコードする核酸配列を含む第2のポリヌクレオチドであって、ここで、融合タ

50

ンパク質が、以下:gagヌクレオカプシドタンパク質の配列と、治療用カーゴと、切断可能リンカーと、核外移行配列(NES)と、を含む、第2のポリヌクレオチド、を含み、かつここで、切断可能リンカーが、治療用カーゴとNESとの間に位置づけられる、組成物を提供する。いくつかの態様において、組成物は、医薬組成物である。

【0020】

別の側面において、本開示は、融合タンパク質であって、gagヌクレオカプシドタンパク質の配列と、治療用カーゴと、切断可能リンカーと、核外移行配列(NES)と、を含み;ここで、切断可能リンカーが、治療用カーゴとNESとの間に位置づけられる、融合タンパク質を提供する。

【0021】

別の側面において、本開示は、例えば核酸編集の方法において、本明細書において提供される脂質含有粒子を使用する方法を提供する。

【0022】

別の側面において、本開示は、本明細書において提供される脂質含有粒子を生産するための細胞を提供する。いくつかの態様において、細胞は、本明細書において提供される脂質含有粒子の構成要素をコードする核酸のいずれかを含む。

【0023】

別の側面において、本開示は、本明細書において提供される脂質含有ナノ粒子、核酸配列、融合タンパク質、および組成物のいずれかを含むキットを提供する。

【0024】

前述の概念、および後述する追加の概念は、本開示がこの点で限定されないため、あらゆる好適な組合せで配置され得ることが了解されるべきである。さらに、本開示の他の利点および新規な特徴は、添付の図と併せて考慮すると、様々な非限定的な態様の以下の詳細な説明から明らかになるであろう。

【0025】

参照による組み込み

本明細書において言及される全ての刊行物、特許、および特許出願は、あたかも各個々の刊行物、特許、または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に指し示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0026】

本開示の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に定められている。本開示の特徴および利点のより良い理解は、本開示の原理が利用される例示的な態様を定める以下の詳細な説明、および添付の図面を参照することによって得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

図面の簡単な記載

【図1】図1Aは、塩基編集ウイルス様粒子(BE-VLP)の概略図を示す。図に示されるように、塩基エディタタンパク質は、粒子成熟の際にMLVプロテアーゼによって切断されるリンカーを介して、マウス白血病ウイルス(MLV)gagポリタンパク質のC末端へ融合される。

【0028】

図1Bは、バージョン1(v1)BE-VLPの塩基編集効率を要約する2つのグラフを示す。HEK293T細胞における2つのゲノム遺伝子座(それぞれ、「HEK2」および「HEK3」と称される)でのv1 BE-VLPのアデニン塩基編集効率。標的アデニンのプロトスペーサ位置は、下付き文字(すなわち、A5=5位のアデニン)で表示され、ここでは、PAMは、21~23位である。データは、n=3の独立した生物学的反復について、個々のデータ点および平均±標準誤差(s.e.m.)として示される。

【0029】

【図2A-B】図2Aは、v1操作VLP(eeVLP)およびv2 eVLPの概略図を示す。v2 BE-VLPにおけるより効率的なリンカー切断は、VLP成熟後のカーゴ放出の改善をもたらす

10

20

30

40

50

ことができる。

【0030】

図2Bは、HEK293T細胞におけるBCL11Aエンハンサ部位の位置A7でのv1およびv2のBE-eVLPのアデニン塩基編集効率を要約するグラフを示す。

【0031】

【図2C-D】図2Cは、生産細胞におけるv3 eVLPにおいて可能にされるような、カーゴの改善された局在化が、eVLPへのより効率的な組み込みをもたらすことを実証する概略図を示す。

【0032】

図2Dは、切断可能リンカーの上流に3xNESモチーフを導入することが、生産細胞におけるgag-3xNES-カーゴの細胞質内局在化を助長することができるが、しかし、形質導入細胞におけるフリーアデニン塩基エディタ(ABE)カーゴの核局在化を助長することができることを実証する概略図を示す。

【0033】

【図2E-F】図2Eは、HEK293T細胞におけるBCL11Aエンハンサ部位の位置A7でのv2.4およびv3のBE-eVLPのアデニン塩基編集効率を要約するグラフを示す。

【0034】

図2Fは、最適なgag-カーゴ:gag-pro-pol化学量論が、粒子あたりのカーゴタンパク質の量と、効率的な粒子成熟に必要なMMLVプロテアーゼの量とのバランスをとることができることを実証する概略図を示す。

【0035】

【図2G】図2Gは、HEK293T細胞におけるBCL11Aエンハンサ部位の位置A7における異なるgag-ABE:gag-pro-pol化学量論を有するv3.4 eVLPのアデニン塩基編集効率を要約するグラフを示す。説明文は、gag-ABEおよびgag-pro-polプラスミドの総量のgag-ABEプラスミド%を表示する。図2B、図2E、および図2Gに示すように、値およびエラーバーは、 $n=3$ の独立した生物学的反復の平均±標準誤差を反映する。データは、非線形回帰を用いて4パラメータロジスティック曲線に当てはめられた。

【0036】

【図3A-B】図3Aは、抗Cas9および抗MLV(p30)ELISAによってeVLPあたりのBE分子の量を定量するグラフである。値およびエラーバーは、 $n=3$ の独立した反復の平均±標準誤差を反映する。

【0037】

図3Bは、v1 sgRNA存在量に対して正規化された、sgRNA特異的プライマーを用いたRT-qPCRによって相対的sgRNA存在量を定量するグラフである。値およびエラーバーは、 $n=3$ の技術的反復の平均±標準誤差を反映する。

【0038】

【図3C-D】図3C~3Dは、HEK293T細胞におけるBCL11Aエンハンサ部位(図3C)およびNIH 3T3細胞におけるDnmt1部位(図3D)にて、編集効率をv1、v2.4、v3.4、およびv4のBE-eVLPと比較するグラフを示す。値およびエラーバーは、 $n=3$ の独立した生物学的反復の平均±標準誤差を反映する。データは、非線形回帰を用いて4パラメータロジスティック曲線に当てはめられた。

【0039】

【図3E-F】図3Eは、HEK2もしくはBCL11Aエンハンサ遺伝子座を別々に標的化する単一のv4 BE-eVLPか、または両方の遺伝子座を同時に標的化する複数のv4 BE-eVLPか、のいずれかのHEK293T細胞におけるアデニン塩基編集効率を要約するグラフである。

【0040】

図3Fは、Neuro-2a細胞または3T3線維芽細胞におけるFuG-B2シュードタイプ化v4 BE-eVLPのアデニン塩基編集効率を要約するグラフである。

【0041】

10

20

30

40

50

【図3G】図3Gは、v4 BE-eVLPまたはABE8eプラスミドで処置したHEK293T細胞における、3つのオンターゲットゲノム遺伝子座およびそれらの対応するCas依存性オフターゲット部位でのアデニン塩基編集効率を要約するグラフを示す。OT1=オフターゲット部位1、OT2=オフターゲット部位2、OT3=オフターゲット部位3。

【0042】

【図3H】図3Hは、v4 BE-eVLPまたはABE8eプラスミドで処置したHEK293T細胞における6つのオフターゲットRグループでのCas非依存性オフターゲット編集頻度を要約するグラフである。OTRL=オフターゲットRグループ。

【0043】

【図3I-J】図3Iは、溶解したeVLPまたは溶解緩衝液のみのqPCRによって検出されたv4 BE-eVLPあたりのBEコードDNAの分子の量を定量するグラフである。

10

【0044】

図3Jは、v4 BE-eVLPで処置したか、またはBEコードプラスミドでトランスフェクトしたかのいずれかのHEK293T細胞からの溶解物のqPCRによって検出された、BEコードDNAの量を定量するグラフである。図3E~図3Jに示すように、データは、n=3の独立した生物学的反復について、個々のデータ点および平均±標準誤差として示される。

【0045】

【図4A-B】図4Aは、ペイシエント由来の初代ヒト線維芽細胞におけるCOL7A1(R185X)突然変異の補正効率を要約するグラフである。

【0046】

20

図4Bは、初代マウス線維芽細胞におけるIdua(W392X)突然変異の補正効率を要約するグラフである。図4A~図4Bに示すように、値およびエラーバーは、n=3の独立した生物学的反復の平均±標準誤差を反映する。データは、非線形回帰を用いて4パラメータロジスティック曲線に当てはめられた。

【0047】

【図4C】図4Cは、初代ヒトT細胞におけるB2M遺伝子座およびCIITA遺伝子座におけるアデニン塩基編集効率を要約するグラフである。データは、n=3の独立した生物学的反復について、個々のデータ点および平均±標準誤差として示される。

【0048】

【図5A】図5Aは、v4 BE-eVLPのP0 ICV注射の概略図である。Dnmt1標的v4 BE-eVLPは、EGFP-KASHをコードするレンチウイルスと同時注射された。組織は注射の3週間後に採取され、皮質および中脳が分離された。核は、各組織について解離され、バルク未選別(全ての核)またはGFP+核としてハイスループット配列決定によって分析された。

30

【0049】

【図5B】図5Bは、バルク未選別(全ての核)およびGFP+集団におけるDnmt1遺伝子座でのアデニン塩基編集効率を要約するグラフである。データは、個々のデータ点、およびn=4マウスについての平均±標準誤差として示される。

【0050】

【図6A】図6Aは、BE-eVLPの全身注射の概略図である。Pcsk9標的化BE-eVLPは、6~7週齢のC57BL/6Jマウスへと後眼窩で注射された。器官は注射の1週間後に採取され、未選別細胞のゲノムDNAが配列決定された。

40

【0051】

【図6B-C】図6Bは、v1 BE-VLPまたはv4 BE-eVLPの全身注射後のマウス肝臓におけるPcsk9エクソン1スプライスドナーにおける、アデニン塩基編集効率を要約するグラフである。データは、n=3マウス(4×10^{11} VLPでのv1 BE-VLPおよびv4 BE-eVLP)またはn=4マウス(7×10^{11} eVLPでのv4 BE-eVLP)についての、個々のデータ点および平均±標準誤差として示される。

【0052】

図6Cは、 7×10^{11} のv4 BE-eVLPの全身注射後のマウスの心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、および脾臓におけるPcsk9エクソン1スプライスドナーにおける、アデニン塩基編集

50

効率を要約するグラフである。データは、個々のデータ点および $n=4$ マウス(処置)または $n=3$ マウス(未処置)についての平均±標準誤差として示される。

【0053】

【図6D】図6Dは、v4 BE-eVLP処置マウス、AAV処置マウス、および未処置マウスの肝臓からの14個のCIRCLE-seq指定オフターゲット遺伝子座についてのプロトスペーサ4~10位内における、A・T→G・C突然変異を含有するDNA配列決定リードの定量化を要約するグラフである。データは、個々のデータ点および平均±標準誤差として、 $n=4$ マウス(BE-eVLP)、 $n=5$ マウス(AAV)、または $n=3$ マウス(未処置)について示される。vg=ウイルスゲノム。

【0054】

【図6E】図6Eは、ELISAによって測定される血清Pcsk9レベルの定量化を要約するグラフである。データは、個々のデータ点および $n=4$ マウス(処置)または $n=3$ マウス(未処置)についての平均±標準誤差として示される。

【0055】

【図7A】図7Aは、R44X突然変異を包囲するRpe65エクソン3の概略図であり(概略図中で標識され、灰色で示されている)、これは、プロトスペーサの位置A6でのA・T→G・C変換によって補正されることができる(概略図中で標識され、下線が引かれている;イタリック体のPAM配列(AGT))。示されている配列(上から下)は配列番号5~6に対応する。

【0056】

【図7B-C】図7Bは、網膜下注射の概略図である。注射の5週間後、表現型レスキューは、ERGを介して評価され、続いて組織は、配列決定のために採取された。

【0057】

図7Cは、rd12マウスから採取されたゲノムDNAにおけるプロトスペーサの位置A3、位置A6、および位置A8における、アデニン塩基編集効率を要約するグラフである。データは、 $n=6$ マウス(両処置群)または $n=4$ マウス(未処置)について、個々のデータ点および平均±標準誤差として示される。

【0058】

【図7D-E】図7Dは、処置されたrd12マウスから採取されたゲノムDNAの対立遺伝子頻度分布を要約するグラフである。データは $n=6$ マウスについての平均±標準誤差として示される。8e-LV=ABE8e-NG-LV、8e-eVLP=v4 ABE8e-NG-eVLP。

【0059】

図7Eは、一晩の暗順応後にERGによって測定された、暗所a波およびb波振幅を要約するグラフである。データは、 $n=8$ マウス(野生型)、 $n=6$ マウス(ABE8e-NG-LVおよびv4 ABE8e-NG-eVLP)、または $n=4$ マウス(未処置)について、個々のデータ点および平均±標準誤差として示される。

【0060】

【図7F-G】図7Fは、rd12マウスから採取されたゲノムDNAにおけるプロトスペーサの位置A3、位置A6、および位置A8における、アデニン塩基編集効率を要約するグラフである。データは、 $n=6$ マウス(v4 ABE7.10-NG-eVLP)または $n=4$ マウス(ABE7.10-NG-LVおよび未処置)について、個々のデータ点および平均±標準誤差として示される。P値は両側t検定を用いて計算された。

【0061】

図7Gは、処置されたrd12マウスから採取されたゲノムDNAの対立遺伝子頻度分布を要約するグラフである。データは、 $n=6$ マウス(v4 ABE7.10-NG-eVLP)または $n=4$ マウス(ABE7.10-NG-LVおよび未処置)について、平均±標準誤差として示される。7.10-LV=ABE7.10-NG-LV、7.10-eVLP=v4 ABE7.10-NG-eVLP。

【0062】

【図7H-I】図7Hは、一晩の暗順応後にERGによって測定された、暗所a波およびb波振幅を要約するグラフである。データは、個々のデータ点および平均±標準誤差として、 $n=8$ マウス(野生型)、 $n=7$ マウス(v4 ABE7.10-NG-eVLP)、 $n=5$ マウス(ABE7.10-

10

20

30

40

50

NG-LV)、またはn=4マウス(未処置)に対して示されている。P値は両側t検定を用いて計算された。

【0063】

図7Iは、野生型マウス、未処置マウス、v4 ABE7.10-NG-eVLP処置マウス、およびABE7.10-NG-LV処置マウスのRPE組織からのタンパク質抽出物のウェスタンブロットの画像を示す。

【0064】

【図7J】図7Jは、野生型マウス、未処置マウス、ABE7.10-NG-LV処置マウス、およびv4 ABE7.10-NG-eVLP処置マウスの代表的なERG波形を示す。

【0065】

【図8A-B】図8Aは、VLP生産の検証のための、抗Cas9、抗p30、および抗VSV-G抗体を用いた精製BE-VLPからのタンパク質の免疫ブロット分析の画像を示す。

【0066】

図8Bは、HEK293T細胞におけるBCL11Aエンハンサ部位の位置A7における、v1 BE-VLPのアデニン塩基編集効率を要約するグラフである。値およびエラーバーは、n=3の独立した生物学的反復の平均±標準誤差を反映する。データは、非線形回帰を用いて4パラメータロジスティック曲線に当てはめられた。

【0067】

【図8C】図8Cは、gag構造タンパク質へ融合されたABE8eを有する未成熟BE-VLPの概略図である。様々なMMLVプロテアーゼ切断部位は、gagとABE8eとの間に挿入されて、タンパク質分解ビリオン成熟中のgagからのABE8eの遊離を促す最適な切断可能配列を決定した。矢印は切断部位を指し示す。示されている配列は、PRSSLY(配列番号7)、PALTP(配列番号8)、VQAL(配列番号9)、VLTQ(配列番号10)、PLQVL(配列番号11)、TLNIERR(配列番号12)、TSTLL(配列番号13)、およびMENSS(配列番号14)である。

【0068】

【図8D-E】図8Dは、精製v2 BE-eVLPバリエーションにおける切断されたABE8e対完全長gag-ABE8eを評価するウェスタンブロットの代表的な画像を示す。

【0069】

図8Eは、ウェスタンブロットからの切断されたABE8e分画のデンストメトリーベースの定量を要約するグラフである。データは、個々のデータ点および平均値±標準誤差として、n=3回の技術的反復に対して示される。

【0070】

【図9A】図9Aは、v2.4およびv3のBE-eVLP構築物の概略図を示す。3つのHIV NESは、gag-ABE融合のC末端またはN末端のいずれかへと融合された。プロテアーゼ切断可能リンカーは、最終BEカーゴがタンパク質分解性ビリオン成熟後にNESを欠如するように、ABE配列とNES配列との間に組み込まれた。示されている配列は、TSTLL(配列番号13)、MENSS(配列番号14)、MSKLL(配列番号15)、ATVVS(配列番号16)、PLQVL(配列番号11)、TLNIERR(配列番号12)、IRKIL(配列番号17)、およびFLDG(配列番号18)である。

【0071】

【図9B-C】図9Bは、v2.4 gag-ABE構築物またはv3.4 gag-3 xNES-ABE構築物でトランスフェクトされた生産細胞の代表的な免疫蛍光画像を示す。トランスフェクションの48時間後、細胞は、パラホルムアルデヒドで固定され、提供された説明文に示されるように、細胞骨格を染色するための抗チューブリン抗体、核染色のためのDAPI、およびgag-ABE融合を可視化するための抗Cas9抗体で染色された。スケールバーは50 μmを表示する。

【0072】

図9Cは、v2.4 gag-ABE構築物またはv3.4 gag-3 xNES-ABE構築物の細胞質内局在の自動画像分析ベースの定量を要約するグラフを示す。データは、個々のデータ点およ

10

20

30

40

50

び平均値±標準誤差として、 $n=3$ 回の技術的反復に対して示される。P値は両側t検定を用いて計算された。

【0073】

【図10A-C】図10Aは、v4 BE-eVLPの代表的な陰性染色透過型電子顕微鏡写真(TEM)を示す。スケールバーは200nmを表示する。

【0074】

図10B～図10Cは、抗Cas9または抗MLV(p30)ELISAによって測定された、v1、v2.4、v3.4、およびv4 BE-eVLPのタンパク質含有量の定量を示す。データは、個々のデータ点および平均値±標準誤差として、 $n=3$ 回の技術的反復に対して示される。

【0075】

【図10D-G】図10Dは、HEK293T細胞におけるBCL11Aエンハンサ部位において、編集効率を、粒子数正規化v1、v2.4、v3.4、およびv4 BE-VLPと比較するグラフを示す。データは、平均値±標準誤差として、 $n=3$ の生物学的反復に対して示される。

【0076】

図10Eは、HEK293T細胞およびNIH 3T3線維芽細胞のv4 BE-eVLP処置後の細胞生存率を要約するグラフを示す。データは、平均値±標準誤差として、 $n=3$ の生物学的反復に対して示される。

【0077】

図10Fは、HEK293T細胞におけるEMX1遺伝子座でv1 Cas9-VLPおよびv4 Cas9-eVLPによって産生されたインデル頻度を要約するグラフである。データは、平均値±標準誤差として、 $n=3$ の生物学的反復に対して示される。データは、非線形回帰を用いて4パラメータロジスティック曲線に当てはめられた。

【0078】

図10Gは、Neuro-2a細胞または3T3線維芽細胞におけるVSV-Gシュードタイプ化v4 BE-eVLPのアデニン塩基編集効率を要約するグラフを示す。データは、個々のデータ点および平均値±標準誤差として、 $n=3$ 回の生物学的反復に対して示される。

【0079】

【図11A】図11Aは、直交Rループアッセイの実験タイムラインを示す。

【0080】

【図11B-C】図11Bは、直交Rループ実験のためのオンターゲット編集制御を要約するグラフである。データは、個々のデータ点および平均値±標準誤差として、 $n=3$ 回の生物学的反復に対して示される。

【0081】

図11Cは、RDEB線維芽細胞のv4 BE-eVLP処置後の細胞生存率を要約するグラフである。データは、平均値±標準誤差として、 $n=3$ の生物学的反復に対して示される。

【0082】

【図11D】図11Dは、v4-BE-eVLP処置RDEB患者由来線維芽細胞のゲノムDNAから以前に同定された10個のオフターゲット遺伝子座について、プロトスペサ4～10位以内にA・T→G・Cへの突然変異を含有するDNA配列決定リードを定量するグラフである。灰色の点線は、観察された最も高いバックグラウンド突然変異率0.1%を表す。データは、個々のデータ点および平均値±標準誤差として、 $n=3$ 回の生物学的反復に対して示される。

【0083】

【図12】図12A～図12Bは、図5A～図5Bに関連した、P0 ICV注射後のマウス脳からの核選別のためのフローサイトメトリ分析を示す。図12Aは、代表的なフローサイトメトリグラフを示す。シングレット核は、FSC/BSC比およびDyeCycle Rubyシグナルに基づいてゲーティングされた。1行目は、GFP陰性試料に対するゲーティング戦略を実証している。バルク核は、シングレット核のゲートDを通過した事象に対応する。図12Bは、P0 ICV注射後にフローサイトメトリによって測定されたGFP陽性核のパーセンテージを要約するグラフである。データは、平均値±標準誤差として、 $n=3$ の生物学

10

20

30

40

50

的反復に対して示される。

【0084】

【図13】図13Aは、v4 BE-eVLP注射の1週間後の血漿アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)およびアラニントランスアミナーゼ(ALT)レベルを要約するグラフを示す。

【0085】

図13B～図13Cは、(図13B)未処置マウスおよび(図13C)v4 BE-eVLP処置マウスの注射から1週間後の肝臓のヘマトキシリンおよびエオシン染色による組織病理学的評価の代表的な画像を示す。各々の代表的な例が示される。スケールバーは50 μmを表示する。

【0086】

【図14A】図14A～図14Cは、v4 BE-eVLPまたはレンチウイルス処置後のRPE cDNAの配列決定分析の結果を示す。図14Aは、v4 BE-eVLPおよびレンチウイルス処置が、Rpe65転写物の標的アデニン(A6)において50～60%のA・T→G・C変換をもたらしたことを示す。データは、個々のデータ点および平均値±標準誤差として、n=6(ABE8e-NG-LV、ABE8e-NG-eVLP、およびABE7.10-NG-eVLP)、またはn=4(ABE7.10-NG-LVおよび未処置)反復に対して示される。

【図14B】図14B～図14Cは、Mcm3ap(図14B)およびPerp(図14C)転写物のハイスループット配列決定によって測定された場合の、v4 BE-eVLPおよびレンチウイルスによるオフターゲットA→G RNA編集を示す。データは、個々のデータ点および平均値±標準誤差として、n=6(ABE8e-NG-LV、ABE8e-NG-eVLP、およびABE7.10-NG-eVLP)、またはn=4(ABE7.10-NG-LVおよび未処置)反復に対して示される。

【図14C】図14B～図14Cは、Mcm3ap(図14B)およびPerp(図14C)転写物のハイスループット配列決定によって測定された場合の、v4 BE-eVLPおよびレンチウイルスによるオフターゲットA→G RNA編集を示す。データは、個々のデータ点および平均値±標準誤差として、n=6(ABE8e-NG-LV、ABE8e-NG-eVLP、およびABE7.10-NG-eVLP)、またはn=4(ABE7.10-NG-LVおよび未処置)反復に対して示される。

【発明を実施するための形態】

【0087】

詳細な記載

本明細書に開示されるいくつかの方法の実施は、特に明記しない限り、当業者の技能の範囲内である、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクス、および組換えDNAの従来技術を採用する。例えば、Sambrook and Green, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th Edition (2012); the series Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds.); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.), PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6th Edition (R.I. Freshney, ed. (2010))を参照されたい。

【0088】

定義

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」という単数形は、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除き、複数の指示対象を包含する。例えば、「キメラ膜貫通受容体ポリペプチド」という用語は、複数のキメラ膜貫通受容体ポリペプチドを包含する。

【0089】

「約(about)」または「およそ(approximately)」という用語は、当業者によって決定される特定の値の許容可能な誤差範囲内を意味し、これは、値がどのように測定または決定されるか、すなわち測定システムの制限に部分的に依存する。例えば、「約」は、当技術分野の慣例に従って、1標準偏差以内または1標準偏差を超えることを意味すること

10

20

30

40

50

ができる。あるいは、「約」は、所与の値の最大20%まで、最大10%まで、最大5%まで、または最大1%までの範囲を意味することができる。あるいは、特に生物システムまたはプロセスに関連して、この用語は、ある値の1桁以内、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内を意味することができる。特定の値が本出願および特許請求の範囲に記載されている場合、特に明記しない限り、「約」という用語は、特定の値に対して許容可能な誤差範囲内を意味すると仮定されるべきである。

【0090】

本明細書において使用される場合、「細胞」は、概して、生体細胞を指すことができる。細胞は、生存生物の基本的な構造、機能、および/または生物学的単位であることができる。細胞は、1以上の細胞を有するあらゆる生物に起源を持つことができる。いくつかの非限定的な例は、原核細胞、真核細胞、細菌細胞、古細菌細胞、単細胞真核生物の細胞、原虫細胞、植物由来の細胞(一例として、植物作物、果実、野菜、穀物、ダイズ、トウモロコシ、メイズ(maize)、コムギ、種子、トマト、イネ、キャッサバ、サトウキビ、カボチャ、乾草、ジャガイモ、ワタ、大麻、タバコ、顕花植物、針葉樹、裸子植物、シダ、ヒカゲノカズラ類、ツノゴケ類、ゼニゴケ、コケ)、藻類細胞(一例として、*Botryococcus braunii*、*Chlamydomonas reinhardtii*、*Nannochloropsis gaditana*、*Chlorella pyrenoidosa*、*Sargassum patens* C.Agardh、および同様のもの)、海藻(一例として、ケルプ)、真菌細胞(一例として、酵母細胞、マッシュルームからの細胞)、動物細胞、無脊椎動物からの細胞(一例として、ショウジョウバエ、刺胞動物、棘皮動物、線形動物等)、脊椎動物からの細胞(一例として、魚、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物)、哺乳動物の細胞(一例として、ブタ、雌ウシ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯類、ラット、マウス、非ヒト霊長類、ヒト等)などを包含する。細胞は、天然の生物に由来しないときがある(一例として、細胞は、人工細胞と呼ばれることもある、合成的に作製されたものであることができる)。

【0091】

「抗原」という用語は、本明細書において使用される場合、選択的結合剤によって結合されることが可能である分子またはその断片を指す。例としては、抗原は、受容体などの選択的結合剤によって結合されることができリガンドであることができる。別の例として、抗原は、免疫学的タンパク質(一例として、抗体)などの選択的結合剤によって結合されることができ、抗原性分子であることができる。抗原はまた、その抗原へ結合することが可能である抗体を生産するために動物において使用されることが可能である分子またはその断片を指すことができる。

【0092】

「抗体」という用語は、本明細書において使用される場合、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子を指す。抗体という用語は、抗体(一例として、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体)、ならびにその誘導体、バリエーション、および断片を包含する。抗体は、異なるクラス(すなわち、IgA、IgG、IgM、IgD、およびIgE)、およびサブクラス(例を挙げるなら、IgG1、IgG2等)の免疫グロブリン(Ig)を包含するが、これらに限定されない。その誘導体、バリエーション、または断片は、対応する抗体の結合特異性(一例として、完全および/または部分的)を保持する機能性誘導体または断片を指すことができる。抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、可変断片(Fv)、単鎖可変断片(scFv)、ミニボディ、ダイアボディ、および単ドメイン抗体(「sdAb」または「ナノボディ」または「ラクダ類」)を包含する。抗体という用語は、抗体、および最適化された、操作された、または化学的にコンジュゲートされた抗体の抗原結合断片を包含する。最適化されている抗体の例は、親和性成熟抗体を包含する。操作された抗体の例は、Fc最適化抗体(一例として、断片結晶化可能領域において最適化された抗体)および多重特異性抗体(一例として、二重特異性抗体)を包含する。

【0093】

「ヌクレオチド」という用語は、本明細書において使用される場合、概して、塩基-糖-リン酸の組合せを指す。ヌクレオチドは合成ヌクレオチドを含むことができる。ヌクレオ

10

20

30

40

50

チドは合成ヌクレオチド類似体を含むことができる。ヌクレオチドは、核酸配列の単量体単位(一例として、デオキシリボ核酸(DNA)およびリボ核酸(RNA))であることができる。ヌクレオチドという用語は、リボヌクレオシド三リン酸アデノシン三リン酸(ATP)、ウリジン三リン酸(UTP)、シトシン三リン酸(CTP)、グアノシン三リン酸(GTP)、およびデオキシリボヌクレオシド三リン酸、例を挙げるなら、dATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTP、またはそれらの誘導体などを包含することができる。そのような誘導体は、例えば、 $[\alpha S]$ dATP、7-デアザ-dGTPおよび7-デアザ-dATP、ならびにそれらを含有する核酸分子にヌクレアーゼ耐性を付与するヌクレオチド誘導体を包含することができる。本明細書において使用される場合、ヌクレオチドという用語は、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸(ddNTP)およびそれらの誘導体を指すことができる。ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸の実例は、限定されないが、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddITP、およびddTTPを包含することができる。ヌクレオチドは、非標識であることができるか、または周知の技術によって検出可能に標識されることができる。標識化はまた、量子ドットを用いて実行されることができる。検出可能な標識は、例えば、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、および酵素標識を包含することができる。ヌクレオチドの蛍光標識は、フルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、2'7'-ジメトキシ-4'5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)、ローダミン、6-カルボキシローダミン(R6G)、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、4-(4'ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸(DABCYL)、Cascade Blue、Oregon Green、Texas Red、シアニン、および5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS)を包含することができるが、これらに限定されない。蛍光標識ヌクレオチドの具体例は、Perkin Elmer、Foster City、Califより入手可能な[R6G]dUTP、[TAMRA]dUTP、[R110]dCTP、[R6G]dCTP、[TAMRA]dCTP、[JOE]ddATP、[R6G]ddATP、[FAM]ddCTP、[R110]ddCTP、[TAMRA]ddGTP、[ROX]ddTTP、[dR6G]ddATP、[dR110]ddCTP、[dTAMRA]ddGTP、および[dROX]ddTTPと;Amersham、Arlington Heights、Ill.より入手可能なFluoroLink DeoxyNucleotides、FluoroLink Cy3-dCTP、FluoroLink Cy5-dCTP、FluoroLink Fluor X-dCTP、FluoroLink Cy3-dUTP、およびFluoroLink Cy5-dUTPと;Boehringer Mannheim、Indianapolis、Ind.より入手可能なFluorescein-15-dATP、Fluorescein-12-dUTP、Tetramethyl-rhodamine-6-dUTP、IR770-9-dATP、Fluorescein-12-ddUTP、Fluorescein-12-UTP、およびFluorescein-15-2'-dATPと;Molecular Probes、Eugene、Oreg.より入手可能なChromosome Labeled Nucleotides、BODIPY-FL-14-UTP、BODIPY-FL-4-UTP、BODIPY-TMR-14-UTP、BODIPY-TMR-14-dUTP、BODIPY-TR-14-UTP、BODIPY-TR-14-dUTP、Cascade Blue-7-UTP、Cascade Blue-7-dUTP、fluorescein-12-UTP、fluorescein-12-dUTP、Oregon Green 488-5-dUTP、Rhodamine Green-5-UTP、Rhodamine Green-5-dUTP、tetramethylrhodamine-6-UTP、tetramethylrhodamine-6-dUTP、Texas Red-5-UTP、Texas Red-5-dUTP、およびTexas Red-12-dUTPと、を包含することができる。ヌクレオチドはまた、化学修飾によって標識またはマーキングされることができる。化学修飾された単一ヌクレオチドはビオチン-dNTPであることができる。ビオチン化dNTPのいくつかの非限定的な例は、ビオチン-dATP(一例として、bio-N6-ddATP、ビオチン-14-dATP)、ビオチン-dCTP(一例として、ビオチン-11-dCTP、ビオチン-14-dCTP)、およびビオチン-dUTP(一例として、ビオチン-11-dUTP、ビオチン-16-dUTP、ビオチン-20-dUTP)を包含することができる。

【0094】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」、および「核酸分子」という用語は、あらゆる長さのヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、またはそれらの類似体のポリマー形態、単ストランド形態、二重ストランド形態、または多ストランド形態のいずれかを指すために互換的に使用される。ポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドは、細胞に対して外来性または内在性であることができる。ポリヌクレオチドは無細胞環境に存在することができる。ポリヌクレオチドは遺伝子またはその断片であることができる。ポリヌクレオチドはDNAであることができる。ポリヌクレオチドはRNAであることができる。ポリヌクレオチドは、あらゆる三次元構造を有することができる、かつ既知または未知のあらゆる機能を実施することができる。ポリヌクレオチドは、1以上の類似体(一例として、変更された骨格、糖、または核酸塩基)を含むことができる。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーのアセンブリの前または後に分け与えられることができる。類似体のいくつかの非限定的な例は、5-プロモウラシル、ペプチド核酸、異種核酸、モルホリノ、ロックド核酸、グリコール核酸、トレオース核酸、ジデオキシヌクレオチド、コルジセピン、7-デアザ-GTP、フルオロフォア(一例として、糖へ連結されたローダミンまたはフルオレセイン)、チオール含有ヌクレオチド、ビオチン結合ヌクレオチド、蛍光塩基類似体、CpGアイランド、メチル-7-グアノシン、メチル化ヌクレオチド、イノシン、チオウリジン、シュードウリジン、ジヒドロウリジン、キューオシン、およびワイオシンを包含する。ポリヌクレオチドの非限定的な例は、遺伝子または遺伝子断片のコード領域または非コード領域、連鎖分析から定義される遺伝子座(単数)(遺伝子座(複数))、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、転移RNA(tRNA)、リボソームRNA(rRNA)、短干渉RNA(siRNA)、ショートヘアピンRNA(shRNA)、マイクロRNA(miRNA)、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、あらゆる配列の単離されたDNA、あらゆる配列の単離されたRNA、無細胞DNA(cfDNA)および無細胞RNA(cfRNA)を含む無細胞ポリヌクレオチド、核酸プローブ、およびプライマーを包含する。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド構成要素によって中断されることができる。

10

20

30

40

50

【0095】

「遺伝子」という用語は、本明細書において使用される場合、RNA転写物のコードに関与する、核酸(一例として、DNA、例を挙げるならゲノムDNAおよびcDNA)ならびにその対応するヌクレオチド配列を指す。ゲノムDNAに関連して本明細書において使用される用語は、介在する非コード領域および調節領域を含み、5'末端(5' end)および3'末端(3' end)を包含することができる。いくつかの使用において、この用語は、5'および3'非翻訳領域(5'-UTRおよび3'-UTR)、エクソンおよびイントロンを包含する転写配列を網羅する。いくつかの遺伝子において、転写領域は、ポリペプチドをコードする「オープン・リーディング・フレーム」を含有する。この用語のいくつかの使用において、「遺伝子」は、ポリペプチドをコードするのに必要なコード配列(一例として、「オープン・リーディング・フレーム」または「コード領域」)のみを含む。いくつかの場合において、遺伝子は、ポリペプチド、例えば、リボソームRNA遺伝子(rRNA)および転移RNA(tRNA)遺伝子をコードしない。いくつかの場合において、「遺伝子」という用語は、転写配列だけでなく、上流および下流の調節領域、エンハンサ、ならびにプロモータを包含する非転写領域もまた包含する。遺伝子は、「内在性遺伝子」または生物のゲノム内の天然の場所にあるネイティブ遺伝子を指すことができる。遺伝子は、「外来遺伝子」または非ネイティブ遺伝子を指すことができる。非ネイティブ遺伝子とは、宿主生物には通常見られないが、遺伝子転移によって宿主生物へと導入される遺伝子を指すことができる。非ネイティブ遺伝子はまた、生物のゲノム内のその天然の場所にはない遺伝子を指すことができる。非ネイティブ遺伝子はまた、突然変異、挿入、および/または欠失(一例として、非ネイティブ配列)を含む、天然に存在する核酸またはポリペプチド配列を指すこともできる。

【0096】

「標的ポリヌクレオチド」および「標的核酸」という用語は、本明細書において使用される場合、本開示のカーゴによって標的化される核酸またはポリヌクレオチドを指す。標的ポリヌクレオチドは、DNA(一例として、外来性または内在性)であることができる。DNAは、DNAテンプレートからmRNAの転写を調節する、mRNA転写物および/または様々な調節領域を産生するテンプレートを指すことができる。標的ポリヌクレオチドは、よ

り大きなポリヌクレオチドの一部、例えば染色体または染色体の領域であることができる。標的ポリヌクレオチドは、染色体外配列(一例として、エピソード配列、ミニサークル配列、ミトコンドリア配列、葉緑体配列等)、または染色体外配列の領域を指すことができる。標的ポリヌクレオチドはRNAであることができる。RNAは、例えば、タンパク質をコードするテンプレートとして働くことができる、mRNAであることができる。RNAを含む標的ポリヌクレオチドは、mRNAテンプレートからのタンパク質の翻訳を調節する様々な調節領域を包含することができる。標的ポリヌクレオチドは、遺伝子産物(一例として、RNA転写物をコードするDNA、もしくはタンパク質産物をコードするRNA)をコードすることができるか、または遺伝子産物の発現を調節する調節配列を含むことができる。一般に、「標的配列」という用語は、標的核酸の単ストランド上の核酸配列を指す。標的配列は、遺伝子、調節配列、ゲノムDNA、cfDNAを包含する無細胞核酸および/またはcfRNA、cDNA、融合遺伝子、およびmRNA、miRNA、rRNAなど包含するRNA、ならびに他のものの一部であることができる。標的ポリヌクレオチドは、カーゴによって標的化される場合、遺伝子発現および/または活性の変更をもたらすことができる。標的ポリヌクレオチドは、カーゴによって標的化される場合、編集された核酸配列をもたらすことができる。標的核酸は、単一ヌクレオチド置換によって核酸試料中のあらゆる他の配列に関連し得ない核酸配列を含むことができる。標的核酸は、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個ヌクレオチド置換によって核酸試料中のあらゆる他の配列に関連し得ない核酸配列を含むことができる。いくつかの態様において、置換は、標的核酸の5'末端の5、10、15、20、25、30、または35ヌクレオチド以内では起こらない場合がある。いくつかの態様において、置換は、標的核酸の3'末端の5、10、15、20、25、30、35ヌクレオチド以内では起こらない場合がある。

10

20

30

40

50

【0097】

「発現」という用語は、ポリヌクレオチドがDNAテンプレートから(mRNAまたは他のRNA転写物などへと)転写される1以上のプロセス、および/または転写されたmRNAが続いてペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質へと翻訳されるプロセスを指す。転写物およびコードされたポリペプチドは、集合的に「遺伝子産物」と称されることができる。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを包含することができる。発現に関して「上方調節される(Up-regulated)」とは、概して、野生型状態でのその発現レベルと比較して増加したポリヌクレオチド(一例として、mRNAなどのRNA)および/またはポリペプチド配列の発現レベルを指し、一方で、「下方調節される(down-regulated)」とは、概して、野生型状態でのその発現と比較して減少したポリヌクレオチド(一例として、mRNAなどのRNA)および/またはポリペプチド配列の発現レベルを指す。

【0098】

「補体(complement)」、「補体(complements)」、「相補的(complementary)」、および「相補性(complementarity)」という用語は、本明細書において使用される場合、概して、所与の配列に対して完全に相補的であり、かつハイブリダイズ可能な配列を指す。いくつかの場合において、所与の核酸とハイブリダイズした配列は、所与の領域にわたるその塩基配列がその結合パートナーのものと相補的に結合することが可能であり、例えば、A-T、A-U、G-C、およびG-U塩基対が形成される場合、所与の分子の「補体」または「逆補体(reverse-complement)」と称される。一般に、第2の配列へハイブリダイズ可能な第1の配列は、第2の配列へ特異的または選択的にハイブリダイズ可能であり、その結果、第2の配列または第2の配列のセットへのハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション反応中の非標的配列とのハイブリダイゼーションのために好ましい(一例として、当該技術分野で一般的に使用されるストリンジェントな条件などの所与の条件セットの下において熱力学的により安定である)。典型的には、ハイブリダイズ可能な配列は、それらのそれぞれの長さの全部または一部にわたって、25%~100%の相補性(少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%、99%、および100%の配列相補性を包含する)などの配列相補性の程度を共有する。相補性パーセントを評価する目的など配列同一性は、Needleman-Wunschアルゴリズム(一例として、www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.htmlから入手可能なEMBOSS Needle aligner、任意にデフォルト設定を参照されたい)、BLASTアルゴリズム(一例として、BLAST alignment tool available at blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgiで入手可能なBLAST alignment tool、任意にデフォルト設定を参照されたい)、またはSmith-Watermanアルゴリズム(一例として、www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.htmlで利用可能なEMBOSS Water aligner、任意にデフォルト設定を参照されたい)を包含するが、これらに限定されない、あらゆる好適なアラインメントアルゴリズムによって測定されることができる。最適なアラインメントは、デフォルトパラメータを包含する、選ばれたアルゴリズムのあらゆる好適なパラメータを用いて評価されることができる。

10

【0099】

相補性は、完全または実質的/充分であることができる。2つの核酸間の完全な相補性は、2つの核酸が、二重鎖中の全ての塩基がワトソン・クリック対合によって相補的な塩基に結合されている二重鎖を形成することができることを意味することができる。実質的または十分な相補性は、一方のストランドの配列が対向するストランドの配列と完全におよび/または完全に相補的ではないが、しかし、十分な結合が2本のストランドの塩基間で発生して、ハイブリダイゼーション条件のセット(一例として、塩濃度および温度)において安定なハイブリッド複合体を形成することを意味することができる。そのような条件は、ハイブリダイズしたストランドのT_mを予測するために配列および標準的な数学的計算を使用することによって、または日常的な方法を使用することによるT_mの経験的決定によって、予測されることができる。

20

【0100】

発現または活性に関連する「調節すること(regulating)」という用語は、本明細書において使用される場合、発現または活性のレベルを変更させることを指す。調節は、転写レベル、転写後レベル、翻訳レベル、および/または翻訳後レベルで発生することができる。

【0101】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は、ペプチド結合(複数可)によって接合された(joined)少なくとも2つのアミノ酸残基のポリマーを指すように互換的に本明細書において使用される。この用語は、特定の長さのポリマーを暗示するものではなく、ペプチドが、組換え技術、化学合成、または酵素合成を用いて生産されるか、または天然に存在するかのいずれかを暗示または区別することが意図されるものでもない。この用語を、天然に存在するアミノ酸ポリマー、および少なくとも1つの修飾アミノ酸を含むアミノ酸ポリマーへ適用する。いくつかの場合において、ポリマーは、非アミノ酸によって中断されることができる。用語は、全長タンパク質、ならびに二次構造および/または三次構造(一例として、ドメイン)を有するまたは有しないタンパク質を包含する、あらゆる長さのアミノ酸鎖を包含する。用語はまた、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、酸化、および標識構成要素とのコンジュゲーションなどのあらゆる他の操作によって修飾された、アミノ酸ポリマーを網羅する。「アミノ酸(amino acid)」および「アミノ酸(amino acids)」という用語は、本明細書において使用される場合、概して、修飾アミノ酸およびアミノ酸類似体を包含するが、これらに限定されない、天然アミノ酸および非天然アミノ酸を指す。修飾アミノ酸は、天然アミノ酸および非天然アミノ酸を包含することができ、これらは、アミノ酸上に天然に存在しない基または化学部分を包含するように化学修飾されている。アミノ酸類似体は、アミノ酸誘導体を指すことができる。「アミノ酸」という用語は、D-アミノ酸およびL-アミノ酸の両方を包含する。

30

40

【0102】

「バリエーション」という用語は、ポリペプチドに関して本明細書において使用される場合

50

、例えば、アミノ酸配列、構造(一例として、二次および/もしくは三次)、活性(一例として、酵素活性)、ならびに/または機能のいずれかによって、野生型ポリペプチドに関連するが、しかし同一ではないポリペプチドを指す。バリエーションは、野生型ポリペプチドと比較して、1以上のアミノ酸変動(一例として、突然変異、挿入、および欠失)、トランケーション、修飾、またはそれらの組合せを含む、ポリペプチドを包含する。バリエーションは、野生型ポリペプチドの誘導体および野生型ポリペプチドの断片もまた包含する。

【0103】

「パーセント(%)同一性」という用語は、本明細書において使用される場合、最大の同一性パーセント(すなわち、最適なアラインメントのために候補配列および参照配列の一方または両方にギャップが導入されることができ、比較目的のために非相同配列は無視されることができる)を達成するために配列をアラインさせ、必要に応じてギャップを導入した後の、参照配列のアミノ酸(または核酸)残基と同一である候補配列のアミノ酸(または核酸)残基のパーセンテージを指す。同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、実例としては、BLAST、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを用いて、当業者の技能の範囲内である様々な方法で達成されることができる。2つの配列の同一性パーセントは、BLASTを用いて試験配列を比較配列とアラインさせ、比較配列の同じ位置のアミノ酸またはヌクレオチドと同一であるアラインされた試験配列中のアミノ酸またはヌクレオチドの数を決定し、かつ同一のアミノ酸またはヌクレオチドの数を比較配列中のアミノ酸またはヌクレオチドの数で割ることによって、計算されることができる。

【0104】

本明細書において言及されるCasタンパク質は、タンパク質またはポリペプチドの一種であることができる。Casタンパク質は、ヌクレアーゼを指すことができる。Casタンパク質は、エンドリボヌクレアーゼを指すことができる。Casタンパク質は、Casタンパク質のあらゆる修飾(一例として、短縮、突然変異、延長)ポリペプチド配列またはホモログを指すことができる。Casタンパク質は、コドン最適化されることができる。Casタンパク質は、Casタンパク質のコドン最適化ホモログであることができる。Casタンパク質は、酵素的に不活性、部分的に活性、構成的に活性、完全に活性、誘導可能な活性、および/またはより活性であることができる(一例として、タンパク質またはポリペプチドの野生型ホモログよりも多い)。Casタンパク質は、II型Casタンパク質であることができる。Casタンパク質は、Cas9であることができる。Casタンパク質は、V型Casタンパク質であることができる。Casタンパク質は、Cpf1またはCas12aであることができる。Casタンパク質は、C2c1であることができる。Casタンパク質は、C2c3であることができる。Casタンパク質は、VI型Casタンパク質であることができる。Casタンパク質は、C2c2またはCas13aであることができる。Casタンパク質は、Cas13bであることができる。Casタンパク質は、Cas13cであることができる。Casタンパク質は、Cas13dであることができる。Casタンパク質は、Cas14であることができる。Casタンパク質(一例として、バリエーション、突然変異した、酵素的に不活性な、および/または条件的に酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチド)は、標的核酸へと結合することができる。Casタンパク質(一例として、バリエーション、突然変異した、酵素的に不活性な、および/または条件的に酵素的に不活性なエンドリボヌクレアーゼ)は、標的RNAまたはDNAへ結合することができる。

【0105】

「crRNA」という用語は、本明細書において使用される場合、概して、野生型の例示的なcrRNA(一例として、*S.pyogenes*からのcrRNA)と、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の配列同一性および/または配列類似性を有する核酸を指すことができる。crRNAは、概して、野生型の例示的なcrRNA(一例として、*S.pyogenes*、*S.aureus*等からのcrRNA)と、最大で約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の配列同一性および/または配列類似性を有する核酸を指すことができる。crRNAは、欠失、

挿入、もしくは置換、バリエーション、突然変異、またはキメラなどのヌクレオチド変化を含むことができるcrRNAの修飾形態を指すことができる。crRNAは、少なくとも6つの連続するヌクレオチドのストレッチにわたって野生型の例示的crRNA(一例として、*S.pyogenes*、*S.aureus*等からのcrRNA)配列と、少なくとも約60%の配列同一性を有する核酸であることができる。例えば、crRNA配列は、少なくとも6つの連続するヌクレオチドのストレッチにわたって、野生型の例示的crRNA配列(一例として、*S.pyogenes*、*S.aureus*等からのcrRNA)と、少なくとも約60%同一、少なくとも約65%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約75%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約85%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、または100%同一であることができる。

10

【0106】

「tracrRNA」という用語は、本明細書において使用される場合、概して、野生型の例示的なtracrRNA配列(一例として、*S.pyogenes*からのtracrRNA)と、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の配列同一性および/または配列類似性を有する核酸を指すことができる。tracrRNAは、野生型の例示的tracrRNA配列(一例として、*S.pyogenes*、*S.aureus*等からのtracrRNA)と、最大で約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の配列同一性および/または配列類似性を有する核酸を指すことができる。tracrRNA配列は、欠失、挿入、もしくは置換、バリエーション、突然変異、またはキメラなどのヌクレオチド変化を含むことができるtracrRNAの修飾形態を指すことができる。tracrRNAは、少なくとも6つの連続するヌクレオチドのストレッチにわたって野生型の例示的tracrRNA(一例として、*S.pyogenes*、*S.aureus*等からのtracrRNA)配列と、少なくとも約60%同一であることができる核酸を指すことができる。例えば、tracrRNA配列は、少なくとも6つの連続するヌクレオチドのストレッチにわたって、野生型の例示的tracrRNA(一例として、*S.pyogenes*、*S.aureus*等からのtracrRNA)配列と、少なくとも約60%同一、少なくとも約65%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約75%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約85%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、または100%同一であることができる。

20

【0107】

本明細書において使用される場合、「ガイド核酸」は、別の核酸へハイブリダイズすることができる核酸を指すことができる。ガイド核酸はRNAであることができる。ガイド核酸はDNAであることができる。ガイド核酸は、核酸の配列へ部位特異的に結合するようにプログラムされることができる。標的化される核酸または標的核酸は、ヌクレオチドを含むことができる。ガイド核酸はヌクレオチドを含むことができる。標的核酸の一部は、ガイド核酸の一部と相補的であることができる。ガイド核酸に相補的であり、かつそれとハイブリダイズする、二重ストランド標的ポリヌクレオチドのストランドは、相補ストランドと呼ばれることができる。相補ストランドへ相補的であり、したがってガイド核酸へ相補的でない可能性がある二重ストランド標的ポリヌクレオチドのストランドは、非相補ストランドと呼ばれることができる。ガイド核酸は、ポリヌクレオチド鎖を含むことができ、かつ「単一ガイド核酸」と呼ばれることができる。単一ガイド核酸は、crRNAを含むことができる。単一ガイド核酸は、crRNAおよびtracrRNAを含むことができる。ガイド核酸は、2つのポリヌクレオチド鎖を含むことができ、かつ「二重ガイド核酸」と呼ばれることができる。二重ガイド核酸は、crRNAおよびtracrRNAを含むことができる。特に明記しない限り、「ガイド核酸」という用語は、単一ガイド核酸および二重ガイド核酸の両方を指す、包括的なものであることができる。

30

40

【0108】

ガイド核酸は、「核酸標的化セグメント」または「核酸標的化配列」と称されることができるセグメントを含むことができる。核酸標的化セグメントは、「タンパク質結合セグメント」または「タンパク質結合配列」または「Casタンパク質結合セグメント」と称さ

50

ることができる、サブセグメントを含むことができる。

【0109】

「標的化配列」という用語は、本明細書において使用される場合、細胞内位置、一例として、所与のオルガネラ、核、サイトソル、ミトコンドリア、小胞体(ER)、ゴルジ、葉緑体、アポプラスト、ペルオキシソーム、または他のオルガネラの原形質膜または膜へのタンパク質の局在化(または保持)を媒介する標的化ポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を指す。例えば、標的化配列は、核局在化シグナル(NLS)を利用する核へのタンパク質(一例として、受容体ポリペプチドまたはアダプターポリペプチド);核外移行シグナル(NES)を利用する、細胞の核の外側、例えば細胞質;ミトコンドリア標的化シグナルを利用するミトコンドリア;ER保持シグナルを利用する小胞体(ER);ペルオキシソーム標的化シグナルを利用するペルオキシソーム;膜局在シグナルを利用する原形質膜;またはそれらの組合せを、配向することができる。

10

【0110】

本明細書において使用される場合、「核局在化ドメイン」は、核局在化シグナル、または核膜を横断し、それによって核に入ることが可能である他の配列もしくはドメインを指すことができる。核局在化ドメインは、ポリペプチドとインフレイムで融合されることができ、その場合、核局在化ドメインは、「異種核局在化ドメイン」と称されることができる。

【0111】

本明細書において使用される場合、「核外移行ドメイン」または「核外移行配列」(NES)または「核外移行シグナル」(NES)は、タンパク質中に存在し、かつ核輸送を用いて核膜孔複合体を介して細胞核から細胞質への移行のためにタンパク質を標的化することが可能である、核外移行シグナルまたは他の配列もしくはドメインを指すことができる。核外輸送ドメインは、ポリペプチドとインフレイムで融合されることができ、その場合、核外輸送ドメインは、「異種核外移行ドメイン」と称されることができる。

20

【0112】

真核細胞では、核と細胞質との間のタンパク質の輸送は、インポートおよびエクスポートとしてもまた知られる、カリオフィリン-βファミリーの輸送因子によって媒介されることができる。核-細胞質輸送の方向は、カーゴタンパク質内の核標的化シグナルによって指示されることができる。核局在化配列(NLS)はタンパク質を核内へと配向することができ、核外移行配列(NES)は、タンパク質を核から細胞質へ直接移行することができる。NESは、核膜孔複合体を介してカーゴタンパク質をエスコートすることができる、移行カリオフィリンCRM1(エクスポート1としてもまた知られる)へ直接結合することができる。

30

【0113】

いくつかの態様において、主題の組成物、方法、キット、またはシステムで使用されることができるNESは、8~15残基長であり、かつ $\Phi 1-X_2,3-\Phi 2-X_2,3-\Phi 3-X-\Phi 4$ のコンセンサスへ緩やかに同調するペプチドであり、ここで、 Φn は、Leu、Val、Ile、Phe、またはMetを表し、Xは、あらゆるアミノ酸であることができる。いくつかの場合において、本開示の主題の組成物、方法、キット、またはシステムで使用することができるNESは、Xu D, et al. Mol Biol Cell. 2012 Sep; 23(18):3673-6に記載されているものなどの、拡張されたKosugiコンセンサス配列(クラス1a、 $\Phi 1-X_3-\Phi 2-X_2-\Phi 3-X-\Phi 4$;クラス1b、 $\Phi 1-X_2-\Phi 2-X_2-\Phi 3-X-\Phi 4$;クラス1c、 $\Phi 1-X_3-\Phi 2-X_3-\Phi 3-X-\Phi 4$;クラス1d、 $\Phi 1-X_2-\Phi 2-X_3-\Phi 3-X-\Phi 4$;クラス2、 $\Phi 1-X-\Phi 2-X_2-\Phi 3-X-\Phi 4$;クラス3、 $\Phi 1-X_2-\Phi 2-X_3-\Phi 3-X_2-\Phi 4$;ここで、 $\Phi n=L, V, I, F$ 、またはM、ならびにA、C、T、およびWは、 Φn のうち1つであることができる)に同調する。いくつかの場合において、本開示の主題の組成物、方法、キット、またはシステムで使用されることができるNESは、3つの配列パターン: $\Phi 1-X_{1,2,3}-\Phi 2-[\hat{W}]_2-\Phi 3-[\hat{W}]-\Phi 4$ (タイプ1)、 $\Phi 1-X_{2,3}-\Phi 2-[\hat{W}]_3-\Phi 3-[\hat{W}]-\Phi 4$ (タイプ2)、および $\Phi 1-X_2-\Phi 2-X-[\hat{W}]_2-\Phi 3-[\hat{W}]_2-\Phi 4$ (タイプ3)を有するNESコンセンサスに同調し、ここで $[\hat{W}]$ は、Trpを除く20個

40

50

のアミノ酸のうちいずれかであり、Ala残基およびThr残基は、Φ1またはΦ2のいずれかの位置で1回のみ使用されることができる。

【0114】

本明細書において使用される場合、「融合」は、1以上の非ネイティブ配列(一例として、部分)を含むタンパク質および/または核酸を指すことができる。融合物は、1以上の同じ非ネイティブ配列を含むことができる。融合物は、1以上の異なる非ネイティブ配列を含むことができる。融合物は、キメラであることができる。融合物は、核酸親和性タグを含むことができる。融合物は、バーコードを含むことができる。融合物は、ペプチド親和性タグを含むことができる。融合は、部位特異的ポリペプチド(一例として、核への標的化のための核局在化シグナル(NLS)、ミトコンドリアへの標的化のためのミトコンドリア局在化シグナル、葉緑体への標的化のための葉緑体局在化シグナル、小胞体(ER)保持シグナル、および同様のもの)の細胞下局在化を提供することができる。融合は、追跡または精製に使用されることができる非ネイティブ配列(一例として、親和性タグ)を提供することができる。融合物は、ビオチンなどの小分子、またはAlexa fluor色素、Cyanine e3色素、Cyanine5色素などの色素であることができる。

10

【0115】

融合物は、機能的効果を有するあらゆるタンパク質を指すことができる。例えば、融合タンパク質は、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン化活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性もしくはグリコシラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMOyl化活性、脱SUMOyl化活性、リボシル化活性、デリボシル化(deribosylation)活性、ミリストイル化活性、リモデリング活性、プロテアーゼ活性、オキシドレダクターゼ活性、トランスフェラーゼ活性、ヒドロラーゼ活性、リアーゼ活性、イソメラーゼ活性、シンターゼ活性、シンセターゼ活性、または脱ミリストイル化活性を含むことができる。エフェクタータンパク質は、ゲノム遺伝子座を修飾することができる。いくつかの態様において、融合タンパク質は、ヌクレアーゼ活性を含まない。いくつかの態様において、融合タンパク質は、デオミナーゼ活性を含まない。いくつかの態様において、融合タンパク質は、ポリメラーゼ活性を含まない(一例として、逆転写酵素活性)。

20

30

【0116】

本明細書において使用される場合、「非ネイティブ」は、ネイティブの核酸またはタンパク質には見られない核酸またはポリペプチド配列を指すことができる。非ネイティブは、親和性タグを指すことができる。非ネイティブは、融合物を指すことができる。非ネイティブは、突然変異、挿入、および/または欠失を含む天然に存在する核酸またはポリペプチド配列を指すことができる。非ネイティブ配列は、非ネイティブ配列が融合される核酸および/またはポリペプチド配列によってもまた呈されることができる、活性(一例として、酵素活性、メチルトランスフェラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性等)を呈してもよいおよび/またはコードしてもよい。非ネイティブ核酸またはポリペプチド配列は、キメラ核酸および/またはポリペプチドをコードするキメラ核酸および/またはポリペプチド配列を産生するために、遺伝子工学によって天然に存在する核酸またはポリペプチド配列(またはそのバリエーション)へ連結されてもよい。

40

【0117】

本明細書において互換的に使用される「対象」、「個体」、および「ペイシェント」という用語は、脊椎動物、好ましくはヒトなどの哺乳動物を指す。哺乳動物は、マウス、サル、ヒト、家畜、スポーツ用動物(sport animal)、およびペットを包含するが、これらに限定されない。in vivoで得られたまたはin vitroで培養された生物学的実体の組織、細胞、およびそれらの子孫がまた網羅される。

50

【0118】

「処置(treatment)」および「処置すること(treating)」という用語は、本明細書において使用される場合、治療的利益および/または予防的利益を包含するがこれらに限定されない、有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチを指す。例えば、処置は、本明細書に開示されるシステムまたは細胞集団を投与することを含むことができる。治療上の利益とは、処置下における1以上の疾患、状態、または症状における、あらゆる治療に関連する改善または効果を意味する。予防的利益のために、組成物は、特定の疾患、状態、もしくは症状を発症するリスクがある対象、または疾患、状態、もしくは症状がまだ現れていないかもしれないが、疾患の生理学的症状のうち1以上を報告する対象へ投与されることができる。

10

【0119】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、投与を、これを必要とする対象へする際に、所望の活性をもたらすのに充分である、組成物、例えば本開示のシステムを含むリンパ球(一例として、Tリンパ球および/またはNK細胞)などの免疫細胞を含む組成物の分量を指す。本開示の文脈内で、「治療効果的」という用語は、本開示の方法によって処置される障害の症状の出現を遅延させ、進行を停止させ、少なくとも1つの症状を軽減または緩和するのに充分である、組成物の分量を指す。

【0120】

送達ビヒクル

いくつかの側面において、本開示は、治療用カーゴおよび/または他の分子を、*in vitro*、*ex vivo*、または*in vivo*で細胞中へと送達するための送達ビヒクルに関する。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルは、対象の細胞中への、治療用カーゴおよび/または他の分子の*in vivo*送達に高い効率を有する。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルは、ウイルス様粒子、エキソソーム、脂質ナノ粒子、プロテオリピドビヒクル、細胞外小胞模倣物、および膜小胞などの脂質含有粒子を包含する。本明細書に開示される送達ビヒクル(一例として、脂質含有粒子)は、対象への投与の際のカーゴの*in vivo*送達に非常に効率的であることができ、一例として、送達ビヒクルに負荷されたカーゴの大部分は、対象の細胞へ送達され、かつ対象の細胞の所望の細胞下の場所(一例として、細胞核または細胞質)へ送達される。いくつかの場合において、送達ビヒクルは、ゲノム編集システムを対象の細胞へと送達するために使用され、かつゲノム編集システムによって実行される*in vivo*遺伝子編集の高い効率を有することができる。いくつかの場合において、送達ビヒクルは、治療用タンパク質(一例として、抗体、転写因子、またはキメラ抗原受容体(CAR))をコードする発現構築物を対象の細胞へと送達するために使用され、かつ対象における治療用タンパク質の高い発現効率を有することができる。

20

30

【0121】

いくつかの場合において、本明細書において提供される脂質含有粒子は、管腔を取り囲む脂質ベースの外層を含む。カーゴは、管腔内側の脂質含有粒子に負荷されることができる。いくつかの場合において、カーゴは、外側の脂質ベース層へ付着することによって脂質含有粒子に負荷される。外側の脂質ベース層は、脂質分子の2つの層からなる単一の脂質層または脂質二重層であることができる。いくつかの場合において、脂質含有粒子は、外側脂質層の外側へ挿入または付着された1以上の融合タンパク質を有する。融合タンパク質は、脂質含有粒子と標的細胞の膜との融合を助け、したがって、脂質含有小胞中に負荷されたカーゴを標的細胞へ送達することができる。

40

【0122】

脂質含有粒子の典型的なサイズは、約10nm~約1000nm、例を挙げるなら、約10nm~50nm、10nm~100nm、10nm~200nm、10nm~300nm、10nm~400nm、10nm~500nm、10nm~600nm、10nm~800nm、20nm~50nm、20nm~100nm、20nm~200nm、20nm~300nm、20nm~400nm、20nm~500nm、20nm~600nm、20nm~800nm、50nm~100nm、50nm~200nm、50nm~300nm、50nm~400nm、50nm~500nm、50nm~600nm、50nm~800nm、100nm~

50

200nm、100nm～300nm、100nm～400nm、100nm～500nm、100nm～600nm、100nm～800nm、200nm～300nm、200nm～400nm、200nm～500nm、200nm～600nm、200nm～800nm、400nm～600nm、400nm～800nm、または600nm～800nmなどである。いくつかの場合において、脂質含有粒子は、ウイルス様粒子、脂質ナノ粒子、またはプロテオリピドビヒクルを含み、かつ約10nm～約100nmのサイズ、例を挙げるなら、約10nm～約20nm、約10nm～約30nm、約10nm～約40nm、約10nm～約50nm、約10nm～約60nm、約10nm～80nm、約20nm～約30nm、約20nm～約40nm、約20nm～約50nm、約20nm～約60nm、約20nm～80nm、約40nm～約50nm、約40nm～約60nm、または約40nm～80nmなどのサイズを有する。いくつかの場合において、脂質含有粒子は、エキソソームを含み、かつ約50nm～200nmのサイズ、例を挙げるなら、約50nm～80nm、約50nm～100nm、約50nm～120nm、約50nm～150nm、約50nm～160nm、約50～180nm、約60nm～80nm、約60nm～100nm、約60nm～120nm、約60nm～160nm、約60nm～160nm、約60nm～180nm、約80nm～100nm、約80nm～120nm、約80nm～160nm、約80nm～180nm、約80nm～180nm、約100nm～120nm、約100nm～150nm、約100nm～180nm、約120nm～150nm、約120nm～180nm、約150nm～180nm、または約150nm～200nmなどのサイズを有する。

10

【0123】

いくつかの側面において、細胞融合分子(一例として、ヒト内在性レトロウイルス(HERV)エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子)を包含する送達ビヒクル(一例として、脂質含有粒子)と;原形質膜局在化タンパク質(一例として、核外移行配列(NES)ヘカップリングされる)を含む融合タンパク質と;カーゴ(一例として、治療用カーゴまたは治療用カーゴに対する結合パートナー)が、本明細書において提供される。

20

【0124】

いくつかの側面において、細胞融合分子(一例として、ヒト内在性レトロウイルス(HERV)エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子)を包含する送達ビヒクル(一例として、脂質含有粒子)と;原形質膜局在化タンパク質(一例として、切断可能リンカーヘカップリングされる)を含む融合タンパク質と;カーゴ(一例として、治療用カーゴまたは治療用カーゴに対する結合パートナー)が、本明細書において提供される。

30

【0125】

いくつかの側面において、原形質膜局在化分子(一例として、ヒト化レトロウイルス構造タンパク質またはヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、一例として、HERV gag、プレクストリン相同(PH)ドメイン、または非免疫原性血漿膜動員タンパク質)、および核外移行配列(NES)を包含する、送達ビヒクル(一例として、脂質含有粒子)が、本明細書において提供される。

【0126】

いくつかの側面において、i)原形質膜局在化分子(一例として、ヒト化レトロウイルス構造タンパク質;ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質、一例として、HERV gag;プレクストリン相同(PH)ドメイン、または非免疫原性血漿膜動員タンパク質)、切断可能リンカー、およびカーゴ(一例として、治療用カーゴまたは治療用カーゴに対する結合パートナー)を含む融合タンパク質を包含する、送達ビヒクル(一例として、脂質含有粒子)が、本明細書において提供される。

40

【0127】

融合タンパク質

複数の側面において、送達ビヒクル、一例として脂質含有粒子へとカーゴをアセンブリするため、およびカーゴを細胞中へと送達するために好適である、融合タンパク質が、本明細書に開示される。融合タンパク質は、カーゴタンパク質(一例として、治療用カーゴ)へ融合された、原形質膜局在化タンパク質(一例として、レトロウイルスgagタンパク質

50

、ヒト内在性レトロウイルスgagタンパク質、またはプレクストリン相同ドメイン)を包含することができる。いくつかの場合において、融合タンパク質は、治療用カーゴ(一例として、結合パートナーは、治療用カーゴに直接結合することができるか、または一例として、結合パートナーは、治療用カーゴとカップリングまたは相互作用する別の分子へ結合することができる)に対する結合パートナーである、カーゴを含む。例えば、融合タンパク質は、一例として、核酸(nuclei acid)分子、一例として、RNA(一例として、mRNA)、またはDNAに結合することができる核酸結合タンパク質へカップリングした、原形質膜局在化タンパク質(一例として、レトロウイルスgagタンパク質、ヒト内在性レトロウイルスgagタンパク質、またはプレクストリン相同ドメイン)を含むことができる。いくつかの場合において、融合タンパク質は、本明細書に開示される送達ビヒクルによる送達に好適である。

10

【0128】

本明細書に開示される原形質膜局在化タンパク質は、ウイルス、ヒト、またはいずれかの他の好適な供給源に由来することができる。いくつかの場合において、原形質膜局在化タンパク質は、ヒト内在性タンパク質である。

【0129】

いくつかの場合において、本明細書に開示される融合タンパク質は、核局在化配列(NLS)を包含する。いくつかの場合において、NLSは、融合タンパク質、または融合タンパク質から放出されたカーゴ(実例としては、切断可能リンカーの切断後に融合タンパク質から放出される)の、標的細胞の核への送達を促進する。

20

【0130】

いくつかの場合において、本明細書に開示される融合ポリペプチドは、少なくとも1つのNLS配列、例を挙げるなら、2つ以上、3つ以上、4つ以上、または5つ以上のNLS配列を包含する。いくつかの場合において、1以上のNLS配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNLS配列)は、融合タンパク質のN末端および/もしくはC末端に、または融合タンパク質のN末端および/もしくはC末端の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、1以上のNLS配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNLS配列)は、融合タンパク質のN末端に、または融合タンパク質のN末端の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、1以上のNLS配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNLS配列)は、融合タンパク質のC末端に、または融合タンパク質のC末端の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、1以上のNLS配列(3以上、4以上、または5以上のNLS配列)は、融合タンパク質のN末端およびC末端の両方に、または融合タンパク質のN末端およびC末端の両方の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、NLS配列は融合タンパク質のN末端に位置し、かつNLS配列は融合タンパク質のC末端に位置する。

30

【0131】

いくつかの場合において、カーゴタンパク質は、本明細書に開示される融合タンパク質の一部として、一例として、構造タンパク質(一例として、ヒト内在性レトロウイルス(HERV)構造タンパク質または原形質膜動員ドメイン)へ作動可能に連結されて送達される。いくつかの態様において、1以上のNLS配列は、融合タンパク質のカーゴタンパク質配列の一方の末端もしくは両方の末端、または一方の末端もしくは両方の末端の近くに位置する。例えば、いくつかの場合において、1以上のNLS配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNLS配列)は、カーゴタンパク質配列のN末端および/もしくはC末端に、またはカーゴタンパク質配列のN末端および/もしくはC末端の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、1以上のNLS配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNLS配列)は、カーゴタンパク質配列のN末端に、またはカーゴタンパク質配列のN末端の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、1以上のNLS配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNLS配列)は、カーゴタンパク質配列のC末端に、またはカーゴタンパク質配列のC末端の近く(

40

50

一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、1以上のNLS配列(3以上、4以上、または5以上のNLS配列)は、カーゴタンパク質配列のN末端およびC末端の両方に、またはカーゴタンパク質配列のN末端およびC末端の両方の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、NLS配列はカーゴタンパク質配列のN末端に位置し、かつNLS配列はカーゴタンパク質配列のC末端に位置する。

【0132】

いくつかの場合において、本明細書に開示される融合タンパク質は、1~10のNLS配列(一例として、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、2~10、2~9、2~8、2~7、2~6、または2~5のNLS配列)を包含する。いくつかの場合において、融合タンパク質は、2~5のNLS配列(一例として、2~4、または2~3のNLS)を包含する(融合される)。NLS配列の非限定的な例は、以下に由来するNLS配列を包含する:アミノ酸配列PKKKRKV(配列番号19)を有する、SV40ウイルスのラージT抗原;ヌクレオプラスミンからのNLS(一例として、配列KRPAATKKAGQAKKKK(配列番号20)を有するヌクレオプラスミン二連NLS);アミノ酸配列PAAKRVKLD(配列番号21)またはRQRRNELKRSP(配列番号22)を有するc-myc NLS;配列NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY(配列番号23)を有するhRNPAI M9 NLS;インポーチン-アルファからのIBBドメインの配列RMRIZFKNKGKDT AELRRRRVE V S VELRK AKKDEQILKRRN V(配列番号24);筋腫Tタンパク質の配列VSRKRPRP(配列番号25)およびPPKKARED(配列番号26);ヒトp53の配列PQPKKKPL(配列番号27);マウスc-abl IVの配列SALIKKKKKMAP(配列番号28);インフルエンザウイルスNS1の配列DRLRR(配列番号29)およびPKQKKRK(配列番号30);肝炎ウイルスデルタ抗原の配列RKLKKKKIKKL(配列番号31);マウスMx1タンパク質の配列REKKKFLKRR(配列番号32);ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの配列KRKGDE VDGVDDEV AKKKS KK(配列番号33);および、ステロイドホルモン受容体(ヒト)グルココルチコイドの配列RKCLQAGMNLEARKTKK(配列番号34)、ならびに前述する配列と少なくとも80%の同一性を有する配列。いくつかの場合において、NLSは、アミノ酸配列MDSLLMNRKFLY QFKNVRWAKGRRETYLC(配列番号35)を含む。

【0133】

NLS配列の他の非限定的な例は、KRTADGSEFESPKKKRKV(配列番号36)、KKTELQTTNAENKTKKL(配列番号37)、KRGINDRNFWRGENGRKTR(配列番号38)、RKSGKIAAIVVKRPRK(配列番号39)、およびMDSLLMNRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC(配列番号35)、SPKKKRKVEAS(配列番号40)、AGCCCCAAGAAgAAGAGaAAGGTGGAGGCCAGC(配列番号41)、およびGPKKKRKVAAA(配列番号42)、ならびにCokol et al., EMBO Rep., 2000, 1(5):411-415 and Freitas et al., Current Genomics, 2009, 10(8):550-7; Lu, J., et al., Cell Commun Signal 19, 60(2021); international publication no. WO/2001/038547(これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる); 国際公開第2001/038547号、ならびに前述する配列と少なくとも80%の同一性を有する配列に記載されているもののいずれかを包含する。

【0134】

いくつかの場合において、本明細書に開示される融合タンパク質は、核外移行配列(NES)を包含する。いくつかの場合において、NESは、核に対する標的細胞のサイトゾルにおける融合タンパク質の局在化を促進する。

【0135】

いくつかの場合において、本明細書に開示される融合ポリペプチドは、少なくとも1つのNES配列、例を挙げるなら、2つ以上、3つ以上、4つ以上、または5つ以上のNES配列を包含する。いくつかの場合において、1以上のNES配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNES配列)は、融合タンパク質のN末端および/もしくはC末端に、または融合タンパク質のN末端および/もしくはC末端の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、本明細書に開示される融合タンパク質は、ただ1つのNES配列を含む。いくつかの場合において、本明細書に開示される融合タンパク質

は、3つのNES配列を含む。いくつかの場合において、1以上のNES配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNES配列)は、融合タンパク質のN末端に、または融合タンパク質のN末端の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、1以上のNES配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNES配列)は、融合タンパク質のC末端に、または融合タンパク質のC末端の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、1以上のNES配列(3以上、4以上、または5以上のNES配列)は、融合タンパク質のN末端およびC末端の両方に、または融合タンパク質のN末端およびC末端の両方の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、NES配列は融合タンパク質のN末端に位置し、かつNES配列は融合タンパク質のC末端に位置する。

10

【0136】

いくつかの場合において、カーゴタンパク質は、本明細書に開示される融合タンパク質の一部として、一例として、構造タンパク質(一例として、ヒト内在性レトロウイルス構造タンパク質または原形質膜動員ドメイン)へ作動可能に連結されて送達される。いくつかの態様において、1以上のNES配列は、融合タンパク質の内側のカーゴタンパク質配列の一方の末端もしくは両方の末端、または一方の末端もしくは両方の末端の近くに位置する。例えば、いくつかの場合において、1以上のNES配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNES配列)は、カーゴタンパク質配列のN末端および/もしくはC末端に、またはカーゴタンパク質配列のN末端および/もしくはC末端の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、1以上のNES配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNES配列)は、カーゴタンパク質配列のN末端に、またはカーゴタンパク質配列のN末端の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、1以上のNES配列(2以上、3以上、4以上、または5以上のNES配列)は、カーゴタンパク質配列のC末端に、またはカーゴタンパク質配列のC末端の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、1以上のNES配列(3以上、4以上、または5以上のNES配列)は、カーゴタンパク質配列のN末端およびC末端の両方に、またはカーゴタンパク質配列のN末端およびC末端の両方の近く(一例として、以下の50アミノ酸以内)に位置する。いくつかの場合において、NES配列はカーゴタンパク質配列のN末端に位置し、かつNES配列はカーゴタンパク質配列のC末端に位置する。いくつかの場合において、本明細書に開示される融合タンパク質は、ただ1つのNES配列を含む。いくつかの場合において、融合タンパク質は、ただ1つのNES配列を含み、NES配列は、カーゴタンパク質のN末端に、またはN末端近く(一例として、N末端の50アミノ酸以内)に、位置する。

20

30

【0137】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、1つのNES配列および2つのNLS配列を含む。これらの態様のいくつかの場合において、NES配列、NLS配列およびカーゴタンパク質配列は、以下のようにN末端からC末端へ順に位置する: NES-NLS-カーゴタンパク質-NLS。いくつかの態様において、融合タンパク質は、2つ以上のNES配列および2つのNLS配列を含む。これらの態様のいくつかの場合において、NES配列、NLS配列およびカーゴタンパク質配列は、以下のようにN末端からC末端へ順に位置する: $n \times \text{NES} (n \geq 2)$ -NLS-カーゴタンパク質-NLS。

40

【0138】

いくつかの場合において、本明細書に開示される融合タンパク質は、1~10のNES配列(一例として、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、2~10、2~9、2~8、2~7、2~6、または2~5のNES配列)を包含する。いくつかの場合において、融合タンパク質は、2~5のNES配列(一例として、2~4、または2~3のNES)を包含する(融合される)。

【0139】

いくつかの場合において、融合タンパク質で使用されることができるNES配列は、HIV-1 Revタンパク質に由来するLQLPPLERLTL(配列番号43)、およびそれと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの場合において、NES配列は、PKI α に

50

由来するLALKLAGLDL(配列番号44)、およびそれと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの場合において、本明細書に開示されるNES配列は、例を挙げるなら、la Cour T, et al., Nucleic Acids Res. 2003; 31(1): 393-396; および、Xu D, et al. Mol Biol Cell. 2012 Sep; 23(18): 3673-6に記載されるものなどの配列を含み、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。NES配列データベース(NESdb(登録商標); prodata.swmed.edu/LRN)に記載されるNES配列のいずれも、一例として、脂質含有粒子、一例としてウイルス様粒子へとカーゴタンパク質をパッケージングする目的で、本明細書に開示される融合タンパク質に使用されることができる。

【0140】

いくつかの場合において、融合タンパク質は、2以上の構成要素の間に切断可能リンカーを含む。実例としては、融合タンパク質は、カーゴタンパク質配列と、原形質膜局在化タンパク質配列(一例として、レトロウイルスgagタンパク質配列)との間に、切断可能リンカーを含むことができる。いくつかの場合において、切断可能リンカーは、原形質膜局在化タンパク質配列を、そのN末端またはC末端のNLS配列および/またはNES配列から分離する。切断可能リンカーは、カーゴタンパク質配列を、そのN末端またはC末端において原形質膜局在化タンパク質配列、NLS配列、および/またはNES配列から分離することができる。本明細書において提供される切断可能リンカー配列は、ウイルスプロテアーゼ、細菌プロテアーゼ、または真核生物プロテアーゼ(一例として、植物、動物、または真菌から由来するプロテアーゼ)によって認識および切断される、切断可能な配列であることができる。いくつかの場合において、切断可能な配列は、レトロウイルスプロテアーゼ(pro、一例として、モロニー Maus 白血病ウイルス(MMLV)またはフレンド Maus 白血病ウイルス(FMLV)に由来するpro)によって認識される。融合タンパク質において使用されることができる切断可能な配列の非限定的な例は、TSTLLMENS(配列番号1)、PRSSLYPALTP(配列番号2)、VQALVLTQ(配列番号3)、およびPLQVLTNLNIERR(配列番号4)、ならびに前述するものと少なくとも80%の同一性を有する配列を包含する。

【0141】

いくつかの場合において、本明細書に開示される融合タンパク質はまた、構成要素と一緒に作動可能に連結する1以上の切断不能リンカーを含む。切断不能リンカーは、融合タンパク質構築物に使用されるあらゆる好適なリンカー配列、例を挙げるなら、グリシン(Gly)残基およびセリン(Ser)残基からなるペプチドリンカーなどであることができる。いくつかの態様において、切断不能リンカーは、(GS)_x(配列番号45)、(GGS)_x(配列番号46)、(GGGS)_x(配列番号47)、(GGSG)_x(配列番号48)、および(SGGG)_x(配列番号49)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、xは、1~50の整数である。

【0142】

いくつかの態様において、融合タンパク質(切断前)は、以下の構造を含む:

[gagヌクレオカプシドポリタンパク質]-[3X NES]-[切断可能リンカー]-[NLS]-[治療用カーゴ]-[NLS]。

【0143】

いくつかの場合において、融合タンパク質は、N末端からC末端へ順に位置する以下の構成要素の立体配置のうち1つを有する:

[原形質膜局在化タンパク質]-[n * NES]-[切断可能リンカー]-[m₁ * NLS]-[カーゴタンパク質]-[m₂ * NLS];

[原形質膜局在化タンパク質]-[切断可能リンカー]-[m₁ * NLS]-[カーゴタンパク質]-[m₂ * NLS]-[n * NES];

[原形質膜局在化タンパク質]-[切断可能リンカー1]-[m₁ * NLS]-[カーゴタンパク質]-[m₂ * NLS]-[切断可能リンカー2]-[n * NES]; および

[原形質膜局在化タンパク質]-[切断可能リンカー1]-[m₁ * NLS]-[カーゴタンパク質]-[m₂ * NLS];

[m₁ * NLS]-[カーゴタンパク質]-[m₂ * NLS]-[切断可能リンカー]-[n * NES]-[原形

質膜局在化タンパク質];

[$n * NES$]-[$m_1 * NLS$]-[カーゴタンパク質]-[$m_2 * NLS$]-[切断可能リンカー]-[原形質膜局在化タンパク質];

[$n * NES$]-[切断可能リンカー1]-[$m_1 * NLS$]-[カーゴタンパク質]-[$m_2 * NLS$]-[切断可能リンカー2]-[原形質膜局在化タンパク質];および

[$m_1 * NLS$]-[カーゴタンパク質]-[$m_2 * NLS$]-[切断可能リンカー]-[原形質膜局在化タンパク質];

ここで、 n 、 m_1 、および m_2 は、それぞれ、0~10の範囲の整数であり、それらが参照するそれぞれの配列のリピート数を表示する。切断不能リンカー配列は、あらゆる2つの隣り合う構成要素の間の前述する立体配置のいずれかに、存在することができる、または存在しないこともできる。

【0144】

融合タンパク質の切断(一例として、gag治療用カーゴ)

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(一例として、gag治療用カーゴ)は、以下:(a) gagヌクレオカプシドタンパク質の配列と、(b) 治療用カーゴの配列と、(c) 切断可能リンカーと、(d) 核外移行配列(NES)と、を含む。いくつかの場合において、治療用カーゴは、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、逆転写酵素、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せを含む。実例としては、治療用カーゴは、ヌクレアーゼドメインを含む塩基エディタであることができる。ある特定の態様において、治療用カーゴは、ヌクレアーゼも、ポリメラーゼ(一例として、逆転写酵素)も、塩基エディタも、プライムエディタも含まない。いくつかの態様において、治療用カーゴは、タンパク質(一例として、ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタ、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ(任意に、IIS型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、または逆転写酵素)である。いくつかの態様において、治療用カーゴは、核酸分子(一例として、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、アプタザイム、アプタマー、またはリボザイム)である。いくつかの態様において、治療用カーゴは、後成的エディタ、制限エンドヌクレアーゼ(任意に、IIS型制限酵素)、リコンビナーゼ、転写因子、抗体、キメラ抗原受容体、T細胞受容体、オルガネラ、核酸分子、DNA、RNA、レトロトランスポゾン、オリゴヌクレオチド、アプタザイム、アプタマー、リボザイム、小分子化合物、またはこれらのいずれかの組合せである。

【0145】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、治療用カーゴの配列とNESとの間に位置づけられる。融合タンパク質は、本明細書において提供される脂質含有粒子(一例として、ウイルス様粒子)へとパッケージングされる際に切断可能リンカーにおいて切り取られることができ、実例としては、切断可能リンカーは、脂質含有粒子(一例として、ウイルス様粒子)のプロテアーゼ(pro)タンパク質によって認識されることができる。切断可能リンカーで融合タンパク質が切断される際、治療用カーゴは、別のタンパク質としてタンパク質コアの内側へと放出されることができる。結果として、いくつかの場合において、本明細書において提供される脂質含有粒子(一例として、ウイルス様粒子)は、gagヌクレオカプシドタンパク質およびNESを含むが、しかし治療用カーゴを欠く、切断産物を含む。これらの態様のいくつかにおいて、切断可能リンカーにおける切断の結果として、脂質含有粒子へと最初にパッケージングされた融合タンパク質の量と比較して、切断可能リンカーにおいて切断されていない脂質含有粒子中に比較的少量の融合タンパク質、実例としては、脂質含有粒子中の切断前に、最大で約50%、最大で約40%、最大で約35%、最大で約30%、最大で約25%、最大で約20%、最大で約18%、最大で約16%、最大で約14%、最大で約12%、最大で約10%、最大で約8%、最大で約6%、最大で約5%、最大で約4%、最大で約3%、最大で約2%、最大で約1%、最大で約0.8%、最大で

10

20

30

40

50

約0.6%、最大で約0.5%、最大で約0.4%、最大で約0.3%、最大で約0.2%、最大で約0.1%、最大で約0.05%、または最大で約0.01%の量の融合タンパク質が存在する。いくつかの態様において、切断可能リンカーで切断されない融合タンパク質は、脂質含有粒子に残っていない。

【0146】

いくつかの態様において、切断後、融合タンパク質は、構造[gagヌクレオカプシドタンパク質]-[3X NES]を含む。いくつかの態様において、切断産物は、構造[NLS]-[治療用カーゴ]-[NLS]を含む。

【0147】

いくつかの態様において、切断可能リンカーにおける融合タンパク質の切断の結果として、融合タンパク質または切断産物とは別に、脂質含有粒子のタンパク質コアの内側に存在する有意な量の治療用カーゴが存在する。いくつかの態様において、脂質含有粒子中の融合タンパク質と比較して、脂質含有粒子のタンパク質コアの内側に比較的多くの治療用カーゴが存在する。いくつかの態様において、融合タンパク質の量に対するタンパク質コアの内側に存在する治療用カーゴの量の比は、少なくとも1.5である。いくつかの場合において、比は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、または20である。いくつかの場合において、比は、少なくとも100である。いくつかの場合において、比は、少なくとも10,000である。いくつかの場合において、比は、約1.5～約100、例を挙げるなら、約2～約100、約5～約100、約10～約100、約2～約80、約5～約80、約10～約80、約2～約60、約5～約60、約10～約60、約2～約50、約5～約50、約10～約50、約2～約40、約5～約40、約10～約40、約2～約30、約5～約30、約10～約30、約2～約20、約5～約20、約10～約20、約20～約100、約30～約100、約40～約100、約50～約100、または約80～約100などである。いくつかの場合において、比は、約100～約1000、例を挙げるなら、約100～約800、約100～約600、約100～約500、約100～約400、約100～約300、約100～約200、約200～約1000、約200～約800、約200～約600、約200～約500、約200～約400、約200～約300、約400～約1000、約400～約800、約400～約600、または約400～約500などである。

【0148】

いくつかの態様において、脂質含有粒子中の治療用カーゴの配列の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.2%、少なくとも約99.5%、少なくとも約99.6%、少なくとも約99.7%、少なくとも約99.8%、少なくとも約99.9%、少なくとも約99.95%、または少なくとも約99.99%が、融合タンパク質または切断産物とは別の、タンパク質コアの内側に位置づけられる治療用カーゴの形態で存在する。いくつかの態様において、タンパク質コアの内側に位置づけられる治療用カーゴの形態で存在する脂質含有粒子中の治療用カーゴの配列の約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.2%、約99.5%、約99.6%、約99.7%、約99.8%、約99.9%、約99.95%、約99.99%、または約100%が存在する。タンパク質コアの内側に位置づけられる別の治療用カーゴの形態で存在する治療用カーゴの配列のパーセンテージは、タンパク質コアの内側に位置づけられる治療用カーゴの量と、治療用カーゴの配列を含む脂質含有粒子中の融合タンパク質の量との和に対する、タンパク質コアの内側に位置づけられる治療用カーゴの量とのパーセンテージとして計算されることができる。

【0149】

脂質含有粒子内の治療用カーゴまたは融合タンパク質の量は、各々、実例としては、タンパク質またはタンパク質配列の定量的測定のための当業者に公知のあらゆる技術によって測定されることができる。例えば、治療用カーゴの配列またはエピトープに対する抗体

を用いたウエスタンブロットまたはJessブロットは、治療用カーゴおよび融合タンパク質の量を区別および測定ために行われることができる。

【0150】

いくつかの場合において、融合タンパク質の量に対するタンパク質コアの内側に存在する治療用カーゴの量の比は、同じまたは類似する脂質含有粒子(一例として、ウイルス様粒子)、実例としては、そのような脂質含有粒子の1以上の調製物の集団のレベルで測定される。いくつかの側面において、脂質含有粒子(一例として、ウイルス様粒子)の集団が本明細書において提供される。脂質含有粒子の集団のいくつかの態様において、脂質含有粒子は、タンパク質コアをカプセル化している脂質膜を含み、タンパク質コアは、群特異抗原(gag)プロテアーゼ(pro)ポリタンパク質と、治療用カーゴの配列およびgagタンパク質の配列を含む融合タンパク質と、を含む。これらの態様のいくつかにおいて、脂質含有粒子は、融合タンパク質とは別の、タンパク質コアの内側に位置づけられる治療用カーゴをさらに含む。いくつかの態様において、融合タンパク質の量に対するタンパク質コアの内側に存在する治療用カーゴの量の比は、脂質含有粒子の集団間で少なくとも1.5である。いくつかの態様において、脂質含有粒子の集団間の比は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、または20である。いくつかの場合において、脂質含有粒子の集団間の比は、少なくとも100である。いくつかの場合において、脂質含有粒子の集団間の比は、少なくとも1000である。いくつかの場合において、脂質含有粒子の集団間の比は、少なくとも10,000である。いくつかの場合において、脂質含有粒子の集団間の比は、1.5~100、例を挙げるなら、2~100、5~100、10~100、2~80、5~80、10~80、2~60、5~60、10~60、2~50、5~50、10~50、2~40、5~40、10~40、2~30、5~30、10~30、2~20、5~20、10~20、20~100、30~100、40~100、50~100、または80~100などである。いくつかの場合において、脂質含有粒子の集団間の比は、100~1000、例を挙げるなら、100~800、100~600、100~500、100~400、100~300、100~200、200~1000、200~800、200~600、200~500、200~400、200~300、400~1000、400~800、400~600、または400~500などである。

10

20

【0151】

いくつかの態様において、脂質含有粒子の集団間において、タンパク質コアの内側に位置づけられる治療用カーゴの形態で存在する、脂質含有粒子中の治療用カーゴの配列の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.2%、少なくとも約99.5%、少なくとも約99.6%、少なくとも約99.7%、少なくとも約99.8%、少なくとも約99.9%、少なくとも約99.95%、または少なくとも約99.99%が存在する。いくつかの態様において、脂質含有粒子の集団間において、タンパク質コアの内側に位置づけられる治療用カーゴの形態で存在する脂質含有粒子中の治療用カーゴの配列の約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.2%、約99.5%、約99.6%、約99.7%、約99.8%、約99.9%、約99.95%、約99.99%、または約100%が存在する。脂質含有粒子の集団中の治療用カーゴの配列のパーセンテージは、タンパク質コアの内部に位置づけられる治療用カーゴの量と、治療用カーゴの配列を含む脂質含有粒子中の融合タンパク質の量との和に対する、脂質含有粒子の集団間においてタンパク質コアの内側に位置づけられる治療用カーゴの量のパーセンテージとして計算されることができる。

30

40

【0152】

これらの態様のいくつかにおいて、集団レベルにおいて、切断可能リンカーにおける切断の結果として、脂質含有粒子の集団へと最初にパッケージングされた融合タンパク質の量と比較して、切断可能リンカーにおいて切断されていない脂質含有粒子中に比較的少量の融合タンパク質、実例としては、切断前に脂質含有粒子の集団へと最初にパッケージン

50

グされる、最大で約40%、最大で約35%、最大で約30%、最大で約25%、最大で約20%、最大で約18%、最大で約16%、最大で約14%、最大で約12%、最大で約10%、最大で約8%、最大で約6%、最大で約5%、最大で約4%、最大で約3%、最大で約2%、最大で約1%、最大で約0.8%、最大で約0.6%、最大で約0.5%、最大で約0.4%、最大で約0.3%、最大で約0.2%、最大で約0.1%、最大で約0.05%、または最大で約0.01%の量の融合タンパク質が存在する。

【0153】

他の態様において、集団レベルで、切断可能リンカーで切断されない脂質含有粒子の集団には、実例としては、各脂質含有粒子あたり最大で約100、80、60、50、40、30、20、10、8、6、4、2、もしくは1つのそのような未切断融合タンパク質(一例として、ウイルス様粒子)、または集団中の2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1500、2000、3000、5000、 10^4 、 10^5 、または 10^6 個の脂質含有粒子ごとに最大で約1つのそのような未切断融合タンパク質(一例として、ウイルス様粒子)が、わずかに微量の融合タンパク質が残っている。

10

【0154】

いくつかの態様において、切断可能リンカーにおける融合タンパク質の切断の結果として、融合タンパク質または切断産物とは別に、脂質含有粒子のタンパク質コアの内側に存在する有意な量の治療用カーゴが存在する。いくつかの態様において、脂質含有粒子中の融合タンパク質と比較して、脂質含有粒子のタンパク質コアの内側に比較的多くの治療用カーゴが存在する。いくつかの態様において、融合タンパク質の量に対するタンパク質コアの内側に存在する治療用カーゴの量の比は、少なくとも1.5である。いくつかの場合において、比は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、または20である。いくつかの場合において、比は、少なくとも100である。いくつかの場合において、比は、少なくとも1000である。いくつかの場合において、比は、少なくとも10,000である。いくつかの場合において、比は、1.5~100、例を挙げるなら、2~100、5~100、10~100、2~80、5~80、10~80、2~60、5~60、10~60、2~50、5~50、10~50、2~40、5~40、10~40、2~30、5~30、10~30、2~20、5~20、10~20、20~100、30~100、40~100、50~100、または80~100などである。いくつかの場合において、比は、100~1000、例を挙げるなら、100~800、100~600、100~500、100~400、100~300、100~200、200~1000、200~800、200~600、200~500、200~400、200~300、400~1000、400~800、400~600、または400~500などである。

20

30

【0155】

原形質膜局在化タンパク質

いくつかの場合において、本明細書に記載される原形質膜局在化は、送達ビヒクル、一例として、送達ビヒクルの少なくとも一部の基本構造を形成する。いくつかの場合において、本明細書に記載される原形質膜局在化タンパク質はまた、送達ビヒクル(一例として、VLP)のセルフアセンブリを促進する。実例としては、原形質膜局在化タンパク質は、膜エンクロージャを形成することによって、原形質膜への局在化および送達ビヒクル(一例として、ウイルス様粒子)のパッケージングを促進することができる。

40

【0156】

いくつかの場合において、原形質膜局在化タンパク質は、一例として、ウイルスに由来するウイルスタンパク質である。いくつかの場合において、原形質膜局在化タンパク質は、哺乳動物タンパク質、一例として哺乳動物、一例としてヒトに由来する、哺乳動物タンパク質である。いくつかの場合において、原形質膜局在化タンパク質は、ヒト内在性タンパク質である。

【0157】

いくつかの場合において、原形質膜局在化タンパク質は、ウイルス、そのホモログ、その断片、そのバリエーション、またはこれらのいずれかの組合せに由来するポリタンパク質で

50

ある。実例としては、原形質膜局在化タンパク質は、レトロウイルスgagタンパク質、一例として、マトリックス(matrix:MA)ポリペプチド、RNA結合リンタンパク質ポリペプチド、カプシド(capsid:CA)ポリペプチド、またはヌクレオカプシド(nucleocapsid:NC)ポリペプチドのうち1以上を含む、レトロウイルスポリタンパク質を含む。いくつかの場合において、gagタンパク質は、フレンドマウス白血病ウイルス(FMLV)に由来する。いくつかの場合において、レトロウイルスgagポリタンパク質は、アルファレトロウイルス、ベータレトロウイルス、ガンマレトロウイルス、デルタレトロウイルス、イプシロンレトロウイルス、またはスプーマウイルスのgagポリタンパク質である。いくつかの場合において、レトロウイルスgagポリタンパク質は、ヒト免疫不全ウイルスのgagポリタンパク質である。

10

【0158】

原形質膜局在化タンパク質の非限定的な例は、ヒトパピローマウイルス(HPV)L1タンパク質、HPV L2タンパク質、B型肝炎ウイルス(HBV)コアタンパク質、チクングニアウイルス(CHIKV)C-E3-E2-6k-E1、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)gag-pol、HIV gag、呼吸器多核体ウイルス(RSV)M、RSV NP、ヒトメタニューモウイルス(HMPV)M、インフルエンザM1、ジカウイルス(ZIKV)C、ZIKV prM/M、デングウイルス(DENV)C-prM、ウエストナイルウイルス(West Nile Virus:WNV)prMEタンパク質、WNV CprMEタンパク質、フィロウイルスVP40またはZタンパク質、バキュロウイルスP1タンパク質、ロタウイルスVP7、ロタウイルスVP2タンパク質、ロタウイルスVP6タンパク質、SARS Mタンパク質、SARS Eタンパク質、SARS Nタンパク質、ブタサーコウイルス2型(PCV2)カプシド、バキュロウイルスVP2タンパク質、バキュロウイルスVP5タンパク質、バキュロウイルスVP3タンパク質、もしくはバキュロウイルスVP7タンパク質、C型肝炎ウイルス(HCV)コアタンパク質、エボラヌクレオカプシド、パロウイルスVP1タンパク質、パロウイルスVP2タンパク質、ニューカッスル病ウイルス(NDV)Mタンパク質、E型肝炎ウイルス(HeV)Mタンパク質、ニパウイルス(NIV)Mタンパク質、ヒトポリオーマウイルス2(JCPyV)VP1タンパク質、ヒトパラインフルエンザウイルス3型(HPIV3)Mタンパク質、HPIV3Nタンパク質、またはムンプスウイルス(MuV)Mタンパク質、それらのホモログ、それらの断片、それらのバリエーション、またはこれらのいずれかの組合せを含む。

20

【0159】

いくつかの場合において、原形質膜局在化タンパク質配列は、ヒト内在性レトロウイルス(HERV)gagタンパク質を含む。いくつかの場合において、原形質膜局在化タンパク質配列は、プレクストリン相同性(PH)ドメインを含む。原形質膜局在化タンパク質配列の非限定的な例は、表2に記載されるものを包含することができる。

30

【0160】

細胞融合/エンベロープタンパク質

本明細書に開示される細胞融合タンパク質は、送達ビヒクル(一例として、脂質層に挿入されるか、脂質層に付着されるか、または脂質層に係留される)の外側膜上に存在し、送達膜、一例として標的細胞膜とビヒクルの融合を促進する、タンパク質を指すことができる。いくつかの場合において、細胞融合タンパク質は、送達ビヒクルの向性、一例として、1以上のある特定の細胞型への送達ビヒクルの優先的融合を媒介する。いくつかの場合において、細胞融合タンパク質は、送達ビヒクル中の脂質と標的細胞中の脂質との間の混合をもたらす。いくつかの場合において、脂質含有粒子は、ヒト内在性レトロウイルス(HERV)エンベロープタンパク質、ヒト化ウイルスエンベロープタンパク質、または非免疫原性細胞融合分子を包含する。HERVエンベロープタンパク質の非限定的な例は、表1に記載されるものを包含することができる。

40

【0161】

いくつかの場合において、細胞融合タンパク質は、哺乳動物タンパク質を含む。いくつかの場合において、細胞融合タンパク質は、ウイルスタンパク質を含む。いくつかの態様において、細胞融合タンパク質は、哺乳動物タンパク質または哺乳動物タンパク質のホモ

50

ログ(一例として、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きな同一性を有する)、非哺乳動物タンパク質、例を挙げるなら、ウイルスタンパク質またはウイルスタンパク質のホモログ(一例として、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはより大きな同一性を有する)、ネイティブタンパク質またはネイティブタンパク質の誘導体、合成タンパク質、その断片、そのバリエーション、1以上の細胞融合タンパク質もしくは断片を含むタンパク質融合物、およびこれらのあらゆる組合せなどを含む。

【0162】

本明細書において提供される非免疫原性細胞融合タンパク質は、ヒト対象に対して異種のタンパク質と比較して、ヒト対象への免疫原性を低減させることができる。実例としては、非免疫原性細胞融合タンパク質は、ヒト対象に対する免疫原性が低減するようにヒト化されることができる。いくつかの態様において、細胞融合タンパク質は、免疫反応性を低減させるように修飾されることができる。実例としては、細胞融合タンパク質は、例を挙げるなら、PEGなど、Croyle MA, et al., J Virol. 2004 Jan; 78(2): 912-21に記載されるものなどの免疫相互作用を低減する分子で装飾されることができる、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。よって、いくつかの態様において、エンベロープタンパク質は、PEGを含み、一例としてPEG化ポリペプチドである。免疫システムによって標的化される細胞融合タンパク質中のアミノ酸残基は、Lech PJ, et al., Virology. 2014 Apr; 454-455: 237-46; and Kneissl S, et al., PLoS One. 2012; 7(10): e46667に記載されるものなどの免疫系によって、認識されないように改変されてもよく、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの態様において、細胞融合タンパク質のタンパク質配列は、ヒトに見られるアミノ酸配列に類似するように変更される(ヒト化)。いくつかの態様において、細胞融合タンパク質のタンパク質配列は、MHC複合体にあまり強く結合しないタンパク質配列へ変更される。いくつかの態様において、細胞融合タンパク質は、ヒトに感染しない(かつヒトがワクチン接種していない)ウイルスまたは生物に由来し、ペイシェントの免疫システムが、細胞融合タンパク質に対してナイーブである可能性を高める(一例として、細胞融合タンパク質に対するごくわずかな体液性または細胞媒介性の適応免疫応答が存在する)(doi:10.1006/mthe.2002.0550、doi:10.1371/journal.ppat.1005641、doi:10.1038/gt.2011.209、DOI 10.1182/blood-2014-02-558163)。いくつかの態様において、エンベロープタンパク質のグリコシル化は、免疫相互作用を変更されるか、または免疫反応性を低減されるように変化される。

【0163】

いくつかの場合において、細胞融合タンパク質は、ニパウイルスタンパク質F、麻疹ウイルスFタンパク質、ツパイパラミクソウイルスFタンパク質、パラミクソウイルスFタンパク質、ヘンドラウイルスFタンパク質、ヘニパウイルスFタンパク質、モルビリウイルスFタンパク質、レスピロウイルスFタンパク質、センダイウイルスFタンパク質、ルブラウイルスFタンパク質、もしくはアブラウイルスFタンパク質、またはそれらの誘導体から選ばれる配列を含む。

【0164】

いくつかの場合において、細胞融合タンパク質は、哺乳動物タンパク質を包含する。哺乳動物細胞融合タンパク質の例は、vSNAREおよびtSNAREなどのSNAREファミリータンパク質、Syncytin-1およびSyncytin-2などのシンシチンタンパク質、myomaker、myomixer、myomerge、FGFRL1(線維芽細胞成長因子受容体様1)、Minion、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のアイソフォーム(一例として、米国特許第6,099,857号に開示されるとおり)、コネキシン43、コネキシン40、コネキシン45、コネキシン32、またはコネキシン37(一例として、米国特許出願公開第2007/0224176号に開示されるとおり)などのギャップジャンクションタンパク質、Hap2、異種細胞間でシンシチウム形成を誘導することが可能であるあらゆるタンパク質、そのホモログ、その断片、そのバリエーション、ならびに1以上のタンパク質またはその断片を含む

タンパク質融合体を包含してもよいが、これらに限定されない。いくつかの態様において、細胞融合タンパク質は、曲率産生タンパク質、一例として、Epsin1、ダイナミン、またはBARドメインを含むタンパク質、例を挙げるなら、Kozlov et al., CurrOp Struc Bio 2015 Aug;33:61-67; Zimmerberg et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Jan;7(1):9-19; Richard et al., Biochem J. 2011 Dec 1;440(Pt 2):185-193に記載されるものなどを含み、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0165】

いくつかの場合において、細胞融合タンパク質は、非哺乳動物タンパク質、一例として、ウイルス細胞融合タンパク質を包含する。いくつかの態様において、ウイルス細胞融合タンパク質は、クラスIウイルス膜細胞融合タンパク質、クラスIIウイルス細胞融合タンパク質、クラスIIIウイルス膜細胞融合タンパク質、ウイルス細胞融合タンパク質、もしくは他のウイルス細胞融合タンパク質、またはそのホモログ、その断片、そのバリエーション、または1以上のタンパク質もしくはその断片を含むタンパク質融合体である。本明細書に開示されるVLPで使用されることができるクラスIウイルス細胞融合タンパク質の例は、バキュロウイルスFタンパク質、一例として、核多角体病ウイルス(NPV)属のFタンパク質、一例として、*Spodoptera exigua* MNPV(SeMNPV)Fタンパク質および*Lymantria dispar* MNPV(LdMNPV)、インフルエンザHA、パラインフルエンザF、HIV Env、エボラGP、オルトミクソウイルスからの赤血球凝集素、パラミクソウイルスからのFタンパク質(一例として、麻疹(Katoh et al. BMC Biotechnology 2010,10:37))、レトロウイルスからのENVタンパク質、ならびにフィロウイルスおよびコロナウイルスの細胞融合タンパク質を包含するが、これらに限定されない。複数の態様において、 Dengue糖タンパク質などのクラスIIウイルス細胞融合タンパク質は、再構築して三量体のヘアピンをもたらす、細長いエクトドメインを形成するβシートの構造的シグネチャーを有する。複数の態様において、クラスIIウイルス細胞融合タンパク質は、中心コイルドコイルを欠く。本明細書に開示されるVLPで使用されることができるクラスIIウイルス細胞融合タンパク質の例は、ダニ媒介脳炎E(TBEV E)、セムリキ森林ウイルスE1/E2、ならびにシンドビス、風疹ウイルス、および Dengueウイルスに由来する細胞融合タンパク質を包含するが、これらに限定されない。複数の態様において、水疱性口内炎ウイルスG糖タンパク質などのクラスIIIウイルス細胞融合タンパク質は、クラスIおよびクラスIIに見られる構造的シグネチャーを組み合わせる。複数の態様において、クラスIIIウイルス細胞融合タンパク質は、ヘリックス(一例として、クラスIウイルス細胞融合タンパク質と同様にタンパク質を折り返すための6ヘリックスバンドルを形成)と、クラスIIウイルス細胞融合タンパク質を連想させるその末端に両親媒性融合ペプチドを有する3つのシートと、を含む。本明細書に開示されるVLPで使用されることができるクラスIIIウイルス細胞融合タンパク質の例は、ラブドウイルスG(一例として、水疱性口内炎ウイルスのタンパク質G(VSV-G))、ヘルペスウイルス糖タンパク質B(一例として、単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)gB)、エプスタイン・バーウイルス糖タンパク質B(EBV gB)、ソグトウイルスG、バキュロウイルスgp64(一例として、*Autographa California*複数NPV(AcMNPV)gp64)、およびボルナ病ウイルス(BDV)糖タンパク質(BDV G)を包含するが、これらに限定されない。複数の態様において、クラスIVウイルス細胞融合タンパク質は、融合関連小膜貫通(fusion-associated small transmembrane:FAST)タンパク質(doi:10.1038/sj.emboj.7600767, Nesbitt, Rae L., "Targeted Intracellular Therapeutic Delivery Using Liposomes Formulated with Multifunctional FAST proteins" (2012) Electronic Thesis and Dissertation Repository. Paper 388)であり、これらは、非エンベロープ型レオウイルスによってコードされる。複数の態様において、クラスIVウイルス細胞融合タンパク質は、ヘアピンを形成しないほど十分に小さい(doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122422, doi:10.1016/j.devcel.2007.12.008)。

【0166】

本明細書に開示されるVLPで使用されることができる他のウイルス細胞融合タンパク質の非限定的な例は、以下を包含するが、これらに限定されない:インフルエンザ赤血球凝集素(HA)もしくは突然変異などのウイルス合胞体タンパク質、またはその融合タンパク質;ヒト免疫不全ウイルス1型細胞融合タンパク質(HIV-1 ENV)、リンパ球合胞体を形成するためのHIV結合LFA-1からのgp120、HIV gp41、HIV gp160、またはHIVの転写のトランスアクチベータ(TAT);ウイルス糖タンパク質VSV-G、ラブドウイルス科の水疱性口内炎ウイルスからのウイルス糖タンパク質;水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の糖タンパク質gBおよびgH-gL;マウス白血病ウイルス(MLV)-10A1;テナガザル白血病ウイルス糖タンパク質(GaLV);狂犬病、モコラ、水疱性口内炎ウイルスおよびトガウイルスにおけるG型糖タンパク質;マウス肝炎ウイルスJHM表面突起タンパク質;ブタ呼吸器コロナウイルススパイクおよび膜糖タンパク質;鶏伝染性気管支炎スパイク糖タンパク質およびその前駆体;ウシ腸内コロナウイルススパイクタンパク質;麻疹ウイルスのFおよびH、HNまたはG遺伝子;イヌジステンパーウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス3、シミアンウイルス41、センダイウイルスおよび呼吸器多核体ウイルス;シャペロンタンパク質gLを伴う、ヒトヘルペスウイルス1およびサル水痘ウイルスのgH;ヒト、ウシ、およびサルヘルペスウイルスgB;フレンドマウス白血病ウイルスおよびMason Pfizerモンキーウイルスのエンベロープ糖タンパク質;ムンプスウイルス赤血球凝集素ノイラミニダーゼ、ならびに糖タンパク質F1およびF2;ベネズエラウマ脳炎からの膜糖タンパク質;パラミクソウイルスFタンパク質;SIV gp160タンパク質;エボラウイルスGタンパク質;またはセンダイウイルス融合タンパク質、もしくはそのホモログモルビリウイルス、その断片、そのバリエーション、またはこれらのいずれかの組合せ。いくつかの場合において、ウイルス細胞融合タンパク質は、麻疹ウイルス赤血球凝集素(HA)タンパク質および/または麻疹ウイルス融合糖タンパク質、インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ(NA)タンパク質、麻疹ウイルスFタンパク質、インフルエンザウイルスHAタンパク質、モロニーウイルスMLV-Aタンパク質、モロニーウイルスMLV-Eタンパク質、ヒビ内在性レトロウイルス(BAEV)細胞融合タンパク質、エボラウイルス糖タンパク質、泡沫状ウイルス細胞融合タンパク質、またはそれらのホモログ、それらの断片、それらのバリエーション、またはこれらのいずれかの組合せを含む。

10

20

30

40

50

【0167】

本明細書に開示されるVLPで使用されることができる他のウイルス細胞融合タンパク質の非限定的な例は、以下を包含するが、これらに限定されない:トガウイルス科CHIVのオルトミクソウイルス科インフルエンザA、Eタンパク質E1およびE2サブユニット(一緒におよび別々に複合体を包含する)から由来する赤血球凝集素(HA)もしくはノイラミニダーゼ(NA)タンパク質;コロナウイルス科-SARSおよびCOVID19からのS、E、もしくはMNタンパク質;パラミクソウイルス科ニパウイルスからのFもしくはGタンパク質;フィロウイルス科エボラからのGPタンパク質;フラビウイルス科デングウイルスからのEタンパク質;フェヌイウイルス科-砂バエ熱ウイルスからのGnおよびGcタンパク質(一緒におよび別々に複合体中に包含される);アレナウイルス科ラッサウイルスからのGPタンパク質;ハantaウイルス科ハantaウイルスからのGnおよびGcタンパク質(一緒におよび別々に複合体中に包含される);ボルナウイルス科ボルナ病ウイルスからのGタンパク質;ブニヤウイルス科クリミア・コンゴ出血熱ウイルスからのGnおよびGcタンパク質(一緒におよび別々に複合体中に包含される);ヘパドナウイルス科B型肝炎ウイルスからのS、M、もしくはLタンパク質;ヘルペスウイルス科単純ヘルペスウイルス1からの細胞融合タンパク質;ポックスウイルス科痘瘡ウイルスからのEVタンパク質;D型肝炎からのS、L、もしくはMタンパク質;または、ヘペウイルス科(Hepeviridae)E型肝炎ウイルスからの糖タンパク質、またはそのホモログ、その断片、そのバリエーション、および1以上のタンパク質もしくはその断片を含むタンパク質融合。

【0168】

いくつかの態様において、細胞融合タンパク質は、パラミクソウイルスに由来する。いくつかの態様において、細胞融合タンパク質は、ニパウイルスタンパク質F、麻疹ウイル

スFタンパク質、ツパイパラミクスウイルスFタンパク質、パラミクスウイルスFタンパク質、ヘンドラウイルスFタンパク質、ヘニパウイルスFタンパク質、モルビリウイルス(M orbilivirus)Fタンパク質、レスピロウイルスFタンパク質、センダイウイルスFタンパク質、ルブラウイルスFタンパク質、またはアブラウイルスFタンパク質である。

【0169】

いくつかの態様において、細胞融合タンパク質は、ポックスウイルス科に由来する。追加的な例示的細胞融合タンパク質は、米国特許第9,695,446号、同第2004/0028687号、米国特許第6,416,997号、同第7,329,807号、同第2017/0112773号、同第2009/0202622号、および同第2004/0009604号、ならびに国際公開第2006/027202号および同第2020102709号に開示されており、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0170】

いくつかの態様において、細胞融合タンパク質は、EFF-1、AFF-1、ギャップジャンクションタンパク質、一例として、コネキシン(Cn43、GAP43、CX43など)(DOI:10.1021/jacs.6b05191)、他の腫瘍接続タンパク質、そのホモログ、その断片、そのバリエーション、および1以上のタンパク質またはその断片を含むタンパク質融合物を包含する。

【0171】

本明細書に開示される細胞融合タンパク質は、融合タンパク質中のアミノ酸残基を突然変異させることによって再標的化されることができる(一例として、赤血球凝集素タンパク質)。いくつかの態様において、エンベロープタンパク質は、ランダムに突然変異される。いくつかの態様において、エンベロープタンパク質は、合理的に突然変異される。いくつかの態様において、エンベロープタンパク質は、定向進化に供される。

20

【0172】

本明細書に開示される細胞融合タンパク質は、標的化部分を共有結合的にコンジュゲートすることによって再標的化されることができる。実例としては、細胞融合タンパク質は、標的化部分へ連結されたエンベロープタンパク質を含むキメラタンパク質の発現によって、標的化部分へ共有結合的にコンジュゲートされることができる。標的化部分の標的は、標的細胞上に提示されるあらゆるペプチド(一例として、受容体)を包含する。いくつかの例において、標的は、非標的細胞よりも標的細胞上でより高いレベルにて発現される。

30

【0173】

標的化部分は、例えば筋肉、脳、肝臓、脾臓、および肺などの特定の組織型を標的化するために、例えば、または腫瘍などの疾患組織を標的化するために、選択されることができる。本発明の特に好ましい態様において、エキソソームは、脳組織を標的とする。

【0174】

標的化部分の具体的な非限定的な例は、骨格筋を標的化するためのファージディスプレイによって発見された筋肉特異的ペプチド、アセチルコリン受容体へ結合する狂犬病ウイルス糖タンパク質の29アミノ酸断片、またはその受容体を標的ニューロンへと標的化する神経成長因子の断片を包含し、かつ、セクレチン受容体へ結合するセクレチンペプチドは、胆管上皮および脾臓上皮を標的化するために使用されることができる。代替として、scFv抗体断片を包含する免疫グロブリンおよびそれらの誘導体はまた、がん遺伝子療法のためのVEGFRなどの特異的抗原を標的とする融合タンパク質として発現されることもできる。代替として、受容体に対する天然リガンドを、NGFRに結合し、ニューロン特異的標的化を付与するNGFなどの、特異性を付与する融合タンパク質として発現されることができる。

40

【0175】

標的化部分は、一例として、抗体またはその抗原結合断片(一例として、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、scFv抗体断片、ジスルフィド連結Fv(sdFv)、VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片、線状抗体、単ドメイン抗体、例を挙げるならsdAb(VLまたはVHのいずれか)、ナノボディ、またはラクダ類VHHドメイン)など、抗原結合性フ

50

ィブロネクチンIII型(Fn3)足場、例を挙げるならフィブロネクチンポリペプチドミニボディ、リガンド、サイトカイン、ケモカイン、またはT細胞受容体(TCR)などを包含することができる。細胞融合タンパク質は、標的化部分を、融合タンパク質または標的化タンパク質(一例として、赤血球凝集素タンパク質)へ非共有結合的にコンジュゲートすることによって再標的化されてもよい。例えば、融合タンパク質は、標的細胞上の抗原を標的化する抗体のFc領域に結合し、融合活性を抗体の標的を提示する細胞に向け直すように操作されることができる。

【0176】

標的化部分は、一例として、ヒト化抗体分子、インタクトIgA、IgG、IgE、またはIgM抗体;二重特異性または多重特異性抗体(一例として、Zybodies(登録商標)、等);Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fd'断片、Fd断片、および単離されたCDRまたはそのセットなどの、抗体断片;単鎖Fvs;ポリペプチドFc融合体;単ドメイン抗体(一例として、IgNARまたはその断片などのサメ単ドメイン抗体);ラクダ抗体;マスクされた抗体(一例として、Probodyes(登録商標));小モジュール免疫医薬品(「SMIPs(商標)」);単鎖またはタンデムダイアボディ(TandAb(登録商標));VHH;Anticalins(登録商標);Nanobodies(登録商標);ミニボディ;BiTE(登録商標);アンキリン反復タンパク質またはDARPIN(登録商標);Avimers(登録商標);DART;TCR様抗体;Adnectins(登録商標);Affilins(登録商標);Trans-bodies(登録商標);Affibodies(登録商標);TrimerX(登録商標);Micro Proteins;Fynomers(登録商標)、Centyrins(登録商標);ならびに、KALBITOR(登録商標)を含むことができる。

10

20

【0177】

複数の態様において、細胞融合タンパク質へ連結された標的化部分は、標的細胞上の細胞表面マーカー、一例として、タンパク質、糖タンパク質、受容体、細胞表面リガンド、アゴニスト、脂質、糖、クラスI膜貫通タンパク質、クラスII膜貫通タンパク質、またはクラスIII膜貫通タンパク質へ結合する。

【0178】

いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクル(一例として、VLP、エキソソーム、または脂質ナノ粒子)はまた、標的化部分によって結合される細胞向けに送達ビヒクルの融合活性を向け直すために、または標的細胞に向けた送達ビヒクルのホーミングに影響を及ぼすために、細胞融合タンパク質または他のタンパク質へコンジュゲート

30

【0179】

ウイルス様粒子(一例として、「脂質含有粒子」)

いくつかの側面において、細胞中へとカーゴを送達するために利用されることができるウイルス様粒子に関連する、組成物、方法、およびシステムが、本明細書に開示される。

【0180】

本明細書に開示されるウイルス様粒子(VLP)は、VLPの構造タンパク質およびエンベロプタンパク質などの、1以上のウイルス由来タンパク質を含むことができる。いくつかの場合において、ウイルス由来タンパク質は、VLPを形成する融合タンパク質の一部として存在する。

40

【0181】

いくつかの場合において、本明細書に開示されるVLPの負荷容量は、従来のVLPよりも、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、12倍、14倍、16倍、18倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、80倍、100倍高い負荷容量を有する。

【0182】

VLPの構造タンパク質

いくつかの場合において、本明細書に記載される構造タンパク質は、ウイルス様粒子の基本構造、一例として、VLPの管腔をカプセル化するカプシドの少なくとも一部を形成する。ウイルス様粒子の構造タンパク質は、原形質膜局在化タンパク質を包含することが

50

できる。いくつかの場合において、本明細書に記載される原形質膜局在化タンパク質はまた、VLPのセルフアセンブリを促進し、一例として、膜エンクロージャを形成することによって原形質膜の局在化およびウイルス様粒子のパッケージングを促進する。いくつかの場合において、本明細書に記載される構造タンパク質は、VLPが生産される生産細胞からのVLPの放出を促進する。

【0183】

いくつかの場合において、VLPの構造タンパク質(一例として、原形質膜局在化タンパク質)は、一例として、ウイルスに由来するウイルスタンパク質である。いくつかの場合において、VLPの構造タンパク質は、一例として、哺乳動物、一例として、ヒトに由来する哺乳動物タンパク質である。いくつかの場合において、VLPの構造タンパク質は、ヒト内在性タンパク質である。

10

【0184】

いくつかの場合において、VLPの構造タンパク質(一例として、原形質膜局在化タンパク質)は、ウイルス、そのホモログ、その断片、そのバリエーション、またはこれらのいずれかの組合せに由来するポリタンパク質である。実例としては、VLPの構造タンパク質(一例として、原形質膜局在化タンパク質)は、レトロウイルスgagタンパク質、一例として、マトリックス(MA)ポリペプチド、RNA結合リンタンパク質ポリペプチド、カプシド(CA)ポリペプチド、またはヌクレオカプシド(NC)ポリペプチドのうち1以上を含む、レトロウイルスポリタンパク質を含む。いくつかの場合において、gagタンパク質は、フレンドマウス白血病ウイルス(FMLV)に由来する。いくつかの場合において、レトロウイルスgagポリタンパク質は、アルファレトロウイルス、ベータレトロウイルス、ガンマレトロウイルス、デルタレトロウイルス、イプシロンレトロウイルス、またはスプーマウイルスのgagポリタンパク質である。いくつかの場合において、レトロウイルスgagポリタンパク質は、ヒト免疫不全ウイルスのgagポリタンパク質である。

20

【0185】

VLP(一例として、原形質膜局在化タンパク質)の構造タンパク質の非限定的な例は、ヒトパピローマウイルス(HPV)L1タンパク質、HPV L2タンパク質、B型肝炎ウイルス(HBV)コアタンパク質、チクングニアウイルス(CHIKV)C-E3-E2-6k-E1、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)gag-pol、HIV gag、呼吸器多核体ウイルス(RSV)M、RSV NP、ヒトメタニューモウイルス(HMPV)M、インフルエンザM1、ジカウイルス(ZIKV)C、ZIKV prM/M、デングウイルス(DENV)C-prM、ウエストナイルウイルス(WNV)prMEタンパク質、WNV CprMEタンパク質、フィロウイルスVP40またはZタンパク質、バキュロウイルスP1タンパク質、ロタウイルスVP7、ロタウイルスVP2タンパク質、ロタウイルスVP6タンパク質、SARS Mタンパク質、SARS Eタンパク質、SARS Nタンパク質、ブタサーコウイルス2型(PCV2)カプシド、バキュロウイルスVP2タンパク質、バキュロウイルスVP5タンパク質、バキュロウイルスVP3タンパク質、もしくはバキュロウイルスVP7タンパク質、C型肝炎ウイルス(HCV)コアタンパク質、エボラヌクレオカプシド、パロウイルスVP1タンパク質、パロウイルスVP2タンパク質、ニューカッスル病ウイルス(NDV)Mタンパク質、E型肝炎ウイルス(HeV)Mタンパク質、ニパウイルス(NIV)Mタンパク質、ヒトポリオーマウイルス2(JCPyV)VP1タンパク質、ヒトパラインフルエンザウイルス3型(HPIV3)Mタンパク質、HPIV3Nタンパク質、またはムンプスウイルス(MuV)Mタンパク質、それらのホモログ、それらの断片、それらのバリエーション、またはこれらのいずれかの組合せを含む。

30

40

【0186】

エンベロープタンパク質

いくつかの場合において、本明細書に開示されるVLPは、外側脂質ベースの膜(「エンベロープ」)を含む。いくつかの場合において、エンベロープは、脂質の単一層を含む。いくつかの場合において、エンベロープは、脂質二重層を含む。いくつかの場合において、エンベロープは、脂質層へ挿入、脂質層へ付着、または脂質層に係留される、細胞融合タンパク質(VLPの「エンベロープタンパク質」とも称される)をさらに含む。

50

【0187】

エンベロープタンパク質は、膜、一例として細胞膜へのVLPの融合を促進することができる。いくつかの場合において、エンベロープタンパク質は、VLPの向性、一例として、1以上のある特定の型の細胞へのVLPの優先的融合を媒介する。いくつかの場合において、エンベロープタンパク質は、VLP中の脂質と標的細胞中の脂質との間の混合をもたらす。エンベロープタンパク質は、上に開示された細胞融合タンパク質のいずれかであることができる。いくつかの場合において、エンベロープタンパク質は、上に開示された標的化部分を含む融合タンパク質であることができる。

【0188】

いくつかの場合において、VLPのエンベロープタンパク質は、ある特定の特性、一例として、選択された細胞の群に対する特定の向性について、VLPをシュードタイプ化するように操作される。いくつかの場合において、VLPのエンベロープタンパク質は、シュードタイプ化ウイルス糖タンパク質であり、たとえば、これらに限定されないが、ウイルス糖タンパク質は、B型肝炎ウイルス(HBV)糖タンパク質、C型肝炎ウイルス(HCV)糖タンパク質、マールブルグウイルス糖タンパク質、エボラウイルス糖タンパク質、VSV-G糖タンパク質から選択される;および標的細胞は、肝臓細胞である。いくつかの場合において、VLPのエンベロープタンパク質は、シュードタイプ化ウイルス糖タンパク質であり、たとえば、これらに限定されないが、ウイルス糖タンパク質は、インフルエンザウイルス赤血球凝集素、SARS-CoV糖タンパク質、呼吸器多核体ウイルス糖タンパク質、ヒトパラインフルエンザウイルス糖タンパク質、およびVSV-Gから選択され、および標的細胞は、肺細胞である。いくつかの場合において、VLPのエンベロープタンパク質は、シュードタイプ化ウイルス糖タンパク質であり、たとえば、これらに限定されないが、ウイルス糖タンパク質は、麻疹ウイルス赤血球凝集素および/または麻疹ウイルス融合糖タンパク質である;および標的細胞は、CD34⁺細胞である。いくつかの場合において、VLPのエンベロープタンパク質は、シュードタイプ化ウイルス糖タンパク質であり、たとえば、これらに限定されないが、ウイルス糖タンパク質は、麻疹ウイルス赤血球凝集素および/または麻疹ウイルス融合糖タンパク質、HTLV-1糖タンパク質、およびVSV-G糖タンパク質から選択される;および標的細胞は、CD8⁺T細胞である。いくつかの場合において、VLPのエンベロープタンパク質は、シュードタイプ化ウイルス糖タンパク質であり、たとえば、これらに限定されないが、ウイルス糖タンパク質は、HIV-1エンベロープ、HTLV-1糖タンパク質、麻疹ウイルス赤血球凝集素、およびVSV-G糖タンパク質から選択される;および標的細胞は、CD4⁺T細胞である。いくつかの場合において、VLPのエンベロープタンパク質は、ロスリバーウイルス糖タンパク質またはVSV-Gなどであるが、これらに限定されない、シュードタイプ化ウイルス糖タンパク質である;および標的細胞は、骨格筋細胞である。いくつかの場合において、VLPのエンベロープタンパク質は、シュードタイプ化ウイルス糖タンパク質であり、たとえば、これらに限定されないが、ウイルス糖タンパク質は、エボラウイルス糖タンパク質、マールブルグウイルス糖タンパク質、およびVSV-Gから選択される;および標的細胞は、(一例として、網膜細胞、光受容細胞等における)視覚細胞である。いくつかの場合において、VLPのエンベロープタンパク質は、シュードタイプ化ウイルス糖タンパク質であり、たとえば、これらに限定されないが、ウイルス糖タンパク質は、エボラウイルス糖タンパク質、マールブルグウイルス糖タンパク質、およびVSV-Gから選択される;および標的細胞は、聴覚細胞(一例として、毛髪細胞、蝸牛細胞等)である。いくつかの場合において、VLPのエンベロープタンパク質は、シュードタイプ化ウイルス糖タンパク質であり、たとえば、これらに限定されないが、ウイルス糖タンパク質は、狂犬病糖タンパク質、モコラウイルス糖タンパク質、セムリキ森林ウイルス糖タンパク質、シンドビスウイルス糖タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス糖タンパク質、インフルエンザ赤血球凝集素糖タンパク質、およびVSV-Gから選択される;ここで標的細胞は、中枢神経システム細胞(一例として、ニューロン(一例として、興奮性および阻害性ニューロン);およびグリア細胞(一例として、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、およびミクログリア))である。

10

20

30

40

50

【0189】

核酸編集効率

いくつかの態様において、本明細書において提供される脂質含有粒子(一例として、ウイルス様粒子)は、細胞と接触して細胞内側の核酸分子を編集する場合、改善された核酸編集効率を有する。

【0190】

実例としては、いくつかの場合において、NESを包含する融合タンパク質またはNESを包含する切断産物を含む本明細書において提供される脂質含有粒子は、他の点では同じであるが、しかし融合タンパク質または切断産物中にNESを有しない、対応する脂質含有粒子と比較して、より高い核酸編集効率、一例として、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、180%、200%、220%、250%、280%、300%、400%、500%、600%、800%、または1000%高い核酸編集効率を有することができる。

10

【0191】

いくつかの場合において、本明細書において提供される脂質含有粒子は、治療用カーゴの配列とNESとの間に位置づけられる切断可能リンカーを含む融合タンパク質を含み、そのような脂質含有粒子は、他の点では同じであるが、しかし治療用カーゴの配列およびNESが融合タンパク質中の切断可能リンカーの同じ側に位置づけられる、対応する脂質含有粒子と比較して、より高い核酸編集効率、一例として、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、180%、200%、220%、250%、280%、300%、400%、500%、600%、800%、または1000%高い核酸編集効率を有する。

20

【0192】

いくつかの場合において、本明細書において提供される脂質含有粒子は、gagヌクレオカプシドタンパク質の配列および核外移行配列(NES)を含み、かつ治療用カーゴを欠く、切断産物を含み、そのような脂質含有粒子は、対応する脂質含有粒子において切断産物がgagヌクレオカプシドタンパク質を含むが、しかしNESおよび治療用カーゴの両方を欠くことを除いて他の点では同じである、対応する脂質含有粒子と比較して、より高い核酸編集効率、一例として、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、180%、200%、220%、250%、280%、300%、400%、500%、600%、800%、または1000%高い核酸編集効率を有する。

30

【0193】

いくつかの場合において、本明細書において提供される脂質含有粒子において、融合タンパク質の量に対するタンパク質コアの内側に存在する治療用カーゴの量の比は、少なくとも1.5であり、そのような脂質含有粒子は、対応する脂質含有粒子において、融合タンパク質の量に対するタンパク質コアの内側に存在する治療用カーゴの量の比が、本明細書において提供される脂質含有粒子における比よりも低く、一例として、1.5未満であることを除いて他の点では同じである、対応する脂質含有粒子と比較して、より高い核酸編集効率、一例として、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、180%、200%、220%、250%、280%、300%、400%、500%、600%、800%、または1000%高い核酸編集効率を有する。

40

【0194】

本明細書において提供される脂質含有粒子の核酸編集効率は、当業者に公知のあらゆる好適な技術を用いて測定されることができる。いくつかの場合において、これは、標的核酸分子が細胞の集団へ接触させた脂質含有粒子の所与の集団によって編集された細胞のパーセンテージを、集団中の細胞の総数に対して計算することによって、測定される。いくつかの場合において、核酸編集効率は、集団中の脂質含有粒子の量、一例として、脂質含有粒子の数、脂質含有粒子の濃度、または細胞と接触する脂質含有粒子を含む液体組成物の体積によって正規化される。いくつかの場合において、本明細書において提供される脂質含有粒子の核酸編集効率は、両方の脂質含有粒子の核酸編集性能を、一連の異なる量、

50

一例として、数、濃度、または体積で試験されるアッセイによって、対応する脂質含有粒子と比較される。このようにして、用量応答曲線は、試験した脂質含有粒子についてプロットされることができ、相対的な核酸編集効率は、そのような用量応答曲線に由来することができる。核酸編集効率を測定する例示的な方法は、本開示の例に記載される方法を含む。

【0195】

ヒト内在性VLPおよびヒト化VLP

いくつかの側面において、ヒト対象に対する免疫原性が低減しているかまたは全くないウイルス様粒子、一例として、非ウイルス性ヒト内在性ウイルス様粒子(heVLP)、またはヒト化ウイルス構成要素(一例として、ヒト化ウイルス構造タンパク質またはヒト化ウイルスエンベロープタンパク質)を含むヒト化VLPが、本明細書において提供される。

10

【0196】

本開示のいくつかの態様によるウイルス様粒子とは異なり、本明細書に記載されるheVLPまたはヒト化VLPは、全ての生産DNAを、生産細胞株のゲノムDNAへと統合することによって、タンパク質カーゴをパッケージングすることができる。細胞株が作製されると、タンパク質送達heVLPは、構成的または誘導可能な様式で生産されることができる。タンパク質カーゴは、選択されたヒト内在性GAGタンパク質または他の原形質膜局在化タンパク質(本明細書において「原形質膜動員ドメイン」とも称される)を、タンパク質ベースのカーゴへ融合することによって、heVLPへとパッケージングされる。

20

【0197】

本明細書に記載されるheVLPまたはヒト化VLPシステムは、heVLPまたはヒト化VLPがヒト由来またはヒト化構成要素から構成されるので、従来の人工由来脂質/金ナノ粒子およびウイルス粒子ベースの送達システムよりも、単純、より効率的、かつ安全である可能性を有する。粒子内側のカーゴは、ヒト由来であってもよいが、またはヒト由来でなくともよく、しかし、heVLPまたはヒト化VLPは、ヒトに由来するか、またはヒト内在性構成要素もしくは合成非免疫原性構成要素を含む。

【0198】

「合成」構成要素は、免疫賦活性ではないことが実証されており、heVLPの標的化および細胞取り込みを増強するために使用されることができる、表面scFv/ナノボディ/darpinペプチドを含む。これは、粒子の外表面が、これらの粒子の免疫原性および抗体中和を最小限に抑えることができる、有意に免疫賦活性であることができる構成要素を欠くことを意味する。

30

【0199】

いくつかの場合において、カーゴを除いて、本明細書において提供されるheVLPは、他のVLPに固有の外來性ウイルス構成要素を含有せず、これは、技術の重要かつ新規な進歩を表す。くわえて、heVLPは、化学ベースの二量体化剤を利用することができ(しかし、必要ではない)、heVLPは、生体分子および化学物質、一例として、特殊な単ストランドおよび/または二重ストランドDNA分子(一例として、プラスミド、ミニサークル、クローズドエンド線状DNA、AAV DNA、エピソーム、バクテリオファージDNA、相同組換え修復テンプレート等)、単ストランドおよび/または二重ストランドRNA分子(一例として、単一ガイドRNA、プライム編集ガイドRNA、メッセンジャーRNA、転移RNA、長鎖非コードRNA、環状RNA、RNAレプリコン、環状または線状スプライシングRNA、マイクロRNA、低分子干渉RNA、短鎖ヘアピンRNA、piwi-相互作用RNA、トーホールドスイッチRNA、RNA結合タンパク質が結合されることができるRNA、バクテリオファージRNA、内部リボソーム進入部位含有RNA等)、タンパク質、化学化合物および/または分子(一例として、小分子)、ならびに上に列挙したカーゴの組合せ(一例として、AAV粒子)を含む、治療薬または診断剤を含むカーゴ分子をパッケージングおよび送達する能力を有することができる。

40

【0200】

少なくとも、heVLPが、ヒト細胞におけるヒト由来構成要素の戦略的過剰発現によっ

50

て生産されることができ、heVLPが、考えられるカーゴおよび負荷戦略の膨大な多様性を有し、heVLPが、限定的なDNA/RNA長さの制約を欠き、heVLPが、polおよび外来性gagに由来するタンパク質を欠き、かつheVLPが、ユニークな細胞侵入機序を有するので、本明細書に記載されるheVLPは、従来のレトロウイルス粒子、ウイルス様粒子(VLP)、エキソソーム、およびカーゴで負荷されることができる他の前述された細胞外小胞とは異なる。

【0201】

多くの疾患療法に適用可能である、ゲノム編集、エピゲノムモジュレーション、トランスクリプトーム編集、およびプロテオームモジュレーション試薬を包含する、多様な一連のタンパク質および核酸分子と共に使用されることができるカーゴ送達のための組成物および方法が、本明細書に記載される。

10

【0202】

いくつかの側面において、1以上のHERV由来ENV/糖タンパク質(複数可)(一例として、プラスミドまたは安定に統合された導入遺伝子などの外来性供給源から、heVLP生産細胞において過剰発現される)(一例として、表1に示すとおり)、または外側に他のヒト内在性エンベロープタンパク質を有する、リン脂質二重層を含む、膜と;ヒト内在性GAGタンパク質、他の原形質膜局在化タンパク質(一例として、表2に示すとおり)、および/または膜の内側のheVLPのコアに置かれた生体分子/化学カーゴ(一例として、リン脂質二重層によって取り囲まれた管腔内)と、を含む、操作されたheVLPが、本明細書において提供される。

20

【0203】

いくつかの側面において、1以上のHERV由来ENV/糖タンパク質(複数可)(一例として、プラスミドまたは安定に統合された導入遺伝子などの外来性供給源から、heVLP生産細胞において、過剰発現される)(一例として、表1に示すとおり)、または外側における他にヒト内在性エンベロープタンパク質を有する、リン脂質二重層を含む、膜と;膜の内側のウイルス構造タンパク質(一例として、レトロウイルスgagタンパク質)(一例として、リン脂質二重層によって取り囲まれた管腔内)と、を含む、ヒト化VLPが、本明細書において提供される。

【0204】

いくつかの側面において、本明細書に開示される1以上のウイルスエンベロープタンパク質を有するリン脂質二重層を含む膜と、膜の内側のheVLPのコアに置かれた、ヒト内在性GAGタンパク質、他の原形質膜局在化タンパク質、および/または生体分子/化学カーゴ(一例として、リン脂質二重層によって取り囲まれた管腔内)と、を含む、ヒト化VLPが、本明細書において提供される。

30

【0205】

カーゴは、ヒト内在性GAGまたは他の原形質膜局在化タンパク質へ融合されても、または融合されなくてもよい。いくつかの場合において、heVLPまたはヒト化VLPは、非ヒトgagおよび/またはpolタンパク質を含まない。いくつかの場合において、heVLPまたはヒト化VLPは、ヒトゲノムにコードされるgagタンパク質、またはヒトゲノムに見出されるgagタンパク質に由来するコンセンサス配列によってコードされるgagタンパク質を除いて、gagおよび/またはpolタンパク質を発現しない。ヒト由来GAGまたはカーゴへ融合された他の原形質膜局在化タンパク質は、heVLP生産細胞において、プラスミドまたは安定に統合された導入遺伝子などの外来性供給源から過剰発現されることができる。

40

【0206】

ヒト内在性GAGタンパク質およびヒトプレクストリン相同(PH)ドメインは、生体膜に局在することができる。PHドメインは、PIP2、PIP3、GPCRのbgサブユニット、およびPKCなどの、生体膜内のホスファチジルイノシトール脂質およびタンパク質と相互作用することができる。しかしながら、リン脂質二重層への局在化に加えて、ヒト内在性GAGタンパク質もまた、出芽および粒子形成を駆動することができる。ヒト内在性GAGの

50

この二重機能性は、カーゴのパッケージング、および粒子の出芽/形成を可能にすることができる。この目的のために使用されるそのようなヒト内在性GAGタンパク質の1つは、タンパク質ベースのカーゴへ融合され、カーゴをリン脂質二重層のサイトゾル側へ動員することができる、ヒトArcタンパク質である。これらのヒト内在性GAGリン脂質二重層動員ドメインは、カーゴ内の1以上の核局在化配列(NLS)の1つの場所または複数の場所にかかわらず、可変長のポリペプチドリンカーを介してタンパク質ベースのカーゴのN末端またはC末端へ融合されることができる。いくつかの場合において、タンパク質ベースのカーゴとヒト内在性GAGリン脂質二重層動員ドメインとの間のリンカーは、主に、グリシンおよびセリンで構成される、5～20アミノ酸長、一例としてアミノ酸長8～12、一例として10アミノ酸長のポリペプチドリンカーである。

10

【表1】

表1. 例示的な HERV エンベロープタンパク質

#	HERV エンベロープ	遺伝子名	受託番号	配列エントリでの 位置(a)
1.	hENVH1	envH/p62	AJ289709.1	6313–8067 (+)
2.	hENVH2	envH/p60	AJ289710.2	5393–7084 (+)
3.	hENVH3	envH/p59	AJ289711.1	5204–6871 (+)
4.	hENVK1	envK1	AC074261.3	93508–95604 (+)
5.	hENVK2	envK2/HML- 2.HOM	AC072054.10	30365–32464 (-)
6.	hENVK3	envK3/C19	Y17833.1	5581–7680 (+)
7.	hENVK4	envK4/K109	AF164615.1	6412–8508 (+)
8.	hENVK5	envK5/K113	AY037928.1	6451–8550 (+)
9.	hENVK6	envK6/K115	AY037929.1	6442–8541 (+)
10.	hENVT	envT	AC078899.1	154738–156618 (+)
11.	hENVW	Syncytin-1	AC000064.1	35879–37495 (+)
12.	hENVFRD	Syncytin-2	AL136139.6	21355–22972 (-)
13.	hENVR	erv-3	AC073210.8	54963–56978 (-)
14.	hENVR(b)	envRb	AC093488.1	78681–80225 (+)
15.	hENVF(c)2	envFc2	AC016222.4	85216–86963 (+)
16.	hENVF(c)1	envFc1	AL354685.2	46744–48717 (-)
*17.	hENVK _{con}	N/A	N/A	N/A

20

30

40

^a 「+」 および 「-」 は、配列エントリ内の配向を指す。

*hENVK_{con} は、10 のプロウイルス ENV 配列に由来するコンセンサス配列である。このコンセンサス ENV 配列を誘導するために使用される ENV 配列は、以下の HERV からのものである:

HERV-K113、HERV-K101、HERV-K102、HERV-K104、HERV-K107、HERV-K108、HERV-K109、HERV-K115、HERV-K11p22、および HERV-K12q13。

50

【表 2】

表 2. 例示的な血漿膜動員ドメイン

#	血漿膜動員ドメイン	置換 (単数または複数)
1	ヒトホスホリパーゼ C δ 1(hPLC δ 1)のプレクストリン相同ドメイン	
	Akt1 のプレクストリン相同ドメイン	E17K
	hArc	
	hGAGK _{con}	
	ヒト 3-ホスホイノシチド依存性タンパク質キナーゼ 1(hPDK1)の プレクストリン相同ドメイン	
	ヒト CD9	
	ヒト CD47	
	ヒト CD63	
	ヒト CD81	

10

【0207】

ヒト内在性GAGまたは他のリン脂質二重層動員ドメインは、カーゴをリン脂質二重層へ局在化させることができ、このタンパク質カーゴは、生産細胞から細胞外空間へと出芽するheVLPまたはヒト化VLP内にパッケージングされる。この出願において、これらのヒト内在性GAGおよび他のリン脂質二重層動員ドメインの使用は、これらのヒト内在性GAGおよび他のタンパク質が、heVLPまたはヒト化VLP生産細胞内の原形質膜のサイトゾル面へのカーゴの局在化を促進することができ、外来性レトロウイルスGAGまたは化学的および/または光ベースの二量体化システムを利用することなく、カーゴが形質導入細胞の核へ局在することもまた可能にするという点において、新規かつ独特である。Cas9のheVLP送達、例えば、PH原形質膜局在化タンパク質との融合物または全く融合していないものと比較して、ヒト内在性GAGタンパク質との融合物で有意により効率的である。

20

【0208】

heVLPが生産細胞株の一過性トランスフェクションを介して生産される場合、heVLPはまた、DNAとRNAとの組合せをパッケージングおよび送達することもできる。細胞へとトランスフェクトされたDNAは、トランスフェクトされたDNAの分画がサイトゾルに留まるが、一方でトランスフェクトされたDNAの別の分画が核へ局在するように、サイズ依存性移動度を保有する。⁴⁴ ⁴⁶核内のトランスフェクトされたDNAの一方の分画は、heVLPを作製するために必要とされる構成要素を発現し、サイトゾル/原形質膜付近の他方の分画は、heVLPにカプセル化され送達される。

30

【0209】

外来性DNA、外来性RNA、およびタンパク質(外来性タンパク質および/または内在性タンパク質)の組合せは、1型カーゴ(T1 heVLP)と称され、外来性RNAおよびタンパク質(外来性タンパク質および/または内在性タンパク質)は、2型カーゴ(T2 heVLP)と称され、外来性DNAとタンパク質(外来性タンパク質および/または内在性タンパク質)の組合せは、3型カーゴ(T3 heVLP)と称され、タンパク質(外来性タンパク質および/または内在性タンパク質)は、4型カーゴ(T4 heVLP)と称される。したがって、T1は、DNA、RNA、+/-外来性タンパク質を含有し、T2は、RNA+/-外来性タンパク質を含有し、T3は、DNA+/-外来性タンパク質を含有し、T4は、外来性タンパク質カーゴの有無にかかわらず粒子である。これゆえに、「外来性カーゴ」が存在しないので、外来性タンパク質を有しないT4は、「中空粒子(empty particle)」と考えられる。「外来性カーゴ」とは、heVLPにパッケージングされる、および/またはheVLPへと組み込まれることができる生産細胞に対して内在性ではないカーゴである。くわえて、T1-T4heVLPは、T1-T4heVLPに存在するカーゴの種類に加えて、外来性化学分子をパッケージングすること

40

50

ができる。この文脈におけるRNAは、例えば、単一ガイドRNA(sgRNA)、クラスター化された規則的な配置の短い回文配列リピート(Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeat:CRISPR)RNA(crRNA)、および/またはカーゴをコードするmRNAであり得る。本明細書において使用される場合、「小分子」とは、約3,000ダルトン未満の分子量の有機小分子または無機小分子を指す。一般に、本発明に有用な小分子は、3,000ダルトン(Da)未満の分子量を有する。小分子は、一例として、少なくとも約100Da~約3,000Da(一例として、約100~約3,000Da、約100~約2500Da、約100~約2,000Da、約100~約1,750Da、約100~約1,500Da、約100~約1,250Da、約100~約1,000Da、約100~約750Da、約100~約500Da、約200~約1500、約500~約1000、約300~約1000Da、または約100~約250Da)であることができる。

10

【0210】

カーゴは、一例として、いくつかの態様においては150nm~500nmの範囲にわたる粒子の直径によって制限される。

【0211】

heVLP、ヒト内在性ウイルス構造タンパク質、および原形質膜局在化タンパク質の他の非限定的な例は、国際公開第2020/252455号に記載されているものを包含し、その全体は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0212】

いくつかの態様において、heVLPまたはヒト化VLPへのカーゴの効率的な動員のために、カーゴは、好ましくは表2に示すように、ヒト内在性GAGまたは他の原形質膜動員ドメインへの共有接続(covalent connection)または非共有接続(non-covalent connection)を含む。共有接続は、例えば、単一のリーディングフレームから産生される直接的なタンパク質-タンパク質融合、ペプチド結合を形成することができるインティン、R基で共有接続を形成することができる他のタンパク質、および/またはRNAスプライシングを包含することができる。非共有接続は、例えば、DNA/DNAハイブリッド、DNA/RNAハイブリッド、および/もしくはRNA/RNAハイブリッド(水素結合相互作用を介して他の核酸と塩基対を形成する核酸)、タンパク質-タンパク質結合を誘導するための化学的な化合物/分子を必要とするもしくは必要としない二量体化もしくは多量体化するタンパク質ドメイン(DmrA/DmrB/DmrC(タカラバイオ)、FKBP/FRB、dDZF、およびロイシンジッパーなど)、単鎖可変断片、ナノボディ、アフィボディ、DNAおよび/もしくはRNAへ結合するタンパク質、四次構造相互作用を有するタンパク質、ある特定の光波長の存在下において二量体化もしくは多量体化することができる光遺伝学的タンパク質ドメイン、ならびに/または天然に再構成するスプリットタンパク質を包含することができる。

20

30

【0213】

いくつかの態様において、カーゴは、二量体化またはタンパク質-タンパク質結合をトリガーするための分子を必要としてもよく、または必要としなくてもよい、二量体化ドメインまたはタンパク質-タンパク質結合ドメインとの融合物を含む。

【0214】

いくつかの態様において、生産細胞は、FDA承認細胞株、同種異系細胞、および/またはドナー由来の自己細胞である。いくつかの態様において、ヒトCD47の完全なまたは活性なペプチドドメインは、免疫原性を低減させるためにheVLP表面に組み込まれてもよい。本明細書に包含されるAAVタンパク質の例は、AAV REP 52、REP 78、およびVP1-3である。タンパク質が挿入されることができるカプシド部位は、VP1アミノ酸のカウントから始まるT138である。二量体化ドメインは、実例としては、カプシド内のこの点に挿入されることができる。小分子誘導物質を必要としてもよい、または小分子誘導物質を必要としなくともよい、本明細書に包含される二量体化ドメインの例は、dDZF1、dDZF2、DmrA(タカラバイオ)、DmrB(タカラバイオ)、DmrC(タカラバイオ)、FKBP、FRB、GCN4 scFv、10x/24x GCN4、GFPナノボディ、およびGFPである。本明細書に包含される分割インティンの例は、Npu DnaE、Cfa、Vma、およびSsp DnaEである。共有結合を一緒に作成する、本明細書に包含される他のスプリットタンパク質の例は

40

50

、Spy TagおよびSpy Catcherである。本明細書に包含されるRNA結合タンパク質の例は、MS2、Com、およびPP7である。本明細書に包含される合成DNA結合ジンクフィンガーの例は、ZF6/10、ZF8/7、ZF9、MK10、ジンクフィンガー268、およびジンクフィンガー268/NREである。本明細書に包含される四次構造の結果として多量体化するタンパク質の例は、E.coliフェリチン、およびフェリチンの他のキメラ形態である。本明細書に包含される光遺伝学的「光誘導性タンパク質」の例は、Cry2、CIBN、およびLov2-Jaである。本明細書に包含される形質導入を増強するペプチドの例は、L17E、Vectofusin-1(Miltenyi Biotec)、KALA、および様々な形態のナイシンである。

【0215】

別の態様において、生産および単離されたT1~T4 heVLPは、ヌクレオフェクション、脂質、ポリマー、またはCaChトランスフェクション、超音波処理、凍結融解、様々な温度でのインキュベーション、および/またはカーゴと混合した精製粒子の熱ショックを利用することによって、生体分子または化学分子カーゴを負荷されることができる。これらの技術は、治療または研究用途のためにエキソソームへとカーゴを負荷するために採用される技術から適合される。例えば、100 µgのheVLPまたはヒト化VLPは、PBS中の200~450 µLの50 mMトレハロース中に再懸濁され、所望の濃度でカーゴと混合され、0.200 kVおよび125 µFで0.4 cmキューベットにおいて電気穿孔(容量拡張器を備えたGene Pulser II Electroporation System、Bio-Rad、Hercules、CA、USA)されることができる。

【0216】

好ましくは、heVLPまたはヒト化VLPは、トランスフェクションの36~48時間後、またはheVLPまたはヒト化VLPが生産細胞の培地中で最大濃度である場合に、細胞培養培地上清から採取される(生産細胞は、粒子を培地中へと排出しており、ある時点において、培地中の粒子濃度は、粒子を採取するために最適であろう)。上清は、当技術分野におけるあらゆる公知の方法、例を挙げるなら、遠心分離、超遠心分離、沈殿、限外濾過、および/またはクロマトグラフィーによって精製されることができる。いくつかの態様において、上清は、最初に濾過されて、一例として、1 µmより大きい粒子を、一例として、0.45 µm孔径のフッ化ポリビニリデン親水性膜(Millipore Millex-HV)または0.8 µmの孔径の混合セルロースエステル親水性膜(Millipore Millex-AA)を通して除去される。濾過後、上清は、さらに精製され、一例として超遠心分離を用いて、一例として80,000~100,000 xgの速度で1°C~5°Cの間の温度にて1~2時間、または8,000~15,000 gの速度で1°C~5°Cの温度にて10~16時間、濃縮されることができる。この遠心分離工程の後、heVLPまたはヒト化VLPは、遠心分離物(ペレット)の形態で濃縮され、これは、所望の濃度へ再懸濁されることができるか、形質導入増強試薬と混合されるか、緩衝液交換へ供されるか、またはそのまま使用されることができる。いくつかの態様において、heVLP含有上清またはヒト化VLP含有上清は、濾過され、沈殿され、遠心分離され、かつ濃縮溶液へ再懸濁されることができる。例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、一例として、PEG8000、またはheVLPもしくはヒト化VLP表面タンパク質もしくは膜構成要素へ結合する抗体-ビーズコンジュゲートは、粒子を沈殿させるために使用されることができる。

【0217】

精製された粒子は、安定であり、明らかな活性を失うことなく、4°Cで最大1週間までまたは-80°Cで数年間貯蔵されることができる。

【0218】

好ましくは、粒子が適切な担体中に懸濁化されるように、heVLPまたはヒト化VLPは、再懸濁または緩衝液交換される。いくつかの態様において、緩衝液交換は、限外濾過(Sartorius Vivaspın 500 MWCO100,000)によって実施されることができる。

【0219】

エキソソーム

いくつかの側面において、本明細書に開示される送達ビヒクルは、エキソソームである

10

20

30

40

50

。複数の側面において、細胞中へとカーゴを送達するために利用されることができるエキソソームに関連する、組成物、方法、およびシステムが、本明細書に開示される。「エキソソーム」という用語は、本明細書において使用される場合、エンドソーム起源の小さな膜結合小胞(30~100nm)を指すことができる。いくつかの場合において、エキソソームは、多小胞体と原形質膜との融合後に細胞外環境へと放出される。いくつかの場合において、本明細書に記載されるエキソソームは、Bリンパ球、樹状細胞(DC)、間葉系間質細胞(MSC)、羊膜上皮(AE)細胞、および/または胎盤由来細胞に由来する。

【0220】

本発明による供給源細胞は、広範囲の細胞、実例としては、間葉系幹細胞もしくは間質細胞または線維芽細胞(一例として、骨髄、脂肪組織、ホウオートンゼリー、周産期組織、歯蕾、臍帯血、皮膚組織等から得ることができる)、羊膜細胞、およびより具体的には羊膜上皮細胞、骨髄系サプレッサー細胞から選択されることができる。概して、初代細胞および細胞株の両方が、エキソソームの好適な供給源である。非限定的な例は、実例としては、以下を包含する:いくつか例を挙げれば、ヒト胎児腎臓(HEK)細胞、周皮細胞、リンパ球、異なる器官、例を挙げるなら気管、肺、胃腸管、尿路等からの内皮細胞および上皮細胞、樹状細胞(DC)、または造血システム、例を挙げるならマクロファージ、単球、B細胞もしくはT細胞、NK細胞、好中球、好酸球、マスト細胞もしくは好塩基球、赤血球もしくは赤血球前駆細胞、血小板、および巨核球等からの他の細胞、異なる起源、例を挙げるなら胎盤由来細胞(一例として、脱落膜胎盤細胞)、合胞体栄養細胞、および羊水上皮細胞等からの細胞、ならびにCNSおよびPNS、例を挙げるならミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトおよびシュワン細胞、上皮細胞、および神経細胞等からの細胞、褐色脂肪もしくは白色脂肪からの脂肪細胞、平滑筋および骨格筋の両方の起源の筋細胞、ならびに心筋細胞。概して、エキソソームは、初代細胞源または細胞株であれ、本質的にあらゆる細胞源に由来することができる。エキソソーム供給源細胞は、誘導多能性幹細胞(iPSC)およびあらゆる方法によって由来される他の幹細胞または前駆細胞を包含する、任意の胚性、胎児性、および成体幹細胞型であることができる。神経学的疾患を処置する場合、供給源細胞(source cell)、一例として、初代ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、および神経前駆細胞として利用することを企図してもよい。供給源細胞は、処置されるペイシエントに対して本質的に同種異系、自己、またはさらに異種のいずれかであることもでき、すなわち、細胞は、ペイシエント自身に由来してもよい、または非血縁、適合、もしくは非適合のドナーに由来してもよい。ある特定の状況において、同種異系細胞は、ある特定の適応症に罹患しているペイシエントの自己細胞からは得られないかもしれない免疫調節効果を提供することができるので、医学的観点から好ましい可能性がある。

【0221】

いくつかの場合において、エキソソームは、Bリンパ球、Tリンパ球、樹状細胞(DC)、およびほとんどの細胞などの免疫細胞を包含する、多くの異なる種類の細胞によって生産される。いくつかの場合において、エキソソームは、例えば、グリオーマ細胞、血小板、網状赤血球、ニューロン、腸上皮細胞、および腫瘍細胞によってもまた生産される。いくつかの場合において、本出願に従って使用するためのエキソソームは、上記で同定された細胞を包含するあらゆる好適な細胞に由来することができる。エキソソームはまた、血漿、尿、羊水、および悪性滲出液などの生理液から単離されている。

【0222】

いくつかの場合において、エキソソームは、未成熟DCに由来する。いくつかの場合において、未成熟DCから生産されたエキソソームは、MHC-II、MHC-I、またはCD86を発現しない。このようにして、そのようなエキソソームは、ナイーブT細胞を有意な程度まで刺激せず、混合リンパ球反応において応答を誘導することができない。よって、未成熟樹状細胞から生産されたエキソソームは、カーゴ、一例として、治療用カーゴの送達に使用するための理想的な候補であることができる。

【0223】

いくつかの場合において、エキソソームは、エキソソームが送達されるペイシエントにおける免疫応答の産生を低減または回避するために、あらゆる自己ペイシエント由来、異種ハプロタイプ一致、または異種幹細胞から得られる。あらゆるエキソソーム生産細胞は、この特定の目的のために利用されることができる。

【0224】

いくつかの場合において、エキソソームは、多くの異なる種類の細胞によって生産され、生理液からもまた単離されている。よって、本開示によれば、エキソソームは、上で論じたあらゆる好適な細胞型から、または生理液からの単離によって得られることができる。典型的には、本発明の方法は、細胞培養培地または組織上清からエキソソームを単離することを含む。

【0225】

細胞から生産されたエキソソームは、あらゆる好適な方法によって培養培地から回収されることができる。典型的には、エキソソームの調製物は、遠心分離、濾過、またはこれらの方法の組合せによって細胞培養または組織上清から調製されることができる。例えば、エキソソームは、分画遠心分離、すなわち、より大きな粒子をペレット化するための低速(20000g未満)遠心分離、続いてエキソソームをペレット化するための高速(100000g超)遠心分離、適切なフィルタ(例えば、0.22 μ mフィルタ)によるサイズ濾過、勾配超遠心分離(例えば、スクロース勾配を用いる)、またはこれらの方法の組合せによって調製されることができる。

【0226】

いくつかの場合において、エキソソームは、カーゴ、一例として治療用カーゴ、一例として、タンパク質、核酸分子、または小分子で負荷される。いくつかの場合において、エキソソームは、調製され、次いで、送達のために所望の治療用カーゴで負荷される。

【0227】

いくつかの側面において、本明細書に開示されるエキソソームは、所望の細胞型または組織を標的とするように操作される。この標的化は、標的化される細胞の表面上に発現される細胞表面部分へ結合する標的化部分を、エキソソームの表面上に発現させることによって達成されることができる。いくつかの場合において、標的化部分は、典型的にはエキソソームの表面上に発現される膜貫通タンパク質との融合タンパク質として発現されるペプチドである。

【0228】

いくつかの場合において、エキソソームは、その表面にペプチドなどの標的化部分を発現させることによって、特定の細胞型または組織を標的とされる。好適なペプチドは、標的化される細胞の細胞表面に見られる受容体またはそれらのリガンドなどの細胞表面部分へ結合するペプチドである。好適な標的化部分の非限定的な例は、標的化部分が、エキソソームの表面上で発現されることができ、膜タンパク質のエキソソームへの挿入を妨害しない限り、短いペプチド、scFv、および完全タンパク質である。典型的には、標的化ペプチドは、膜貫通エキソソームタンパク質に対して異種である。ペプチド標的化部分は、典型的には、100アミノ酸未満の長さ、例えば、50アミノ酸未満の長さ、30アミノ酸未満の長さから、10、5、または3アミノ酸の最小長さであってもよい。

【0229】

標的化部分は、例えば筋肉、脳、肝臓、脾臓、および肺などの特定の組織型を標的化するために、例えば、または腫瘍などの疾患組織を標的化するために、選択されることができる。本発明の特に好ましい態様において、エキソソームは、脳組織を標的とする。

【0230】

標的化部分の具体的な非限定的な例は、骨格筋を標的化するためのファージディスプレイによって発見された筋肉特異的ペプチド、アセチルコリン受容体へ結合する狂犬病ウイルス糖タンパク質の29アミノ酸断片、またはその受容体を標的ニューロンへと標的化する神経成長因子の断片を包含し、かつ、セクレチン受容体へ結合するセクレチンペプチドは、胆管上皮および脾臓上皮を標的化するために使用されることができる。代替として、

10

20

30

40

50

scFv抗体断片を包含する免疫グロブリンおよびそれらの誘導体はまた、がん遺伝子療法のためのVEGFRなどの特異的抗原を標的とする融合タンパク質として発現されることもできる。代替として、受容体に対する天然リガンドを、NGFRに結合し、ニューロン特異的標的化を付与するNGFなどの、特異性を付与する融合タンパク質として発現されることができる。

【0231】

ペプチド標的化部分は、エキソソーム膜貫通タンパク質との融合タンパク質として発現させることによって、エキソソームの表面上に発現されることができる。数多くのタンパク質がエキソソームに関連することが知られている;すなわち、これらは形成されるにつれてエキソソームへと組み込まれる。いくつかの場合において、標的化部分は、膜貫通タンパク質であるものを包含するか、または膜貫通タンパク質であるものに由来する。例えば、Lamp-1、Lamp-2、CD13、CD86、フロチリン、Syntaxin-3、CD2、CD36、CD40、CD40L、CD41a、CD44、CD45、ICAM-1、インテグリンアルファ4、LiCAM、LFA-1、Mac-1アルファおよびベータ、Vti-1AおよびB、CD3イプシロンおよびゼータ、CD9、CD18、CD37、CD53、CD63、CD81、CD82、CXCR4、FcR、GluR2/3、HLA-DM(MHC II)、免疫グロブリン、MHC-IまたはMHC-II構成要素、TCRベータ、およびテトラスパニンを含むが、これらに限定されない。本発明の特に好ましい態様において、膜貫通タンパク質は、Lamp-1、Lamp-2、CD13、CD86、Flotillin、Syntaxin-3から選択される。いくつかの場合において、標的化部分は、上で論じたタンパク質のアミノ酸配列の変動、変更、修飾、または誘導体化を含むか、またはこれらに由来する。本明細書に記載されるようなポリペプチドのそのような変動、変更、修飾、または誘導体化は、本開示の後続のセクションで指定されてもよいように、ポリペプチドがあらゆる更なる必要な活性または特徴を保持するという要件に供されることが理解されよう。

【0232】

標的化部分は、一例として、抗体またはその抗原結合断片(一例として、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、scFv抗体断片、ジスルフィド連結Fv(sdFv)、VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片、線状抗体、単ドメイン抗体、例を挙げるならsdAb(VLまたはVHのいずれか)、ナノボディ、またはラクダ類VHHドメイン)など、抗原結合性フィブロネクチンIII型(Fn3)足場、例を挙げるならフィブロネクチンポリペプチドミニボディ、リガンド、サイトカイン、ケモカイン、またはT細胞受容体(TCR)などを包含することができる。細胞融合タンパク質は、標的化部分を、融合タンパク質または標的化タンパク質(一例として、赤血球凝集素タンパク質)へ非共有結合的にコンジュゲートすることによって再標的化されてもよい。例えば、融合タンパク質は、標的細胞上の抗原を標的化する抗体のFc領域に結合し、融合活性を抗体の標的を提示する細胞に向け直すように操作されることができる。

【0233】

標的化部分は、一例として、ヒト化抗体分子、インタクトIgA、IgG、IgE、またはIgM抗体;二重特異性または多重特異性抗体(一例として、Zybodies(登録商標)、等);Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fd'断片、Fd断片、および単離されたCDRまたはそのセットなどの、抗体断片;単鎖Fvs;ポリペプチドFc融合体;単ドメイン抗体(一例として、IgNARまたはその断片などのサメ単ドメイン抗体);ラクダ抗体;マスクされた抗体(一例として、Probodyes(登録商標));小モジュール免疫医薬品(「SMIPs(商標)」);単鎖またはタンデムダイアボディ(TandAb(登録商標));VHH;Anticalins(登録商標);Nanobodies(登録商標);ミニボディ;BiTE(登録商標);アンキリン反復タンパク質またはDARPIN(登録商標);Avimers(登録商標);DART;TCR様抗体;Adnectins(登録商標);Affilins(登録商標);Trans-bodies(登録商標);Affibodies(登録商標);TrimerX(登録商標);Micro Proteins;Fynomers(登録商標)、Centyrins(登録商標);ならびに、KALBITOR(登録商標)を含むことができる。

【0234】

複数の態様において、膜タンパク質へ連結された標的化部分は、標的細胞上の細胞表面マーカー、一例として、タンパク質、糖タンパク質、受容体、細胞表面リガンド、アゴニスト、脂質、糖、クラスI膜貫通タンパク質、クラスII膜貫通タンパク質、またはクラスIII膜貫通タンパク質へ結合する。

【0235】

いくつかの場合において、標的化部分は、エキソソームを生産するために使用される細胞内で標的化部分およびエキソソーム膜貫通タンパク質を含む融合タンパク質を発現させることによって、エキソソームへと導入される。細胞におけるこの融合タンパク質の発現は、融合タンパク質が、細胞から生産される際にエキソソームへと組み込まれることを可能にする。

10

【0236】

いくつかの場合において、エキソソームに適用可能である本明細書に開示される標的化部分はまた、本明細書に開示される他の脂質含有粒子、一例として、ウイルス様粒子、脂質ナノ粒子、およびプロテオリピドビヒクルにも使用されることができる。

【0237】

例えば、融合タンパク質を発現したDNAプラスミドなどのポリヌクレオチド構築物は、細胞へとトランスフェクトされる。あらゆる好適な方法は、細胞へのポリヌクレオチド構築物の導入に使用されることができる。ポリヌクレオチド構築物は、コードされた融合タンパク質が細胞内で発現されるように、好適なプロモータ配列を包含する。シグナルペプチド配列はまた、タンパク質が、生産される際に、小胞体の膜へと組み込まれるように包含される。その後続いて、膜タンパク質は、エキソソームへと組み込まれる前に、エキソソーム/リソソーム区画へ移行される。シグナル配列は、典型的には、エキソソーム膜貫通タンパク質に対するシグナルペプチド配列である。

20

【0238】

いくつかの場合において、細胞から生産されたエキソソームは、あらゆる好適な方法によって培養培地から回収されることができる。典型的には、エキソソームの調製物は、遠心分離、濾過、またはこれらの方法の組合せによって細胞培養または組織上清から調製されることができる。例えば、エキソソームは、分画遠心分離、すなわち、より大きな粒子をペレット化するための低速(20000g未満)遠心分離、続いてエキソソームをペレット化するための高速(100000g超)遠心分離、適切なフィルタ(例えば、0.22 μm フィルタ)によるサイズ濾過、勾配超遠心分離(例えば、スクロース勾配を用いる)、またはこれらの方法の組合せによって調製されることができる。

30

【0239】

いくつかの場合において、特定の標的化部分は、エキソソームに包含される必要はない。例えば、エキソソームは、治療法が必要とされる部位へ直接投与されてもよい。あるいは、例えば、エキソソームが免疫原をコードする遺伝的材料を含有する場合、特定の部位への直接的な標的化は必要でなくともよく、送達、例えば、皮内または筋肉送達は、エキソソームをあらゆる特定の細胞型へ標的化することなく所望の免疫応答を産生するのに充分であってもよい。いくつかの場合において、標的化部分は、エキソソームの表面に包含されない。しかしながら、エキソソームは、特定の組織型を標的とする可能性がより高くなるように選択される。例えば、異なる細胞に由来するエキソソームは、T細胞に対する成熟樹状細胞由来エキソソームの十分に確立された親和性などの生理学的機能によって必要とされる特定の細胞サブタイプに対する、天然の親和性を有してもよい。この親和性は、上で言及したカーゴを組織へ特異的に送達するために利用されてもよい。

40

【0240】

いくつかの場合において、エキソソームは、キメラポリペプチド受容体、一例として、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように修飾された細胞から生産される。いくつかの場合において、エキソソームは、(i)細胞外認識ドメイン、(ii)少なくとも1つのプロテアーゼ切断部位、および(iii)細胞内転写因子を含むキメラポリペプチド受容体を生産するように、遺伝子修飾された細胞から生産され、ここで、細胞外認識ドメインのその標的へ

50

の結合は、少なくとも1つのプロテアーゼ切断部位のタンパク質分解性切断、および少なくとも1つのエキソソームポリペプチドを含む遺伝子産物をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの細胞内転写因子による内在性転写を誘導する。いくつかの場合において、遺伝子産物は、目的のタンパク質、実例としては、抗体、単鎖抗体、またはいずれかの他の抗体誘導体、二重特異性T細胞エンゲージャ(BiTE)、受容体、インターロイキンなどのサイトカイン、カスパーゼ、グランザイムなどの酵素、Cas、Cas9、チェックポイント阻害剤、共刺激阻害剤、RNA結合タンパク質、NPC-1などの膜輸送体、スプライシング因子、細胞オルガネラと関連するタンパク質、リソソーム酵素、転写因子、ミトコンドリアタンパク質、細胞内タンパク質、抗ウイルスタンパク質、抗菌タンパク質をさらに含む。いくつかの場合において、目的のタンパク質がRNA結合タンパク質である場合、エキソソームが生産される細胞は、mRNA、sgRNA、shRNA、miRNA、shRNA、siRNA、lncRNA、ncRNA、piRNA、piwiRNA、circRNA、tRNA、rRNA、crRNA、およびこれらのあらゆる組合せからなる群から選択される、RNAカーゴ分子を含むようにさらに遺伝子修飾される。いくつかの場合において、遺伝子修飾は、*in vitro*または*ex vivo*遺伝子修飾である。いくつかの場合において、エキソソームが生産される細胞は、T細胞、細胞傷害性CD8+T細胞、CD4+T細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、B細胞、原形質細胞、樹状細胞(DC)、マクロファージ、単球、好中球、上皮細胞、内皮細胞、ミクログリア、アストロサイト、ニューロン、幹細胞、骨髄由来間葉系間質細胞、ホウオトンゼリー由来MSC、またはいずれかの他の細胞型などの、エフェクター免疫細胞である。いくつかの場合において、キメラポリペプチド受容体の細胞外認識ドメインは、抗体、抗体誘導体、単鎖断片、単鎖抗体、ナノボディ、ペプチド、受容体に対するリガンド、接着分子、受容体、インターロイキン受容体、細胞外マトリックス構成要素、またはこれらのいずれかの組合せである。いくつかの場合において、少なくとも1つのプロテアーゼ切断部位は、S1、S2、および/またはS3切断部位のうち少なくとも1つである。いくつかの場合において、融合ポリペプチドは、N末端からC末端まで、および共有連結(covalent linkage)で、以下:(i)Notch受容体ポリペプチド中に天然には存在しない細胞外認識ドメイン;(ii)Lin 12-Notchリピート、S2タンパク質分解性切断部位、およびS3タンパク質分解性切断部位を含む膜貫通ドメインを含む、Notch調節領域;(iii)Notch調節領域に対して異種である細胞内転写因子を含む、キメラNotchポリペプチドであり、ここで、細胞外認識ドメインのその標的への結合は、S2およびS3プロテアーゼ切断部位における切断を誘導し、それによって、ポリヌクレオチドの転写を活性化する細胞内転写因子を放出する。いくつかの場合において、Notch調節領域は、S2タンパク質分解性切断部位を含むヘテロ二量体化ドメインをさらに含む。いくつかの場合において、S1タンパク質分解性切断部位は、アミノ酸配列Arg-X-(Arg/Lys)-Argを含むフリン様プロテアーゼ切断部位であり、ここで、Xは、あらゆるアミノ酸である。いくつかの場合において、融合ポリペプチドは、少なくとも1つのリンカーを含む。いくつかの場合において、ポリヌクレオチドは、コード配列へ作動可能に連結された、転写因子に応答する転写制御エレメントをさらに含む。いくつかの場合において、細胞は、(i)細胞外認識ドメイン、(ii)プロテアーゼ切断部位、および(iii)細胞内転写因子のうち少なくとも1つが、融合ポリペプチド間で異なる、少なくとも2種類の融合ポリペプチドを産生するように遺伝子修飾される。いくつかの場合において、融合ポリペプチドの細胞外認識ドメインは、互いに異なる。

10

20

30

40

50

【0241】

いくつかの場合において、本明細書に開示されるエキソソームへのタンパク質カーゴの負荷は、エキソソームが生産される供給源細胞において、トリドメインポリペプチド構築物を発現させることによって達成される。いくつかの場合において、そのようなポリペプチド構築物は、(i)少なくとも1つの目的のタンパク質(POI)、(ii)少なくとも1つの多量体化ドメイン、および(iii)少なくとも1つのエキソソーム選別ドメインを含む。トリドメインポリペプチド構築物の設計は、エキソソームへのPOIの非常に効率的な負荷を可能にすることができ、また、供給源細胞からのエキソソームの生産の増加を駆動する。

【0242】

多量体化ポリペプチドドメインは、得られるエキソソームのこの増加した負荷を達成するための重要な構成要素であり、そのような多量体化ドメインは、興味深いことに、多種多様な異なる種から選択されてもよく、また、比較的異なる作用機序を提示してもよい(一例として、これは、ヘテロ二量体化ドメインであってもよく、またはホモ三量体化ドメインもしくはホモ五量体ドメイン等であってもよい)。いくつかの場合において、多量体化ドメインは、ホモ多量体化ドメインであり、これは、これらが融合タンパク質の単純な設計を可能にし、重要なことに、(複数の融合構築物とは対照的に)エキソソームへの単一種の融合ポリペプチド構築物の制御された負荷を支持するからである。多量体化ドメインは、ドメインが少なくとも2つのドメイン(およびそれらが一部を形成するポリペプチド)の相互作用を促進することが可能である限り、二量体化ドメイン、三量体化ドメイン、四量体化ドメイン、または本質的にあらゆる高次の多量体化ドメインのいずれかであることができる。実例としては、多量体化ドメインの非限定的なリストは、以下のドメインを含む:*S.cerevisiae*からのGCN4のロイシンジッパーホモ二量体化ドメイン、*S.cerevisiae*からのGCN4のレトロ-ロイシンジッパーホモ二量体化ドメイン、フィブリチン(Fibritin)(*T4*バクテリオファージから)のフォールド・オン(Fold-on)ホモ二量体化ドメイン、リントタンパク質(ヒト呼吸器多核体ウイルスAから)の断片Xヘテロ二量体化ドメイン、コラーゲンスーパーファミリーのヒト・アルファ・ヘリックス・コイルドコイル・オリゴマー化ドメイン、FosおよびJun(ヒト)のロイシンジッパーヘテロ二量体化ドメイン、心臓ホスホランバン(Cardiac phospholamban)(ヒト)の膜貫通ホモ五量体(homopentameric)ドメイン、副甲状腺ホルモン(ヒト)のホモ二量体化ドメイン、グリコホリンA(ヒト)の膜貫通ホモ二量体ドメイン、Gp41(HIVから)の三量体化ドメイン、腫瘍性タンパク質E7(HPV 45から)のC末端ホモ二量体ドメイン、ならびに血管拡張因子刺激リントタンパク質(ヒト)のEVH2ホモ四量体ドメイン、ミトコンドリア抗ウイルスシグナル伝達タンパク質CARDフィラメント、ならびに/またはこれらのあらゆる組合せ。

【0243】

多量体化ドメインは、ポリペプチド構築物中のいくつかの異なる場所に置かれることができる。実例としては、多量体化ドメインは、POI配列とエキソソーム選別ドメイン配列との間、エキソソーム選別ドメイン配列内もしくはエキソソーム選別ドメイン配列に隣接して、および/またはPOI配列内もしくはPOI配列に隣接して、置かれることができる。全体として、トリドメインポリペプチド構築物(多量体化ドメインの選択および構築物におけるその場所の両方に関して、ならびにエキソソーム選別ドメインの選択および構築物におけるその位置に関して)の設計は、エキソソームにおいて、エキソソーム供給源細胞における生産後にポリペプチドが最終的にどこに到達するかを決定するために重要である。一例として、テトラスパニンエキソソーム選別タンパク質(一例として、CD9、CD63、もしくはCD81)またはいずれかの他のエキソソーム膜タンパク質(Lamp2bなど)を選択することによって、エキソソーム表面のPOIを豊富にすることが可能である。逆に、典型的にはエキソソーム管腔に存在するエキソソーム選別タンパク質、例を挙げるならALIXまたはシンテニンなどを選択することにより、本質的に、エキソソーム内部のポリペプチド構築物(およびそれによるPOI)を豊富にすることが可能になる。当然のことながら、ポリペプチド構築物は、エキソソームの外側および内側、ならびにエキソソーム膜に同時に存在してもよい。さらに、好ましい態様において、融合ポリペプチド構築物は、異なるドメイン間、すなわち、少なくとも1つのPOI、少なくとも1つの多量体化ドメイン、および少なくとも1つのエキソソーム選別ドメイン間に様々なタイプのリンカーを含んでもよい。リンカーは、実例としては、GS(すなわち、グリシン-セリン)リンカー、すなわち、アミノ酸グリシンおよびセリンを含むリンカー、または異なるドメインが融合ポリペプチド構築物中に存在する場合にそ活性が制限されないことを確実にする任意の他の種類の好適なリンカードメインであってもよい。

【0244】

本発明による典型的なトリドメイン融合ポリペプチド構築物は、以下のように概略的に

記載されることができる(以下の表記は、あらゆるC末端および/またはN末端方向を例示するものとして解釈されるべきではなく、単に例示を目的とするものである):

POI多量体化ドメイン-エキソソーム選別ドメイン

【0245】

本開示のエキソソーム選別ドメインは、以下のタンパク質のうちいずれか1つから選択されることができる:CD9、CD53、CD63、CD81、CD54、CD50、FLOT1、FLOT2、CD49d、CD71、CD133、CD138、CD235a、ALIX、Syntenin-1、Syntenin-2、Lamp2b、TSPAN8、TSPAN14、CD37、CD82、CD151、CD231、CD102、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、DLL1、DLL4、JAG1、JAG2、CD49d/ITGA4、ITGB5、ITGB6、ITGB7、CD11a、CD11b、CD11c、CD18/ITGB2、CD41、CD49b、CD49c、CD49e、CD51、CD61、CD104、Fc受容体、インターロイキン受容体、免疫グロブリン、MHC-IまたはMHC-II構成要素、CD2、CD3イプシロン、CD3ゼータ、CD13、CD18、CD19、CD30、CD34、CD36、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD45RA、CD47、CD86、CD110、CD111、CD115、CD117、CD125、CD135、CD184、CD200、CD279、CD273、CD274、CD362、COL6A1、AGRN、EGFR、GAPDH、GLUR2、GLUR3、HLA-DM、HSPG2、L1CAM、LAMB1、LAMC1、LFA-1、LGALS3BP、Mac-1アルファ、Mac-1ベータ、MFGE8、SLIT2、STX3、TCRA、TCRB、TCRD、TCRG、VTI1A、VTI1B、およびこれらのあらゆる組合せ。

10

【0246】

いくつかの場合において、エキソソームは、米国特許出願公開第20190388347号に記載されているものなどの、細胞透過性ペプチドを用いて負荷され、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0247】

エキソソーム、エキソソームが生産される供給源細胞、エキソソーム中に送達されることができるカーゴ、エキソソームにカーゴを負荷する方法、およびエキソソームを生産する方法の非限定的な例は、米国特許出願公開第US20070298118号、同第US20180177727号、同第US20200062813号、同第US20200206360号、同第US20200023012号、同第US20160137716号、同第US20170173113号、同第US20130053426号、同第US20190167810号、同第US20190388347号、同第US20190224331号、同第US20160137716号、同第US20210188903号、同第US20210069254号、および同第US20200407418号に記載されるものを包含し、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0248】

脂質ナノ粒子またはプロテオリピドビヒクル

いくつかの側面において、細胞中へとカーゴを送達するために利用されることができる脂質ナノ粒子に関連する、組成物、方法、およびシステムが、本明細書に開示される。いくつかの側面において、細胞中へとカーゴを送達するために利用されることができるプロテオリピドビヒクルに関連する、組成物、方法、およびシステムが、本明細書に開示される。

40

【0249】

脂質ナノ粒子は、本明細書に開示される治療用カーゴのための生体適合性および生物分解性送達システムを提供することができる。いくつかの場合において、本明細書に開示される脂質ナノ粒子は、ナノ構造脂質担体(NLC)、ポリマーナノ粒子(PNP)、または脂質ポリマーナノ粒子(PLN)を含む。NLCは、SLNの特徴を保持し、薬物安定性および負荷能力を改善し、薬物漏出を予防する、修飾固体脂質ナノ粒子(SLN)である。ポリマーナノ粒子(PNP)は、治療送達の重要な構成要素である。これらのナノ粒子は、薬物送達を特定の標的へ効果的に導き、かつ薬物安定性および制御された薬物放出を改善することができる。リポソームとポリマーとを組み合わせた新しい種類の担体である、脂質ポリマーナノ粒子(PLN)もまた採用されてもよい。これらのナノ粒子はPNPおよびリポソームの相

50

補的利点を保有する。PLNはコア-シェル構造から構成される;ポリマーコアは、安定な構造を提供し、リン脂質シェルは、良好な生体適合性を提供する。このようにして、2つの構成要素は、薬物カプセル化効率を高め、表面修飾を促進し、および水溶性薬物の漏出を予防する。

【0250】

本明細書に開示される脂質ナノ粒子の非限定的な例は、JA Zuris et al., Nat Biotechnol. 2014 Oct 30; 33(1):73-80; Hou et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. Nat Rev Mater (2021); 国際公開第WO2019/067992号、同第WO2017/173054号、同第WO2015/095340号、同第WO2014/136086号、および同第WO2019/217941号に記載されるものを包含し、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0251】

カーゴ

本明細書において使用される「カーゴ」は、一例として、治療または診断での使用のための、またはゲノム編集、エピゲノムモジュレーション、および/もしくはトランスクリプトームモジュレーションの用途のための、化学物質、一例として、小分子化合物、DNA、RNA、およびタンパク質の組合せ、RNAとタンパク質の組合せ、DNAとタンパク質の組合せ、またはタンパク質のうち1以上を指すことができる。くわえて、生産細胞からの内在性RNAおよびタンパク質は、パッケージングされ、および/または送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)へと組み込まれることができる。

20

【0252】

いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、ポリペプチド、一例として、核輸送ポリペプチド、核酸結合ポリペプチド、リプログラミングポリペプチド、DNA編集ポリペプチド、DNA修復ポリペプチド、DNA組換えポリペプチド、トランスポザーゼポリペプチド、DNA統合ポリペプチド、標的化エンドヌクレアーゼ(一例として、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化様ヌクレアーゼ(transcription-activator-like nuclease:TALEN)、Cas9もしくはそのホモログ)、リコンビナーゼ、酵素、構造的ポリペプチド、シグナル伝達ポリペプチド、調節性ポリペプチド、輸送ポリペプチド、感覚(sensory)ポリペプチド、モーターポリペプチド、防御(defense)ポリペプチド、貯蔵(storage)ポリペプチド、転写因子、抗体、サイトカイン、ホルモン、異化(catabolic polypeptide)ポリペプチド、同化(anabolic)ポリペプチド、タンパク質分解性ポリペプチド、代謝性ポリペプチド、キナーゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、酵素モジュレーターポリペプチド、タンパク質結合ポリペプチド、脂質結合ポリペプチド、膜融合ポリペプチド、細胞分化ポリペプチド、後成的ポリペプチド、細胞死ポリペプチド、またはこれらのいずれかの組合せを含む。いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有されるカーゴは、分解のために細胞中のタンパク質を標的化するタンパク質を含む。いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有されるカーゴは、キメラ抗原受容体(CAR)、抗体、T細胞受容体もしくはその機能的断片、またはこれらのいずれかの組合せを含む。

30

40

【0253】

いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、ポリヌクレオチド、一例として、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)分子を含む。いくつかの場合において、ポリヌクレオチドは、上記の段落に記載されているものなどのポリペプチドをコードする。いくつかの場合において、ポリヌクレオチドは、以下に記載されるnapR/DNA bpプログラミング核酸分子を含む。

【0254】

いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明

50

細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、1以上のタンパク質と、1以上のポリヌクレオチドとの間に形成されるリボ核タンパク質(RNP)複合体を含む。実例としては、カーゴは、以下に記載される核酸プログラマブルR/DNA結合タンパク質(napR/DNAbp)、およびnapR/DNAbpプログラミング核酸分子、一例として、Casタンパク質およびガイドRNAによって形成されるRNP複合体を含むことができる。

【0255】

いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、リボザイム、アプタマー、アプタザイム、ペプチド、オリゴヌクレオチド、抗体模倣物、ペプチド模倣物、抗体-薬物コンジュゲート、抗生物質、炭水化物、リボソーム、ミトコンドリア、および小分子化合物などの他の治療分子を含む。

10

【0256】

いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、ポリペプチド、一例として、酵素、構造的ポリペプチド、シグナル伝達ポリペプチド、調節性ポリペプチド、輸送ポリペプチド、感覚ポリペプチド、モータポリペプチド、防御ポリペプチド、貯蔵ポリペプチド、転写因子、抗体、サイトカイン、ホルモン、異化ポリペプチド、同化ポリペプチド、タンパク質分解性ポリペプチド、代謝性ポリペプチド、キナーゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、酵素モジュレータポリペプチド、タンパク質結合ポリペプチド、脂質結合ポリペプチド、膜融合ポリペプチド、細胞分化ポリペプチド、後成的ポリペプチド、細胞死ポリペプチド、核輸送ポリペプチド、核酸結合ポリペプチド、リプログラミングポリペプチド、DNA編集ポリペプチド、DNA修復ポリペプチド、DNA組換えポリペプチド、トランスポザーゼポリペプチド、DNA統合ポリペプチド、標的化エンドヌクレアーゼ(一例として、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化様ヌクレアーゼ(TALEN)、Cas9およびそのホモログ)、リコンビナーゼ、ならびにこれらのあらゆる組合せを包含する。いくつかの態様において、タンパク質は、分解のために細胞中のタンパク質を標的化する。いくつかの態様において、タンパク質は、タンパク質をプロテアソームへ局在化することによって、分解のために細胞中のタンパク質を標的化する。いくつかの態様において、タンパク質は、野生型タンパク質である。いくつかの態様において、タンパク質は、突然変異タンパク質である。いくつかの態様において、タンパク質は、融合タンパク質またはキメラタンパク質である。

20

30

【0257】

いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、病原標的タンパク質へ結合するためのデコイタンパク質;HA2などのエンドソーム脱出を誘導するためのペプチドもしくはタンパク質;目的の組織もしくは器官もしくは細胞型へエキソソームを標的化するためのペプチドもしくはタンパク質;抗体、細胞内抗体、単鎖可変断片(scFv)、アフィニティ、二重特異性もしくは多重特異性抗体もしくはバインダ、受容体、等;酵素補充療法のためのアルファ-グルコシダーゼおよび/もしくはグルコセレブロシダーゼなどの酵素;NPC1またはシスチノシンなどの輸送タンパク質;エキソソームのin vivo挙動を最適化するためのペプチドもしくはタンパク質(一例として、それらの循環時間もしくは免疫システム認識)、一例として、CD47および/もしくはCD55、もしくはこれらのタンパク質の一部;サイトカインもしくはケモカイン;RVGペプチド、VSV-Gペプチド、p-セレクトリン結合ペプチド、もしくはe-セレクトリン結合ペプチドなどの、標的化ペプチドもしくはタンパク質;細胞透過性ペプチド(CPP)(一例として、Tat、ペネトラチン、TP10、CADY);または、腫瘍抑制因子を含む。

40

【0258】

いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、ワクチンなどの免疫原性分子を含む。ワクチンは、ペプチド抗原、RNA(一例として、mRNAまたはcircRNA)、D

50

NA(一例として、抗原をコードするDNA分子)であることができる。カーゴはまた、ワクチン組成物の免疫原性を増強するアジュバントを包含することができる。

【0259】

いくつかの場合において、送達ビヒクルに負荷されたカーゴタンパク質は、送達ビヒクルによって送達される別のカーゴ分子(一例として、核酸分子、タンパク質、RNP、等)へ結合するように機能する。

【0260】

いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、小分子、一例として、イオン(一例として、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、 Fe^{2+})、炭水化物、脂質、活性酸素種、活性窒素種、イソプレノイド、シグナル伝達分子、ヘム、ポリペプチド補助因子、電子求引性化合物、電子供与性化合物、代謝産物、リガンド、およびこれらのあらゆる組合せを包含する。いくつかの態様において、小分子は、細胞中の標的と相互作用する医薬剤である。いくつかの態様において、小分子は、分解のために細胞中のタンパク質を標的化する。いくつかの態様において、小分子は、タンパク質をプロテアソームへ局在化することによって、分解のために細胞中のタンパク質を標的化する。いくつかの態様において、小分子は、タンパク質分解標的化キメラ分子(PROTAC)である。

【0261】

いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、タンパク質、核酸、または代謝産物、一例として、複数のポリペプチド、複数の核酸、複数の小分子の混合物;核酸、ポリペプチド、および小分子の組合せ;リボ核タンパク質複合体(一例として、Cas9-gRNA複合体);複数の転写因子、複数の後成的因子、リプログラミング因子(一例として、Oct4、Sox2、cMyc、およびKlf4);複数の調節RNA;ならびに、これらのあらゆる組合せを包含する。

【0262】

いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、1以上のオルガネラ、一例として、コンドリソーム(chondrisome)、ミトコンドリア、リソソーム、核、細胞膜、細胞質、小胞体、リボソーム、液胞、エンドソーム、スプライソソーム、ポリメラーゼ、カプシド、アクロソーム、オートファゴソーム、中心小体、グリコソーム、グリオキシソーム、ヒドロゲノソーム、メラノソーム、マイトソーム、筋原線維、刺糸胞(cnidocyst)、ペルオキシソーム、プロテアソーム、小胞、ストレス顆粒(stress granule)、オルガネラのネットワーク、およびこれらのあらゆる組合せを包含する。

【0263】

いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、RNA(ウイルスもしくは異種)、DNA(単ストランド、二重ストランド)、緑色蛍光タンパク質、ヌクレアーゼ、酸化鉄NP(IONP)、タキソール、Alexa Fluor(登録商標)488、ボルフィリン、ドキシソルビシン、フルオレセイン、DOTAキレート剤、RNA(メッセンジャー、マイクロ、小分子干渉)、リシン毒素A鎖、HIV-1 Tatペプチド、アルカリホスファターゼ、緑色蛍光タンパク質、量子ドット585、メタクリル酸(単量体、ポリマー)、CpG DNA、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、ニッケル、ビオチン、蛍光ポリメタクリル酸、ガドペンテト酸、ポリメタクリル酸、CRISPR(Cas9およびガイドRNA)、緑色蛍光タンパク質もしくはmCherry、CellBタンパク質、[NiFe]ヒドロゲナーゼ、ジコノチドペプチド、三酵素カスケード(Three enzyme cascade)(遺伝的に連結)、アルコールデヒドロゲナーゼ、ポリスチレンスルホン酸、RNA、緑色もしくはティール(teal)蛍光タンパク質、Pseudozyma antarcticaリパーゼB、西洋ワサビペルオキシダーゼ、Gd(III)もしくはZn(II)を伴うDOTAC10ミセル、Gd(DOTA)、蛍光プローブ、ドキシソルビシン、DAPI、アクリジンオレンジ、ヨウ化プロピジウム、プロフラビン、酸化鉄NP、Gd(III)、またはTb(III)のう

10

20

30

40

50

ち1以上を含む。いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクルに含有されるカーゴは、Rohovie, M.J., et al., Bioengineering & Translational Medicine, 2:43-57に記載されているものを含み、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0264】

いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクル中に含有され、本開示の送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、少なくとも10アミノ酸(aa)長、少なくとも20aa長、少なくとも30aa長、少なくとも50aa長、少なくとも80aa長、少なくとも100aa長、少なくとも150aa長、少なくとも200aa長、少なくとも250aa長、少なくとも300aa長、少なくとも350aa長、少なくとも400aa長、少なくとも500aa長、少なくとも600aa長、少なくとも700aa長、少なくとも800aa長、少なくとも900aa長、少なくとも1000aa長、少なくとも1200aa長、少なくとも1400aa長、少なくとも1500aa長、少なくとも1800aa長、少なくとも2000aa長、少なくとも2500aa長、少なくとも3000aa長、少なくとも4000aa長、または少なくとも5000aa長を有する、ポリペプチドを含む。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクル中に含有されるカーゴは、約20aa長、約30aa長、約50aa長、約80aa長、約100aa長、約150aa長、約200aa長、約250aa長、約300aa長、約350aa長、約400aa長、約500aa長、約600aa長、約700aa長、約800aa長、約900aa長、約1000aa長、約1200aa長、約1400aa長、約1500aa長、約1800aa長、約2000aa長、約2500aa長、約3000aa長、約4000aa長、または約5000aa長を有する、ポリペプチドを含む。

10

20

【0265】

いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、少なくとも20aa長、少なくとも30aa長、少なくとも50aa長、少なくとも80aa長、少なくとも100aa長、少なくとも150aa長、少なくとも200aa長、少なくとも250aa長、少なくとも300aa長、少なくとも350aa長、少なくとも400aa長、少なくとも500aa長、少なくとも600aa長、少なくとも700aa長、少なくとも800aa長、少なくとも900aa長、少なくとも1000aa長、少なくとも1200aa長、少なくとも1400aa長、少なくとも1500aa長、少なくとも1800aa長、少なくとも2000aa長、少なくとも2500aa長、少なくとも3000aa長、少なくとも4000aa長、または少なくとも5000aa長を有する、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクル中に含有されるカーゴは、約20aa長、約30aa長、約50aa長、約80aa長、約100aa長、約150aa長、約200aa長、約250aa長、約300aa長、約350aa長、約400aa長、約500aa長、約600aa長、約700aa長、約800aa長、約900aa長、約1000aa長、約1200aa長、約1400aa長、約1500aa長、約1800aa長、約2000aa長、約2500aa長、約3000aa長、約4000aa長、または約5000aa長を有する、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

30

【0266】

いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるポリペプチドは、少なくとも1kDa、少なくとも2kDa、少なくとも5kDa、少なくとも10kDa、少なくとも15kDa、少なくとも20kDa、少なくとも25kDa、少なくとも30kDa、少なくとも35kDa、少なくとも40kDa、少なくとも50kDa、少なくとも60kDa、少なくとも70kDa、少なくとも80kDa、少なくとも100kDa、少なくとも120kDa、少なくとも150kDa、少なくとも180kDa、少なくとも200kDa、少なくとも220kDa、少なくとも250kDa、少なくとも280kDa、少なくとも300kDa、少なくとも320kDa、少なくとも350kDa、少なくとも400kDa、少なくとも500kDa、少なくとも600kDa、少なくとも700kDa、少なくとも800kDa、少なくとも900kDa、または少なくとも1000kDaである、タンパク質を形成する。いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるポリペプチドは、約1kDa、約2kDa、約5k

40

50

Da、約10kDa、約15kDa、約20kDa、約25kDa、約30kDa、約35kDa、約40kDa、約50kDa、約60kDa、約70kDa、約80kDa、約100kDa、約120kDa、約150kDa、約180kDa、約200kDa、約220kDa、約250kDa、約280kDa、約300kDa、約320kDa、約350kDa、約400kDa、約500kDa、約600kDa、約700kDa、約800kDa、約900kDa、または約1000kDaである、タンパク質を形成する。

【0267】

いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、少なくとも50ヌクレオチド長、少なくとも80ヌクレオチド長、少なくとも100ヌクレオチド長、少なくとも150ヌクレオチド長、少なくとも200ヌクレオチド長、少なくとも250ヌクレオチド長、少なくとも300ヌクレオチド長、少なくとも350ヌクレオチド長、少なくとも400ヌクレオチド長、少なくとも500ヌクレオチド長、少なくとも600ヌクレオチド長、少なくとも700ヌクレオチド長、少なくとも800ヌクレオチド長、少なくとも900ヌクレオチド長、少なくとも1000ヌクレオチド長、少なくとも1200ヌクレオチド長、少なくとも1400ヌクレオチド長、少なくとも1500ヌクレオチド長、少なくとも1800ヌクレオチド長、少なくとも2000ヌクレオチド長、少なくとも2500ヌクレオチド長、少なくとも3000ヌクレオチド長、少なくとも4000ヌクレオチド長、少なくとも5000ヌクレオチド長、少なくとも6000ヌクレオチド長、少なくとも8000ヌクレオチド長、少なくとも10000ヌクレオチド長、少なくとも12000ヌクレオチド長、少なくとも14000ヌクレオチド長、または少なくとも15000ヌクレオチド長を有する、単ストランドポリヌクレオチドを含む。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクル中に含有されるカーゴは、約20ヌクレオチド長、約30ヌクレオチド長、約50ヌクレオチド長、約70ヌクレオチド長、約80ヌクレオチド長、約100ヌクレオチド長、約120ヌクレオチド長、約150ヌクレオチド長、約200ヌクレオチド長、約250ヌクレオチド長、約300ヌクレオチド長、約350ヌクレオチド長、約400ヌクレオチド長、約500ヌクレオチド長、約600ヌクレオチド長、約700ヌクレオチド長、約800ヌクレオチド長、約900ヌクレオチド長、約1000ヌクレオチド長、約1200ヌクレオチド長、約1400ヌクレオチド長、約1500ヌクレオチド長、約1800ヌクレオチド長、約2000ヌクレオチド長、約2500ヌクレオチド長、約3000ヌクレオチド長、約4000ヌクレオチド長、約5000ヌクレオチド長、約6000ヌクレオチド長、約8000ヌクレオチド長、約10000ヌクレオチド長、約12000ヌクレオチド長、約14000ヌクレオチド長、または約15000ヌクレオチド長を有するポリペプチドをコードする、単ストランドポリヌクレオチドを含む。

【0268】

いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、少なくとも50ヌクレオチド長、少なくとも80ヌクレオチド長、少なくとも100塩基対(base pairs:bp)、少なくとも150bp、少なくとも200bp、少なくとも250bp、少なくとも300bp、少なくとも350bp、少なくとも400bp、少なくとも500bp、少なくとも600bp、少なくとも700bp、少なくとも800bp、少なくとも900bp、少なくとも1000bp、少なくとも1200bp、少なくとも1400bp、少なくとも1500bp、少なくとも1800bp、少なくとも2000bp、少なくとも2500bp、少なくとも3000bp、少なくとも4000bp、少なくとも5000bp、少なくとも6000bp、少なくとも8000bp、少なくとも10000bp、少なくとも12000bp、少なくとも14000bp、または少なくとも15000bpの長さを有する、二重ストランドポリヌクレオチドを含む。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクル中に含有されるカーゴは、約20bp、約30bp、約50bp、約70bp、約80bp、約100bp、約120bp、約150bp、約200bp、約250bp、約300bp、約350bp、約400bp、約500bp、約600bp、約700bp、約800bp、約900bp、約1000bp、約1200bp、約1400bp、約1500bp、約1800bp、約2000bp、約2500bp、約3000bp、約4000bp、約5000bp、約6000bp、約8000bp、約10000bp、約12000bp、約14000bp、または約15000bpの長さを有するポリペプチドをコードする、二重ストランドポリヌクレオ

チドを含む。

【0269】

いくつかの場合において、本明細書に開示される送達ビヒクル中に含有され、かつ本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、ヌクレアーゼも、逆転写酵素も、塩基エディタも、プライムエディタも含まない。

【0270】

ヌクレアーゼ

任意の好適なヌクレアーゼは、ヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドのいずれかを含有する本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されることができる。いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル(一例として、脂質含有粒子)によって送達されるヌクレアーゼは、核酸プログラマブルDNA結合タンパク質(napDNAbp)ではない(一例として、Cas9タンパク質などの、ガイドRNAによってプログラマブルCasタンパク質)。好適なヌクレアーゼは、CRISPR関連(Cas)タンパク質、またはI型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド、II型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド(一例として、Cas9またはCas14)、III型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド、IV型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド、V型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド(一例として、Cpf1/Cas12a、C2c1、またはc2c3)、およびVI型CRISPR関連(Cas)ポリペプチド(一例として、C2c2/Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13d);ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN);転写アクチベータ様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN);メガヌクレアーゼ;RNA結合タンパク質(RBP);CRISPR関連RNA結合タンパク質;リコンビナーゼ;フリッパーゼ;トランスポザーゼ;アルゴノート(go)タンパク質(一例として、原核生物アルゴノート(pAgo)、古細菌アルゴノート(aAgo)、および真核生物アルゴノート(eAgo));これらのあらゆる誘導体;これらのあらゆるバリエーション;ならびに、これらのあらゆる断片を包含するが、これらに限定されない。

【0271】

いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中のカーゴは、天然に存在しないCRISPR(クラスター化された規則的な配置の短い回文配列リピート)/Cas(CRISPR-associated)システムで機能する、CRISPR関連(Cas)タンパク質またはCasヌクレアーゼを含む、またはコードする。細菌において、このシステムは、外来DNA(Barrangou, R., et al, "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes," Science(2007)315:1709-1712;Makarova, K.S., et al, "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems," Nat Rev Microbiol(2011)9:467-477;Garneau, J.E., et al, "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA," Nature(2010)468:67-71;Sapranaukas, R., et al, "The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli," Nucleic Acids Res(2011)39:9275-9282)に対する適応免疫を提供することができる。

【0272】

本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されるCRISPR/Casシステム(一例として、修飾および/または非修飾)のうち1以上の構成要素は、多様な哺乳動物、動物、植物、および酵母を包含する広範な生物におけるゲノム操作ツールとして利用されることができる。CRISPR/Casシステムは、遺伝子発現および/もしくは活性の標的調節、または核酸編集のために、Casタンパク質と複合体化されたガイドRNA(gRNA)などのガイド核酸を含むことができる。RNAガイドCasタンパク質(一例として、Cas9ヌクレアーゼなどのCasヌクレアーゼ)は、配列依存的様式で標的ポリヌクレオチド(一例として、DNA)に特異的に結合することができる。Casタンパク質は、ヌクレアーゼ活性を保有する場合、DNAを切断することができ(Gasiunas, G., et al, "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria," Proc Natl Acad Sci USA(2012)109:E2579-E2586;Jinek, M., et al, "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial

immunity,” *Science*(2012)337:816-821;Sternberg,S.H.,et al, “ DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9,” *Nature*(2014)507:62;Deltcheva,E.,et al, “ CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III,” *Nature*(2011)471:602-607)、かつ、様々な生物およびモデルシステムにおけるプログラマブルなゲノム編集に広く使用されている(Cong,L.,et al, “ Multiplex genome engineering using CRISPR Cas systems,” *Science*(2013)339:819-823;Jiang,W.,et al, “ RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems,” *Nat.Biotechnol.*(2013)31:233-239;Sander,J.D.&Joung,J.K, “ CRISPR-Cas systems for editing,regulating and targeting genomes,” *Nature Biotechnol.*(2014)32:347-355)。

10

【0273】

いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルによって送達されるCasタンパク質は、野生型Casタンパク質に対して、ヌクレアーゼ欠損タンパク質またはヌクレアーゼ活性が減少したタンパク質を生じるように突然変異および/または修飾される。ヌクレアーゼ欠損タンパク質は、DNAに結合する能力を保持することができるが、しかし、核酸切断活性を欠いていてもよく、または核酸切断活性が低減していてもよい。カーゴタンパク質、またはCasヌクレアーゼ(一例として、野生型ヌクレアーゼ活性を保持すること、ヌクレアーゼ活性が低減していること、および/もしくはヌクレアーゼ活性を欠くこと)を含むカーゴ核酸分子によってコードされるタンパク質は、標的遺伝子またはタンパク質(一例として、減少、増加、または排除)のレベルおよび/または活性を調節するために、CRISPR/Casシステムにおいて機能することができる。Casタンパク質は、標的ポリヌクレオチドへ結合し、物理的な妨害によって転写を予防するか、または核酸配列を編集して、非機能性遺伝子産物を得ることができる。

20

【0274】

いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中のカーゴは、ガイドRNA(gRNA)などのガイド核酸と複合体を形成する、Casタンパク質を含むまたはコードする。いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中のカーゴは、単一ガイドRNA(sgRNA)などの単一ガイド核酸と複合体を形成する、Casタンパク質を含むまたはコードする。いくつかの態様において、本明細書に開示される送達ビヒクル中のカーゴは、Casタンパク質と複合体を形成することが可能である、ガイドRNA(一例として、sgRNA)などのガイド核酸と任意に複合体化したRNA結合タンパク質(RBP)を、含むまたはコードする。

30

【0275】

あらゆる好適なCRISPR/Casシステムの1以上の構成要素は、本開示の送達ビヒクルによって送達されることができる。CRISPR/Casシステムは、様々な命名システムを用いて参照されることができる。例示的な命名システムは、Makarova,K.S.et al, “ An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems,” *Nat Rev Microbiol*(2015)13:722-736 and Shmakov,S.et al, “ Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems,” *Mol Cell*(2015)60:1-13に提供されている。CRISPR/Casシステムは、I型システム、II型システム、III型システム、IV型システム、V型システム、VI型システム、またはいずれかの他の好適なCRISPR/Casシステムであることができる。本明細書において使用されるCRISPR/Casシステムは、クラス1、クラス2、またはいずれかの他の好適に分類されたCRISPR/Casシステムであることができる。クラス1またはクラス2の決定は、エフェクターモジュールをコードする遺伝子に基づくことができる。クラス1システムは、概して、マルチサブユニットcrRNA-エフェクター複合体を有するが、一方でクラス2システムは、概して、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、またはcrRNA-エフェクター複合体などの単一タンパク質を有する。クラス1 CRISPR/Casシステムは、複数のCasタンパク質の複合体を使用して調節を行うことができる。クラス1 CRISPR/Casシステムは、例えば、I型(一例として、I、IA、IB、IC、ID、IE、IF、IU)、III型(一例として、III、IIIA、IIIB

40

50

、IIIC、IIID)、およびIV型(一例として、IV、IVA、IVB)CRISPR/Cas型を含むことができる。クラス2 CRISPR/Casシステムは、単一の大きなCasタンパク質を使用して、調節を行うことができる。クラス2 CRISPR/Casシステムは、例えば、II型(一例として、II、IIA、IIB)、およびV型CRISPR/Cas型を含むことができる。CRISPRシステムは、互いに相補的であることができ、および/またはCRISPR遺伝子座標的化を促進するために機能単位をトランスで与えることができる。

【0276】

本開示の送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、クラス1またはクラス2 Casタンパク質を含む、またはコードすることができる。Casタンパク質は、I型、II型、III型、IV型、V型、またはVI型Casタンパク質であることができる。Casタンパク質は1以上のドメインを含むことができる。ドメインの非限定的な例は、ガイド核酸認識および/または結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン(一例として、DNaseまたはRNaseドメイン、RuvC、HNH)、DNA結合ドメイン、RNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質-タンパク質相互作用ドメイン、および二量体化ドメインを包含する。ガイド核酸認識および/または結合ドメインはガイド核酸と相互作用することができる。ヌクレアーゼドメインは核酸切断のための触媒活性を含むことができる。ヌクレアーゼドメインは核酸切断を予防するための触媒活性を欠くことができる。Casタンパク質は、他のタンパク質またはポリペプチドへ融合されたキメラCasタンパク質であることができる。Casタンパク質は、例えば、異なるCasタンパク質由来のドメインを含む、様々なCasタンパク質のキメラであることができる。

【0277】

本開示の送達ビヒクルによって送達されることができるCasタンパク質の非限定的な例は、c2c1、Cas13a(以前のC2c2)、Cas13b、Cas13c、Cas13d、c2c3、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e(CasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9(Csn1またはCsx12)、Cas10、Cas10d、Cas14、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Cas12a(以前のCpf1)、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1(CasA)、Cse2(CasB)、Cse3(CasE)、Cse4(CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、およびCul966、ならびにこれらのホモログまたは修飾バージョンを包含する。突然変異Cas9タンパク質またはCas9バリエーションの非限定的な例は、SpG、SpRY、eSpCas9(1.1)、SpCas9-HF1、nSpCas9、SpCas9(H840A)、dSpCas9、SpCas9(N863A)、SpCas9(D839A)、SpCas9(H983A)、およびChuang CK et al., Int J Mol Sci. 2021 Sep 13; 22(18): 9872に記載されているものを包含し、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0278】

本開示の送達ビヒクルによって送達されることができるCasタンパク質の別の例は、Cas14を包含する。Cas14タンパク質またはポリペプチド(「CasZ」タンパク質またはポリペプチドともまた称される)は、標的核酸、および/または標的核酸に関連するポリペプチド(一例として、ヒストン尾部のメチル化またはアセチル化)に、結合および/または修飾(一例として、切断、ニック、メチル化剤、脱メチル化剤、等)することができる(一例として、いくつかの場合において、CasZタンパク質は活性を有する融合パートナーを包含し、いくつかの場合において、CasZタンパク質はヌクレアーゼ活性を提供する)。いくつかの場合において、Cas14タンパク質またはポリペプチドは、天然に存在するタンパク質(一例として、原核細胞に天然に存在する)である(一例として、CasZタンパク質)。他の場合において、Cas14タンパク質またはポリペプチドは、天然に存在するポリペプチドではない(一例として、Cas14タンパク質は、バリエーションCas14タンパク質、キメラタンパク質、および同様のものである)。Cas14タンパク質は、Cas14タンパク質の一次アミノ酸配列に関して連続していないが、しかし、タンパク質が生産されて折り畳まれ

るとRuvCドメインを形成する、3つの部分RuvCドメイン(RuvC-I、RuvC-II、およびRuvC-III、また、本明細書においてサブドメインとも称される)を包含する。天然に存在するCas14タンパク質は、標的核酸(一例として、二重ストランドDNA(dsDNA))中の特定の配列での切断を触媒するエンドヌクレアーゼとして機能する。配列特異性は、標的DNA内の標的配列へハイブリダイズする、関連ガイドRNAによって提供される。天然に存在するCas14ガイドRNAは、crRNAであり、ここで、crRNAは、(i)標的DNA中の標的配列へハイブリダイズするガイド配列、および(ii)Cas14タンパク質へ結合するタンパク質結合セグメントを包含する。Cas14タンパク質の非限定的な例は、米国特許出願公開第US20200172886号および同第US20210214697号、Harrington LB et al., Science.2018 Nov 16;362(6416):839-842;Aquino-Jarquin G.Nanomedicine.2019 Jun;18:428-431に記載されるものを包含し;これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの場合において、本明細書に開示されるカーゴは、Cas14ポリペプチド、またはCas14ポリペプチドをコードする核酸分子を含む。いくつかの場合において、本明細書に開示されるカーゴは、Cas14aポリペプチド、またはCas14aポリペプチドをコードする核酸分子を含む。いくつかの場合において、本明細書に開示されるカーゴは、Cas14bポリペプチド、またはCas14bポリペプチドをコードする核酸分子を含む。いくつかの場合において、本明細書に開示されるカーゴは、Cas14cポリペプチド、またはCas14cポリペプチドをコードする核酸分子を含む。

10

【0279】

Casタンパク質は、あらゆる好適な生物に由来することができる。非限定的な例は、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus thermophilus*、*Streptococcus sp.*、*Staphylococcus aureus*、*Nocardiopsis dassonvillei*、*Streptomyces pristinae spiralis*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptosporangium roseum*、*Streptosporangium roseum*、*Alicyclobacillus acidocaldarius*、*Bacillus pseudomycoides*、*Bacillus selenitireducens*、*Exiguobacterium sibiricum*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Lactobacillus salivarius*、*Microscilla marina*、*Burkholderiales bacterium*、*Polaromonas naphthalenivorans*、*Polaromonas sp.*、*Crocospaera watsonii*、*Cyanothece sp.*、*Microcystis aeruginosa*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Synechococcus sp.*、*Acetohalobium arabaticum*、*Ammonifex degensii*、*Caldicelulosiruptor beccarii*、*Candidatus Desulforudis*、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*、*Finnegoldia magna*、*Natronaerobius thermophilus*、*Pelotomaculum thermopropionicum*、*Acidithiobacillus caldus*、*Acidithiobacillus ferrooxidans*、*Allochromatium vinosum*、*Marinobacter sp.*、*Nitrosococcus halophilus*、*Nitrosococcus watsoni*、*Pseudoalteromonas haloplanktis*、*Ktedonobacter racemifer*、*Methanohalobium evestigatum*、*Anabaena variabilis*、*Nodularia spumigena*、*Nostoc sp.*、*Arthrospira maxima*、*Arthrospira platensis*、*Arthrospira sp.*、*Lyngbya sp.*、*Microcoleus chthonoplastes*、*Oscillatoria sp.*、*Petrogoba mobilis*、*Thermosiphon africanus*、*Acaryochloris marina*、*Leptotrichia shahii*、*Leptotrichia wadeii*、*Leptotrichia wadeii F0279*、*Rhodobacter capsulatus SB1003*、*Rhodobacter capsulatus R121*、*Rhodobacter capsulatus DE442*、*Lachnospiraceae bacterium NK4A179*、*Lachnospiraceae bacterium MA2020*、*Clostridium aminophilum DSM 10710*、*Paludibacter propionigenes WB4*、*Carnobacterium gallinarum DMS4847*、*Carnobacterium gallinarum DSM4847*、および*Francisella novicida*を包含する。いくつかの側面において、生物は、*Streptococcus pyogenes*(*S.pyogenes*)である。いくつかの側面において、生物は、*Staphylococcus aureus*(*S.aureus*)である。いくつかの側面において、生物は、*Streptococcus thermophilus*(*S.thermophilus*)である。

20

30

40

【0280】

50

Casタンパク質は、*Veillonella atypical*、*Fusobacterium nucleatum*、*Filifactor alocis*、*Solobacterium moorei*、*Coprococcus catus*、*Treponema denticola*、*Peptoniphilus duerdenii*、*Catenibacterium mitsuokai*、*Streptococcus mutans*、*Listeria innocua*、*Listeria seeligeri*、*Listeria weihenstephanensis* FSL R90317、*Listeria weihenstephanensis* FSL M60635、*Staphylococcus pseudintermedius*、*Acidaminococcus intestine*、*Olsenella uli*、*Oenococcus kitaharae*、*Bifidobacterium bifidum*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus gasserii*、*Finnegoldia magna*、*Mycoplasma mobile*、*Mycoplasma gallisepticum*、*Mycoplasma ovipneumoniae*、*Mycoplasma canis*、*Mycoplasma synoviae*、*Eubacterium rectale*、*Streptococcus thermophilus*、*Eubacterium dolichum*、*Lactobacillus coryniformis* subsp. *Torquens*、*Ilyobacter polytropus*、*Ruminococcus albus*、*Akkermansia muciniphila*、*Acidothermus cellulolyticus*、*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium dentium*、*Corynebacterium diphtheria*、*Elusimicrobium minutum*、*Nitratifactor salsuginis*、*Sphaerochaeta globus*、*Fibrobacter succinogenes* subsp. *Succinogenes*、*Bacteroides fragilis*、*Capnocytophaga ochracea*、*Rhodopsseudomonas palustris*、*Prevotella micans*、*Prevotella ruminicola*、*Flavobacterium columnare*、*Aminomonas paucivorans*、*Rhodospirillum rubrum*、*Candidatus Puniceispirillum marinum*、*Verminephrobacter eiseniae*、*Ralstonia syzygii*、*Dinoroseobacter shibae*、*Azospirillum*、*Nitrobacter hamburgensis*、*Bradyrhizobium*、*Wolinella succinogenes*、*Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*、*Helicobacter mustelae*、*Bacillus cereus*、*Acidovorax ebreus*、*Clostridium perfringens*、*Parvibaculum lavamentivorans*、*Roseburia intestinalis*、*Neisseria meningitidis*、*Pasteurella multocida* subsp. *Multocida*、*Sutterella wadsworthensis*、*proteobacterium*、*Legionella pneumophila*、*Parasutterella excrementihominis*、*Wolinella succinogenes*、および *Francisella novicida* を包含する種々の細菌種に由来することができるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0281】

本明細書に開示されるCasタンパク質は、Casタンパク質の野生型または修飾形態であることができる。Casタンパク質は、野生型または修飾Casタンパク質の活性バリエーション、不活性バリエーション、または断片であることができる。Casタンパク質は、野生型バージョンのCasタンパク質に対して、欠失、挿入、置換、バリエーション、突然変異、融合、キメラ、またはこれらのいずれかの組合せなどのアミノ酸変化を含むことができる。Casタンパク質は、野生型例示的Casタンパク質と、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性または配列類似性を有するポリペプチドであることができる。Casタンパク質は、野生型例示的Casタンパク質と、最大で約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有するポリペプチドであることができる。バリエーションまたは断片は、野生型もしくは修飾Casタンパク質またはその一部と、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性または配列類似性を有することができる。バリエーションまたは断片は、核酸切断活性を欠いている間に、ガイド核酸と複合体を形成して核酸遺伝子座へ標的化されることができる。

【0282】

Casタンパク質は、DNaseドメインなどの、1以上のヌクレアーゼドメインを含むことができる。例えば、Cas9タンパク質は、RuvC様ヌクレアーゼドメインおよび/またはHNH様ヌクレアーゼドメインを含むことができる。RuvCおよびHNHドメインは、各々、二重ストランドDNAの異なるドメインをカットして、DNAを二重ストランド破壊するこ

とができる。Casタンパク質は、ただ1つのヌクレアーゼドメイン(一例として、Cpf1はRuvCドメインを含むが、しかしHNHドメインを欠く)を含むことができる。

【0283】

Casタンパク質は、野生型Casタンパク質のヌクレアーゼドメイン(一例として、RuvCドメイン、HNHドメイン)と少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性または配列類似性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

【0284】

Casタンパク質は、遺伝子発現の調節を最適化するように修飾されることができる。Casタンパク質は、核酸結合親和性、核酸結合特異性、および/または酵素活性を増加または減少させるように修飾されることができる。Casタンパク質はまた、安定性などのタンパク質のあらゆる他の活性または特性を変化させるように修飾されることができる。例えば、Casタンパク質の1以上のヌクレアーゼドメインは、タンパク質の機能に必須ではないドメインを除去するために、または遺伝子発現を調節するためにCasタンパク質の活性を最適化する(一例として、増強または低減する)ために、修飾、欠失、もしくは不活性化されることができ、またはCasタンパク質は、トランケートされることができる。

【0285】

いくつかの態様において、本開示の送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、標的DNA配列の転写活性化または抑制を誘導することができるDNAヌクレアーゼに由来する、ヌクレアーゼヌルDNA結合タンパク質を含む。いくつかの態様において、カーゴは、標的RNA配列の転写活性化または抑制を誘導することができるRNAヌクレアーゼに由来する、ヌクレアーゼヌルRNA結合タンパク質を含むか、またはコードする。例えば、カーゴは、切断活性を欠くCasタンパク質を含むかまたはコードすることができる。

【0286】

Casタンパク質は、融合タンパク質であることができる。例えば、Casタンパク質は、異種の機能ドメインへ融合されることができる。異種の機能ドメインは、切断ドメイン、後成的修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、またはリプレッサードメインを含むことができる。Casタンパク質はまた、安定性の増加または減少を提供する異種ポリペプチドへ融合されることができる。融合されたドメインまたは異種ポリペプチドは、N末端、C末端、またはCasタンパク質の内部に位置づけられることができる。

【0287】

遺伝子の調節は、目的のあらゆる遺伝子であることができる。本明細書に記載される遺伝子の遺伝子ホモログがカバーされることが企図される。例えば、遺伝子は、本明細書に開示される遺伝子に対して、ある特定の同一性および/または相同性を呈することができる。したがって、(核酸またはタンパク質レベルで)約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の相同性を呈する遺伝子が修飾されることができるものと企図される。したがって、(核酸またはタンパク質レベルで)約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を呈するまたは呈する遺伝子が修飾されることができるものとまた企図される。

【0288】

Casタンパク質は、あらゆる形態で提供されることができる。例えば、Casタンパク質は、単独の、またはガイド核酸と複合体化したCasタンパク質などの、タンパク質の形態で提供されることができる。Casタンパク質は、Casタンパク質をコードする核酸、例を挙げるならRNA(一例として、メッセンジャーRNA(mRNA))またはDNAなどの形態で提供されることができる。

【0289】

10

20

30

40

50

本開示の送達ビヒクルによって送達されるCasタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞または生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化されることができる。

【0290】

いくつかの態様において、Casタンパク質は、デッド(dead)Casタンパク質である。デッドCasタンパク質は、核酸切断活性を欠くタンパク質であることができる。

【0291】

Casタンパク質は、野生型Casタンパク質の修飾形態を含むことができる。野生型Casタンパク質の修飾形態は、Casタンパク質の核酸切断活性を低減させる、アミノ酸変化(一例として、欠失、挿入、または置換)を含むことができる。例えば、修飾形態のCasタンパク質は、野生型Casタンパク質(一例として、*S. pyogenes*からのCas9)の核酸切断活性の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満を有することができる。Casタンパク質の修飾形態は、実質的な核酸切断活性を有することができない。Casタンパク質が、実質的な核酸切断活性を有しない修飾形態である場合、Casタンパク質は、酵素的に不活性および/または「デッド」(「d」と略記される)と称されることができる。デッドCasタンパク質(一例として、dCas、dCas9)は、標的ポリヌクレオチドへ結合することができるが、しかし、標的ポリヌクレオチドを切断しなくてもよい。いくつかの側面において、デッドCasタンパク質は、デッドCas9タンパク質である。

【0292】

dCas9ポリペプチドは、単一ガイドRNA(sgRNA)と会合して、標的DNAの転写を活性化または抑制することができる。sgRNAは、操作されたキメラ受容体ポリペプチドを発現する細胞へと導入されることができる。いくつかの場合において、そのような細胞は、同じ核酸を標的とする1以上の異なるsgRNAを含有する。他の場合において、sgRNAは、細胞中の異なる核酸を標的とする。ガイドRNAによって標的化される核酸は、免疫細胞などの細胞で発現されるあらゆるものであることができる。標的化される核酸は、免疫細胞調節に関与する遺伝子であることができる。いくつかの態様において、核酸は、がんに関連する。がんに関連する核酸は、細胞周期遺伝子、細胞応答遺伝子、アポトーシス遺伝子、または食作用遺伝子であることができる。組換えガイドRNAは、CRISPRタンパク質、ヌクレアーゼヌルCRISPRタンパク質、そのバリエーション、その誘導体、またはその断片によって認識されることができる。

【0293】

酵素的に不活性とは、配列特異的な様式でポリヌクレオチド中の核酸配列へ結合することができるが、しかし、標的ポリヌクレオチドを切断しなくてもよい、ポリペプチドを指すことができる。酵素的に不活性な部位特異的ポリペプチドは、酵素的に不活性なドメイン(一例として、ヌクレアーゼドメイン)を含むことができる。酵素的に不活性とは、活性がないことを指すことができる。酵素的に不活性とは、実質的に活性がないことを指すことができる。酵素的に不活性とは、本質的に活性がないことを指すことができる。酵素的に不活性とは、野生型の例示的な活性(一例として、核酸切断活性、野生型Cas9活性)と比較して、1%未満、2%未満、3%未満、4%未満、5%未満、6%未満、7%未満、8%未満、9%未満、または10%未満の活性を指すことができる。

【0294】

Casタンパク質のうち1つまたは複数のヌクレアーゼドメイン(一例として、RuvC、HNH)は、それらがもはや機能的でないか、または低減したヌクレアーゼ活性を含むように、欠失または突然変異されることができる(一例として、非活性化またはデッドCas、すなわち「dCas」)。例えば、少なくとも2つのヌクレアーゼドメイン(一例として、Cas9)を含むCasタンパク質では、ヌクレアーゼドメインのうち1つが欠失または突然変異されている場合、ニックアーゼとして公知の得られたCasタンパク質は、二重ストランドDNA内のCRISPR RNA(crRNA)認識配列で単ストランド破壊を産生することができるが、しかし二重ストランド破壊を産生できない。そのようなニックアーゼは、相補ストランド

または非相補ストランドを切断することができるが、しかし、両方を切断しなくてもよい。Casタンパク質(一例として、Cas9タンパク質中のRuvCおよびHNHヌクレアーゼドメインの両方;Cpf1タンパク質中のRuvCヌクレアーゼドメイン)のヌクレアーゼドメインの全てが、欠失または突然変異されている場合、得られたCasタンパク質は、二重ストランドDNAの両方のストランドを切断する能力が低減しているか、または全くない可能性がある。Cas9タンパク質をニッカーゼへと変換することができる突然変異の例は、*S. pyogenes*由来のCas9のRuvCドメインにおけるD10A(Cas9の10位におけるアスパラギン酸からアラニンへの)突然変異である。*S. pyogenes*からのCas9のHNHドメイン中のH939A(アミノ酸839位でヒスチジンからアラニンへ)またはH840A(アミノ酸840位でヒスチジンからアラニンへ)は、Cas9をニッカーゼへと変換することができる。Cas9タンパク質をデッドCas9へと変換することができる突然変異の例は、*S. pyogenes*からのCas9の、RuvCドメインにおけるD10A(Cas9の10位におけるアスパラギン酸からアラニンへの)突然変異、およびHNHドメインにおけるH939A(アミノ酸839位におけるヒスチジンからアラニンへの)またはH840A(アミノ酸840位におけるヒスチジンからアラニンへの)である。

10

【0295】

デッドCasタンパク質は、野生型バージョンのタンパク質と比較して、1以上の突然変異を含むことができる。突然変異は、野生型Casタンパク質の複数の核酸切断ドメインの1以上における核酸切断活性の、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満をもたらすことができる。突然変異は、標的核酸の相補ストランドを切断する能力を保持するが、しかし、標的核酸の非相補ストランドを切断する能力を低減させる、複数の核酸切断ドメインのうち1以上をもたらすことができる。突然変異は、標的核酸の非相補ストランドを切断する能力を保持するが、しかし、標的核酸の相補ストランドを切断する能力を低減させる、複数の核酸切断ドメインのうち1以上をもたらすことができる。突然変異は、標的核酸の相補ストランドおよび非相補ストランドを切断する能力を欠く、複数の核酸切断ドメインの1以上をもたらすことができる。ヌクレアーゼドメインにおいて突然変異される残基は、ヌクレアーゼの1以上の触媒残基に対応することができる。例えば、Asp10、His840、Asn854、およびAsn856などの野生型例示的*S. pyogenes* Cas9ポリペプチド中の残基は、複数の核酸切断ドメイン(一例として、ヌクレアーゼドメイン)の1以上を不活性化するために、突然変異されることができる。Casタンパク質のヌクレアーゼドメインにおいて突然変異される残基は、例えば、配列および/または構造アラインメントによって決定されるように、野生型*S. pyogenes* Cas9ポリペプチド中の残基Asp10、His840、Asn854、およびAsn856に対応することができる。

20

30

【0296】

非限定的な例として、残基D10、G12、G17、E762、H840、N854、N863、H982、H983、A984、D986、および/またはA987(または、Casタンパク質のいずれかの対応する突然変異)は、突然変異されることができる。例えば、一例として、D10A、G12A、G17A、E762A、H840A、N854A、N863A、H982A、H983A、A984A、および/またはD986Aである。アラニン置換以外の突然変異が好適であることができる。

40

【0297】

D10A突然変異は、DNA切断活性を実質的に欠くCas9タンパク質(一例として、デッドCas9タンパク質)を生産するために、H840A、N854A、またはN856A突然変異のうち1以上と組み合わせられすることができる。H840A突然変異は、DNA切断活性を実質的に欠く部位特異的ポリペプチドを生産するために、D10A、N854A、またはN856A突然変異のうち1以上と組み合わせられることができる。N854A突然変異は、DNA切断活性を実質的に欠く部位特異的ポリペプチドを生産するために、H840A、D10A、またはN856A突然変異のうち1以上と組み合わせられることができる。N856A突然変異は、DNA切断活性を実質的に欠く部位特異的ポリペプチドを生産するために、H840A、N854A、またはD10A突然変異のうち1以上と組み合わせられることができる。

50

【0298】

いくつかの態様において、Casタンパク質は、クラス2 Casタンパク質である。いくつかの態様において、Casタンパク質は、II型Casタンパク質である。いくつかの態様において、Casタンパク質は、Cas9タンパク質、Cas9タンパク質の修飾バージョン、またはCas9タンパク質に由来する。例えば、切断活性を欠くCas9タンパク質。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、*S.pyogenes*(一例として、SwissProt受託番号Q99ZW2)由来のCas9タンパク質である。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、*S.aureus*(一例として、SwissProt受託番号J7RUA5)由来のCas9である。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、*S.pyogenes*または*S.Aureus*に由来するCas9タンパク質の修飾バージョンである。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、*S.pyogenes*または*S.Aureus*に由来するCas9タンパク質に由来する。例えば、切断活性を欠く、*S.pyogenes*または*S.Aureus*のCas9タンパク質。

10

【0299】

Cas9は、概して、野生型例示的Cas9ポリペプチド(一例として、*S.pyogenes*からのCas9)と、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有するポリペプチドを指すことができる。Cas9は、野生型例示的Cas9ポリペプチド(一例として、*S.pyogenes*から)と、最大で約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%の配列同一性および/または配列類似性を有するポリペプチドを指すことができる。Cas9は、欠失、挿入、置換、バリエーション、突然変異、融合、キメラ、またはこれらのいずれかの組合せなどのアミノ酸変化を含むことができる、Cas9タンパク質の野生型または修飾形態を指すことができる。

20

【0300】

いくつかの態様において、カーゴは、「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」または「ZFN」を含むまたはコードする。ZFNは、FokIの切断ドメインなどの切断ドメインと、DNAおよびRNAなどのポリヌクレオチドに結合することができる少なくとも1つのジンクフィンガーモチーフ(一例として、少なくとも2、3、4、または5つのジンクフィンガーモチーフ)と、の間の、融合物を指す。ある特定の配向および間隔での2つの個々のZFNのポリヌクレオチド中のある特定の位置におけるヘテロ二量体化は、ポリヌクレオチドの切断をもたらすことができる。例えば、DNAへ結合するZFNは、DNAの二重ストランド破壊を誘導することができる。2つの切断ドメインがDNAを二量体化および切断することを可能にするために、2つの個々のZFNは、それらのC末端がある特定の距離だけ離れているDNAの逆ストランドに結合することができる。いくつかの場合において、ジンクフィンガードメインと切断ドメインとの間のリンカー配列は、各結合部位の5'端が約5~7塩基対離していることを必要とすることができる。いくつかの場合において、切断ドメインは、各ジンクフィンガードメインのC末端へ融合される。例示的なZFNは、Urnov et al., Nature Reviews Genetics, 2010, 11:636-646; Gaj et al., Nat Methods, 2012, 9(8):805-7; 米国特許第6,534,261号; 同第6,607,882号; 同第6,746,838号; 同第6,794,136号; 同第6,824,978号; 同第6,866,997号; 同第6,933,113号; 同第6,979,539号; 同第7,013,219号; 同第7,030,215号; 同第7,220,719号; 同第7,241,573号; 同第7,241,574号; 同第7,585,849号; 同第7,595,376号; 同第6,903,185号; 同第6,479,626号; ならびに米国特許出願公開第2003/0232410号および同第2009/0203140号に記載されているものが含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0301】

いくつかの態様において、ZFNを含む、カーゴタンパク質またはカーゴ核酸分子によってコードされるタンパク質は、DNAなどの標的ポリヌクレオチドに二重ストランド破壊を産生することができる。DNAの二重ストランド破壊は、遺伝子修飾(複数可)(一例として、核酸編集)の導入を可能にするDNA破壊修復をもたらすことができる。DNA破壊修復は、非相同末端接合(NHEJ)または相同組換え修復(homology-directed repair: HDR)を介して起こることができる。HDRでは、標的DNAのフランキング(flanking)部位

50

に相同アームを含有するドナーDNA修復テンプレートが、提供されることができる。いくつかの態様において、ZFNは、部位特異的単ストランドDNA破壊またはニックを誘導し、したがってHDRをもたらす、ジンクフィンガーニッカーゼである。ジンクフィンガーニッカーゼの説明は、一例として、Ramirez et al., Nucl Acids Res, 2012, 40(12):5560-8; Kim et al., Genome Res, 2012, 22(7):1327-33に見られる。いくつかの態様において、ZFNは、ポリヌクレオチド(一例として、DNAおよび/またはRNA)に結合するが、しかし、そのポリヌクレオチドは切断されることが不可能である。

【0302】

いくつかの態様において、ZFNを含む、カーゴタンパク質またはカーゴ核酸分子によってコードされるタンパク質の切断ドメインは、野生型切断ドメインの修飾形態を含む。切断ドメインの修飾形態は、切断ドメインの核酸切断活性を低減させる、アミノ酸変化(一例として、欠失、挿入、または置換)を含むことができる。例えば、修飾形態の切断ドメインは、野生型切断ドメインの核酸切断活性の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満を有することができる。切断ドメインの修飾形態は、実質的な核酸切断活性を有することができない。いくつかの態様において、切断ドメインは、酵素的に不活性である。

【0303】

いくつかの態様において、カーゴタンパク質、またはカーゴ核酸分子によってコードされるタンパク質は、「TALEN」または「TALエフェクターヌクレアーゼ」を含む。TALENとは、DNA結合タンデムリピートの中心ドメインおよび切断ドメインを概して含有する、操作された転写アクチベータ様エフェクターヌクレアーゼを指す。TALENは、TALエフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメインへ融合することによって生産されることができる。いくつかの場合において、DNA結合タンデムリピートは、33~35アミノ酸長を含み、少なくとも1つの特異的DNA塩基対を認識することができる12位および13位に2つの超可変アミノ酸残基を含有する。転写アクチベータ様エフェクター(transcription activator-like effector:TALE)タンパク質は、野生型もしくは突然変異型FokIエンドヌクレアーゼまたはFokIの触媒ドメインなどのヌクレアーゼへ融合されることができる。例えば、切断特異性または活性を改善するTALENにおける使用のために、FokIに対するいくつかの突然変異が作製されている。そのようなTALENは、あらゆる所望のDNA配列へ結合するように操作されることができる。TALENは、標的DNA配列に二重ストランド破壊を生じさせ、次いで、NHEJまたはHDRを受けることによって、遺伝子修飾(一例として、核酸配列編集)を産生するために使用されることができる。いくつかの場合において、単ストランドドナーDNA修復テンプレートは、HDRを促すために提供される。TALENおよび遺伝子編集のためのそれらの使用の詳細な説明は、一例として、米国特許第8,440,431号;同第8,440,432号;同第8,450,471号;同第8,586,363号;および8,697,853号;Scharenberg et al., Curr Gene Ther, 2013, 13(4):291-303; Gaj et al., Nat Methods, 2012, 9(8):805-7; Beurdeley et al., Nat Commun, 2013, 4:1762; および Joung and Sander, Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(1):49-55に見られる。

【0304】

いくつかの態様において、TALENは、ヌクレアーゼ活性が低減するように操作される。いくつかの態様において、TALENのヌクレアーゼドメインは、野生型ヌクレアーゼドメインの修飾形態を含む。ヌクレアーゼドメインの修飾形態は、ヌクレアーゼドメインの核酸切断活性を低減させる、アミノ酸変化(一例として、欠失、挿入、または置換)を含むことができる。例えば、修飾形態のヌクレアーゼドメインは、野生型ヌクレアーゼドメインの核酸切断活性の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満を有することができる。ヌクレアーゼドメインの修飾形態は、実質的な核酸切断活性を有することができない。いくつかの態様において、ヌクレアーゼドメインは、酵素的に不活性である。

【0305】

いくつかの態様において、転写アクチベータ様エフェクター(TALE)タンパク質は、転写をモジュレートすることができ、かつヌクレアーゼを含まないドメインへ融合される。いくつかの態様において、転写アクチベータ様エフェクター(TALE)タンパク質は、転写アクチベータとして機能するように設計されている。いくつかの態様において、転写アクチベータ様エフェクター(TALE)タンパク質は、転写リプレッサーとして機能するように設計されている。例えば、転写アクチベータ様エフェクター(TALE)タンパク質のDNA結合ドメインは、1以上の転写活性化ドメイン、または1以上の転写抑制ドメインへ融合(一例として、連結されている)されることができる。転写活性化ドメインの非限定的な例は、単純ヘルペスVP16活性化ドメイン、およびVP16活性化ドメインの四量体リピート、一例として、VP64活性化ドメインを包含する。他の例は、VP16、VP32、VP64、VPR、p65、RTA、KRAB、またはP65HSF1を包含する。転写抑制ドメインの非限定的な例は、Kruppel関連ボックスドメインを包含する。

10

【0306】

いくつかの態様において、カーゴタンパク質、またはカーゴ核酸分子によってコードされるタンパク質は、メガヌクレアーゼを含む。メガヌクレアーゼは、概して、非常に特異的であることができる、レアカット(rare-cutting)エンドヌクレアーゼまたはホーミングエンドヌクレアーゼを指す。メガヌクレアーゼは、少なくとも12塩基対の長さ、一例として、12~40塩基対の長さ、12~50塩基対の長さ、または12~60塩基対の長さの範囲にわたるDNA標的部位を認識することができる。メガヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼの少なくとも1つの触媒ドメイン、および核酸標的配列を特定化する少なくとも1つのDNA結合ドメインまたはタンパク質を含む、あらゆる融合タンパク質などのモジュール式DNA結合ヌクレアーゼであることができる。DNA結合ドメインは、単ストランドまたは二重ストランドDNAを認識する少なくとも1つのモチーフを含有することができる。メガヌクレアーゼは、単量体または二量体であることができる。いくつかの態様において、メガヌクレアーゼは、天然に存在する(自然界で見出される)または野生型であり、他の実例において、メガヌクレアーゼは、非天然、人工、操作された、合成、合理的に設計された、または人工のものである。いくつかの態様において、本開示のメガヌクレアーゼは、I-CreIメガヌクレアーゼ、I-CeuIメガヌクレアーゼ、I-MsoIメガヌクレアーゼ、I-SceIメガヌクレアーゼ、そのバリエーション、その誘導体、およびその断片を包含する。有用なメガヌクレアーゼおよび遺伝子編集におけるそれらの適用の詳細な説明は、一例として、Silva et al., Curr Gene Ther, 2011, 11(1):11-27; Zaslavoskiy et al., BMC Bioinformatics, 2014, 15:191; Takeuchi et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(11):4061-4066、ならびに米国特許第7,842,489号;同第7,897,372号;同第8,021,867号;同第8,163,514号;同第8,133,697号;同第8,021,867号;同第8,119,361号;同第8,119,381号;同第8,124,36号;および8,129,134号に見られる。

20

30

【0307】

いくつかの態様において、メガヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインは、野生型ヌクレアーゼドメインの修飾形態を含む。ヌクレアーゼドメインの修飾形態は、ヌクレアーゼドメインの核酸切断活性を低減させる、アミノ酸変化(一例として、欠失、挿入、または置換)を含むことができる。例えば、修飾形態のヌクレアーゼドメインは、野生型ヌクレアーゼドメインの核酸切断活性の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、または1%未満を有することができる。ヌクレアーゼドメインの修飾形態は、実質的な核酸切断活性を有することができない。いくつかの態様において、ヌクレアーゼドメインは、酵素的に不活性である。いくつかの態様において、メガヌクレアーゼは、DNAに結合することができるが、しかし、DNAを切断することはできない。

40

【0308】

標的化可能な3'オーバーハングヌクレアーゼ

いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、DNA中に3'オーバーハング二重ストランド破壊を産生するヌクレアーゼ、一例として、IIS型

50

制限酵素またはIIS型制限酵素の機能ドメインを含む。本明細書において使用される「IIS型制限酵素」という用語は、非対称DNA配列を認識し、その認識配列の外側を切断する、制限酵素である。一態様において、制限酵素は、AclIである。

【0309】

いくつかの場合において、カーゴは、二量体化依存性ヌクレアーゼドメイン、一例として、IIS型制限酵素ドメインを含む、標的化可能なヌクレアーゼ融合タンパク質を含む。実例としては、標的化可能なヌクレアーゼ融合タンパク質は、二量体化依存性ヌクレアーゼドメインを含み、ここで、ドメインは、DNA中に3'オーバーハング二重ストランド破壊;およびDNA結合ドメイン(DBD)を産生する。いくつかの場合において、二量体化依存性ヌクレアーゼドメインは、IIS型制限酵素ヌクレアーゼドメイン、一例として、AclIヌクレアーゼドメインである。

10

【0310】

いくつかの場合において、DBDは、配列依存的様式でその標的核酸へ結合する、タンパク質またはタンパク質ドメインである。いくつかの場合において、本明細書に開示されるDBDは、ジンクフィンガーアレイまたはdCas9のいずれかである。

【0311】

いくつかの場合において、ヌクレアーゼ融合タンパク質は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質である。本明細書に記載されるジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質は、二量体化の際にDNA中に3'オーバーハング二重ストランド破壊を産生するヌクレアーゼドメイン(すなわち、ヌクレアーゼ活性は、「二量体化依存性」である);任意のアミノ酸リンカー;および1以上のカルボキシ末端またはアミノ末端のジンクフィンガー(複数可)を含むジンクフィンガードメインを含む。1以上のカルボキシ末端またはアミノ末端ジンクフィンガー(複数可)を含む単量体形態のジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質は、標的部位への結合の際または結合の前のいずれかで一緒に接合して二量体を形成し、それによって、ヌクレアーゼ切断を活性化することができる。本明細書に記載されるジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質は、非相同末端接合によるヌクレアーゼ誘導性DNA破壊の修復を介して、高頻度で挿入/欠失突然変異(インデル)を作製するために、使用されることができる。

20

【0312】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質はまた、目的の外來性核酸配列を、細胞のゲノム遺伝子座の標的部位へと、コピー、組み込み、または挿入するために使用されることができる。いくつかの態様において、本明細書において提供される方法は、外來性核酸「ドナーテンプレート」配列、およびジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質またはジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質自体をコードする別の核酸配列を、細胞の核へ提供することを含む。いくつかの場合において、外來性核酸「ドナーテンプレート」配列およびジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質の両方が、本明細書において提供される送達ビヒクルによって送達される。外來性核酸ドナーテンプレート配列は、ゲノム遺伝子座の標的部位内の配列へ相同な末端配列を含む。ジンクフィンガーは、ゲノム標的部位を特異的に認識して結合するように設計されることができる。標的部位へ結合する際、融合タンパク質(複数可)の二量体化ヌクレアーゼドメインは、標的部位内に3'オーバーハング二重ストランド破壊を産生して、破壊を包囲する配列と外來性核酸配列との間の相同組換え修復を誘導することができ、それによって、外來性核酸配列を、細胞のゲノム遺伝子座の標的部位へとコピー、組み込み、および/または挿入する。

30

40

【0313】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質は、二量体化の際にDNAに3'オーバーハング二重ストランド破壊を産生することが可能である、あらゆるヌクレアーゼドメインを含むことができる。

【0314】

ヌクレアーゼドメインは、例えば、AclI、Alol、Bpml、BaeI、またはMmeIヌクレアーゼドメインを包含するが、これらに限定されない、IIS型制限酵素ヌクレアーゼドメ

50

インであることができる。いくつかの実例において、Aculヌクレアーゼドメインは、アミノ酸配列を有することができる。

【0315】

Aculをコードする例示的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、当技術分野で公知であり、例えば、GenBank受託番号HQ327692.1に位置づけられることができる。

【0316】

いくつかの態様において、IIS型制限酵素ヌクレアーゼドメインは、Aculのアイソシゾマー、一例として、Eco57Iを包含する。Eco57Iをコードするヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、例えば、UniProtデータベース参照番号P25239に位置づけられることができる。

【0317】

Alolをコードする例示的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、当技術分野で公知であり、例えば、GenBank受託番号AJ312389.1に位置づけられることができる。

【0318】

Bpmlをコードする例示的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、当技術分野で公知であり、例えば、GenBank受託番号ADK30556.1に位置づけられることができる。Baelをコードする例示的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、当技術分野で公知であり、例えば、GenBank受託番号ABS74060.1に位置づけられることができる。

【0319】

Mmelをコードする例示的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、当技術分野で公知であり、例えば、GenBank受託番号EU616582.1に位置づけられることができる。

【0320】

二量体化依存性ヌクレアーゼ活性を有するあらゆるIIS型制限酵素ヌクレアーゼドメインは、ジンクフィンガードメインへ融合され、本明細書に記載される方法を行うために使用されることができた。いくつかの態様において、ヌクレアーゼドメインは、ジンクフィンガードメインのC末端へ付着している。他の態様において、ヌクレアーゼドメインは、ジンクフィンガードメインのN末端へ付着している。

【0321】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質の二量体化依存性ヌクレアーゼドメインおよびジンクフィンガードメインは、アミノ酸リンカーによって一緒に接合されることができる。連結された(linked)、接合された(joined)、および融合された(fused)という用語は、融合タンパク質の2つのドメインが接合される手段を指すために、本明細書において互換的に使用される。アミノ酸リンカーは、少なくとも1つのアミノ酸のあらゆる配列、および10アミノ酸までの最大の配列を含むことができる。特定の態様では、リンカーは、ロイシン、アルギニン、グリシン、およびセリン(LRGS(配列番号50));グリシン、グリシン、グリシン、グリシン、およびセリン(GGGGS(配列番号51));または、Shell enberger, et al. Nat Biotechnol. 2009 Dec; 27(12):1186-90によって記載されているような、非標準アミノ酸、トレオニン、グルタミン酸、およびアスパラギン(XTEN)を含むことができる。

【0322】

いくつかの態様において、二量体化依存性ヌクレアーゼドメイン、ジンクフィンガードメイン、TALE、および/またはdCas9ドメインは、本明細書に記載される二量体化依存性ヌクレアーゼドメイン、ジンクフィンガードメイン、TALE、および/またはdCas9の例示的なアミノ酸配列のアミノ酸配列と、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%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有することができる。

【0323】

標的部位へ結合し、かつ二量体複合体を形成する際、ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質のヌクレアーゼドメインは、相同組換え修復を誘導するために、標的部位内に3'オーバーハング二重ストランド破壊を産生させて、その結果、標的部位内に外来性

10

20

30

40

50

核酸配列またはその一部がコピーされ、組み込まれ、および/または統合されることができる。ヌクレオチド配列相同性がある場合、ドナーテンプレートオリゴヌクレオチド配列(単ストランドまたは二重ストランドのいずれか)は、二重ストランド破壊を経験した標的DNA配列を修復するためのテンプレートとして作用し、ドナーから標的への遺伝情報の転移をもたらすことができる。そのような転移は、破壊された標的とドナーとの間に形成するヘテロ二本鎖DNAのミスマッチ補正、および/または標的の一部となる遺伝情報を再合成するためにドナーが使用される合成依存性ストランドアニリング、および/または関連プロセスに参与することができる。相同組換え修復は、ドナーヌクレオチド配列の配列の一部または全部が標的ヌクレオチドへとコピーおよび/または組み込まれるように、標的ヌクレオチドの配列の変更をもたらすことが多い。

10

【0324】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質は、所定の部位で標的配列に二重ストランド破壊を作製することができ、破壊領域のヌクレオチド配列と相同性を有するドナーテンプレートとして作用する外来性核酸配列は、ゲノム遺伝子座へとコピー、組み込み、および/または導入されることができる。二重ストランド破壊の存在は、これらの異なる修復成果の効率を大幅に増強することが示されている。ドナー配列は、物理的に統合されていてもよく、あるいは、ドナーヌクレオチドは、相同組換えを介した破壊の修復のためのテンプレートとして使用され、その結果、ドナーにおけるようなヌクレオチド配列の全部または一部がゲノム遺伝子座へと導入される。よって、ゲノム遺伝子座における配列は、変更されることができ、ある特定の態様において、ドナーヌクレオチドに存在する配列へと変換されることができる。

20

【0325】

dCas9ヌクレアーゼ融合タンパク質およびそれを用いて、ヌクレアーゼ誘導二重ストランド破壊の部位における相同組換え修復頻度を増強する方法もまた、本明細書に記載される。dCas9ヌクレアーゼ融合タンパク質は、DNA中に3'オーバーハング二重ストランド破壊を産生する二量体化依存性ヌクレアーゼドメインへ連結された、触媒的に不活性なCas9カルボキシ末端またはアミノ末端ドメインを含む。触媒的に不活性なCas9ドメインは、ネイティブのエンドヌクレアーゼ活性の喪失をもたらす突然変異(一例として、D10Aおよび/またはH841A)を含有する(Qi et al, Cell(2013))。エンドヌクレアーゼ活性は、代わりに、それが融合されている連結された二量体化依存性ヌクレアーゼドメインによって提供される。単量体形態のdCas9ヌクレアーゼ融合タンパク質は、dCas9標的的部位へ結合する前または結合する際のいずれかで一緒に接合して二量体を形成し、それによって、ヌクレアーゼ切断を活性化する。クラスター化された規則的な配置の短い回文配列リピートCRISPR)および関連するCasタンパク質は、CRISPR-Casシステムを構成する。RNAガイドCas9エンドヌクレアーゼは、配列依存的様式でDNAを特異的に標的化および切断し(Gasiunas, G., et al, Proc Natl Acad Sci USA 109, E2579-E2586(2012); Jinek, M., et al, Science 337, 816-821(2012); Sternberg, S.H., et al, Nature 507, 62(2014); Deltcheva, E., et al, Nature 471, 602-607(2011))、かつ、様々な生物およびモデルシステムにおけるプログラマブルなゲノム編集に広く使用されている(Cong, L., et al, Science 339, 819-823(2013); Jiang, W., et al, Nat. Biotechnol. 31, 233-239(2013); Sander, J.D. & Joung, J.K., Nature Biotechnol. 32, 347-355.(2014))。Cas9は、ガイドRNA; CRISPR RNA(crRNA)、およびトランス活性化RNA(tracrRNA)を作製するために一緒に会合しているまたは共有連結している2つのRNAから構成される、ガイドRNAを必要とする目的のゲノム遺伝子座のヌクレオチド配列がガイドRNAへ相補的である場合、Cas9は、その部位を認識して切断する。Cas9とcrRNAおよびtracrRNAとの三元複合体、またはCas9とガイドRNAとの二元複合体は、crRNAスペーサと一致し、かつ短いプロトスペーサ隣接モチーフともまた近接するdsDNAプロトスペーサ配列へ結合し、これを切断することができる。dCas9は、そのネイティブの触媒活性が不活性化されていても、crRNA/tracrRNA複合体またはガイドRNAと依然として会合し、次いで、標的部位を認識して結合することができる。Cas9をコードす

30

40

50

るヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、当技術分野で公知であり、かつ、例えば、GenBank受託番号NC_002737.2に位置づけられることができる。

【0326】

本明細書に記載されるdCas9ヌクレアーゼ融合タンパク質は、細胞のゲノム遺伝子座の標的部位で相同組換え修復事象を誘導するために使用されることができる。この方法は、外来性核酸配列、dCas9ヌクレアーゼ融合タンパク質をコードする核酸配列、および1以上の(一例として、少なくとも2つ)ガイドRNAを細胞の核へと提供することを含む。外来性核酸配列は、ゲノム遺伝子座の標的部位内の配列へ相同な末端配列を含む。ガイドRNAは、各dCas9/gRNA複合体が2つの「ハーフサイト(half-site)」のうち1つへ結合する所定の標的部位に、2つのdCas9ヌクレアーゼ融合物を誘導するように設計される。dCas9ドメインは、ガイドRNAおよび特異的に近接するPAM配列に相補的なそれらの標的部位を認識して結合する。標的部位へ結合する際、融合タンパク質の連結されたヌクレアーゼドメインは、二量体として機能して、標的部位内に3'オーバーハング二重ストランド破壊を産生することで、破壊を包囲する配列と外来性核酸配列との間の相同組換え修復を誘導し、それによって、外来性核酸配列を、細胞のゲノム遺伝子座の標的部位へとコピー、組み込み、および/または挿入する。dCas9をコードするヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、当技術分野で公知であり、かつ、例えば、GenBank受託番号KR011748.1に位置づけられることができる。dCas9はまた、Zetsche et al, Nature Biotechnology 33,139-142(2015)に記載されている。

10

【0327】

dCas9ヌクレアーゼ融合タンパク質は、二量体化の際にDNAに3'オーバーハング二重ストランド破壊を産生することが可能である、あらゆるヌクレアーゼドメインを含むことができる。ヌクレアーゼドメインは、例えば、Acul、Alol、Bpml、Bael、またはMmelヌクレアーゼドメインを包含するが、これらに限定されない、IIS型制限酵素ヌクレアーゼドメインであることができる。dCas9ヌクレアーゼ融合タンパク質の二量体化依存性ヌクレアーゼドメインおよびdCas9ドメインは、任意のアミノ酸リンカーによって一緒に接合される。アミノ酸リンカーは、少なくとも1つのアミノ酸のあらゆる配列、および10アミノ酸までの最大の配列を含むことができる。特定の態様では、アミノ酸リンカーは、例えば、グリシン、グリシン、グリシン、グリシン、およびセリン(GGGGS(配列番号51))または非標準アミノ酸、トレオニン、グルタミン酸、およびアスパラギン(XTEN)を含むことができる。

20

30

【0328】

本明細書に記載される方法および組成物のいずれにおいて、ドナーとして作用する外来性ヌクレオチド配列は、標的部位のゲノム配列と相同であるがしかし同一ではない配列を含有することができ、それによって、相同組換え修復を刺激して、標的部位内に非同ー配列をコピー、組み込み、および/または挿入することができる。よって、ある特定の態様において、目的の領域における配列に相同であるドナー配列の部分は、置き換えられるゲノム配列に対して約80~99%(または、それらの間のあらゆる整数)の配列同一性を呈する。他の態様において、ドナー配列とゲノム配列との間の相同性は、例えば、100を超える連続する塩基対のドナー配列とゲノム配列との間のように1ヌクレオチドのみが異なる場合、99%より高い。ある特定の場合一つにおいて、ドナー配列の非同ー部分は、新しい配列が目的の領域へと導入されるように、標的部位に存在しない配列を含有することができる。これらの実例において、非同ー配列は、概して、標的部位の配列と相同または同一である、50~1,000塩基対(もしくは、その間のあらゆる整数値)、または1,000を超える任意の数の塩基対の配列にフランクする(flanked)。

40

【0329】

いくつかの態様において、ドナーテンプレート配列全体またはドナーテンプレート配列の一部は、標的部位に統合される。本明細書に記載される方法のいずれも、目的の遺伝子(複数可)の発現を妨害するドナー配列の標的化統合による細胞における、1以上のゲノム遺伝子座の部分的または完全な不活性化のために使用されることができる。本明細書に記

50

載される方法のいずれかは、標的部位内の突然変異配列を置き換え、それによって、突然変異遺伝子を補正するか、または以前は不活性であった遺伝子発現を誘導するために使用されることができる。組み込まれる外来性核酸配列の性質は、達成されるべき治療目標に依存し、遺伝子転写を誘導または阻害すること、欠陥遺伝子の突然変異配列を置き換えること、または遺伝子内の配列を追加もしくは欠失することにまでの範囲に及ぶことができる。

【0330】

他の態様において、DBD(一例として、ジンクフィンガーまたはdCas9)ヌクレアーゼ融合タンパク質は、非相同末端接合またはマイクロホモロジー媒介末端接合を介して、細胞のゲノム遺伝子座のヌクレアーゼ標的部位と、部分的または完全に重複する可変長挿入または欠失突然変異を導入する。これらの態様において、外来性ドナー配列は提供されない。むしろ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質または単離されたジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質をコードする核酸配列が細胞の核に提供され、ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合タンパク質は、ヌクレアーゼ標的部位へ結合して、ヌクレアーゼ標的部位内に3'オーバーハング二重ストランド破壊を産生し、その後、非相同末端接合またはマイクロホモロジー媒介末端接合による破壊の修復が続く。非相同末端接合またはマイクロホモロジー媒介末端接合の両方が、ヌクレアーゼ標的部位での遺伝子転写を妨害または阻害する、挿入または欠失を生じることができる。

【0331】

標的化可能な3'オーバーハングヌクレアーゼ(一例として、IIS型制限酵素、一例として、DBDヌクレアーゼ融合タンパク質)、ヌクレアーゼをコードする配列、組成物、使用方法、およびシステムの非限定的な例は、国際公開第2020160481号に記載されているものを包含し、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0332】

塩基編集

いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、核酸塩基エディタ(また、「塩基エディタ」とも称される)、または核酸塩基編集(また、「塩基編集」とも称される)複合体の1以上の構成要素を含む。

【0333】

「塩基エディタ(BE)」または「核酸塩基エディタ(NBE)」という用語は、本明細書において使用される場合、核酸配列(一例として、DNAまたはRNA)内の塩基(一例として、A、T、C、G、またはU)へ修飾を行うことが可能であるポリペプチドを含む、薬剤を指すことができる。いくつかの態様において、塩基エディタは、核酸内の塩基を脱アミノ化することが可能である。いくつかの態様において、塩基エディタは、DNA分子内の塩基を脱アミノ化することが可能である。いくつかの態様において、塩基エディタは、DNA中のアデノシン(A)を脱アミノ化することが可能である。いくつかの態様において、塩基エディタは、DNA中のシトシン(C)を脱アミノ化することが可能である。

【0334】

いくつかの場合において、本明細書に開示される塩基エディタは、脱アミノ化反応を触媒する、デアミナーゼまたはその機能ドメイン(「デアミナーゼドメイン」)を含む。

【0335】

「デアミナーゼ」または「デアミナーゼドメイン」という用語は、本明細書において使用される場合、脱アミノ化反応を触媒するタンパク質または酵素を指す。いくつかの態様において、デアミナーゼドメインまたはデアミナーゼドメインは、アデノシンの脱アミノ化を触媒し、それをヌクレオシドヒポキサンチンへ変換する、アデノシンデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼドメインまたはデアミナーゼドメインは、それぞれ、ウリジンまたはデオキシウリジンへのシチジンまたはデオキシシチジン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、デアミナーゼまたはデアミナーゼドメインは、シトシンからウラシル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ドメインである。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、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、デアミナーゼまたはデアミナーゼドメインは、天然には存在しない生物からの、天然に存在するデアミナーゼのバリエーションである。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と、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。

【0336】

本明細書において使用される場合、「アデノシンデアミナーゼ」は、アデノシンの脱アミノ化を触媒し、それをヌクレオシドヒポキサンチンへ変換する酵素である。標準的なワトソン・クリック水素結合対合(hydrogen bond pairing)の下において、アデノシン塩基水素は、チミン塩基(またはRNAの場合はウラシル)へ結合する。アデニンがヒポキサンチンへ変換される場合、ヒポキサンチンは、シトシンと水素結合対合を行われる。よって、アデノシンデアミナーゼによる「A」のヒポキサンチンへの変換は、細胞修復および/または複製プロセス中に、「T」の代わりに「C」の挿入を引き起こす。シトシン「C」はグアニン「G」と対合するので、DNA複製と協調したアデノシンデアミナーゼは、二重ストランドDNA分子において、A・T対合からC・G対合への変換を引き起こす。

【0337】

いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)ドメインへ融合された核酸プログラマブルR/DNA結合タンパク質(napR/DNAbp)を含む、融合タンパク質である。「核酸プログラマブルD/RNA結合タンパク質(napR/DNAbp)」という用語は、タンパク質に関連する1つ以上の核酸分子(または、その一部もしくは領域)に相補的である特定の標的ヌクレオチド配列(一例として、ゲノムの遺伝子座、またはRNA分子)へ局在するように、タンパク質を配向または別様にプログラムし、それによって、タンパク質を特定の標的部位のヌクレオチド配列へ結合させる、1以上の核酸分子(すなわち、広く「napR/DNAbpプログラミング核酸分子」と称されることがあり、例えば、Casシステムの場合はガイドRNAを包含する)と関連(一例として、複合体を形成)してもよい、あらゆるタンパク質を指す。この用語napR/DNAbpは、天然に存在するまたは天然に存在しないにかかわらず(一例として、操作されたまたは組換えの)、CRISPR Cas9タンパク質、ならびにCas9等価物、ホモログ、オルソログ、またはパラログを包括し、かつ、Cpf1(V型CRISPR-Casシステム)、C2c1(V型CRISPR-Casシステム)、C2c2(VI型CRISPR-Casシステム)、およびC2c3(V型CRISPR-Casシステム)を包含する、あらゆるタイプのCRISPRシステム(一例として、II型、V型、VI型)からのCas9等価物を包含してもよい。更なるCas等価物は、Makarova et al., "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector," Science 2016;353(6299)(この内容は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。しかしながら、本発明に関連して使用されてもよい核酸プログラマブルR/DNA結合タンパク質(napR/DNAbp)は、CRISPR-Casシステムに限定されない。本発明は、DNAガイドゲノム編集にもまた使用されてもよいNatronobacterium gregoryi(NgAgo)からのアルゴノートタンパク質などの、あらゆるそのようなプログラマブルタンパク質を包括する。NgAgo-ガイドDNAシステムは、PAM配列またはガイドRNA分子を必要とせず、これは、ゲノム編集が、総称的なNgAgoタンパク質の発現およびあらゆるゲノム配列上への合成オリゴヌクレオチドの導入によって単純に実施されることができることを意味する。Gao F, Shen X Z, Jiang F, Wu Y, Han C. DNA-guided genome editing using the Natronobacterium gregoryi Argonaute. Nat Biotechnol 2016;34(7):768-73を参照されたく;これは、参照により本明細書に組み込まれる。

【0338】

10

20

30

40

50

いくつかの場合において、napR/DNAbpは、Cas9(一例として、dCas9およびnCAs9)、CasX、CasY、Cas14、Cpf1、C2cl、C2c2、C2c3、アルゴノートタンパク質、またはそのバリエーションなどの、本明細書に開示されるヌクレアーゼに由来する。いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)へ融合されたCas9(一例として、dCas9およびnCAs9)、CasX、CasY、Cpf1、C2cl、C2c2、C2c3、またはアルゴノートタンパク質を含む。いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)へ融合されたCas9ニッカーゼ(nCas9)を含む。いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)へ融合されたCasXタンパク質を含む。いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)へ融合されたヌクレアーゼ不活性Cas9(dCas9)を含む。いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)へ融合されたCasYタンパク質を含む。いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)へ融合されたCas14タンパク質を含む。いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)へ融合されたCpf1タンパク質を含む。いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)へ融合されたC2clタンパク質を含む。いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)へ融合されたC2c2タンパク質を含む。いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)へ融合されたC2c3タンパク質を含む。いくつかの態様において、塩基エディタは、デアミナーゼ(一例として、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼ)へ融合されたアルゴノートタンパク質を含む。

10

20

30

40

【0339】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるアデノシンデアミナーゼは、アデノシンを脱アミノ化することが可能である。いくつかの態様において、本明細書において提供されるアデノシンデアミナーゼは、DNAのデオキシアデノシン残基中のアデノシンを脱アミノ化することが可能である。アデノシンデアミナーゼは、あらゆる好適な生物(一例として、*E. coli*)に由来してもよい。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、本明細書において提供される突然変異のいずれか(一例として、ecTadAの突然変異)に対応する1以上の突然変異を包含する、天然に存在するアデノシンデアミナーゼである。当業者は、当該技術分野において周知である方法によって(一例として、配列のアラインメントおよび相同の残基の決定によって)、いずれの相同のタンパク質およびそれぞれのコード核酸における対応する残基を同定することができるであろう。したがって、当業者は、本明細書に記載される突然変異のいずれか、一例として、ecTadAで同定された突然変異のいずれかに対応する、あらゆる天然に存在するアデノシンデアミナーゼ(一例として、ecTadAと相同性を有する)に突然変異を産生することができるであろう。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、原核生物からのものである。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、細菌からのものである。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、*Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Salmonella typhi*、*Shewanella putrefaciens*、*Haemophilus influenzae*、*Caulobacter crescentus*、または*Bacillus subtilis*からのものである。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、*E. coli*からのものである。

【0340】

いくつかの場合において、本明細書に開示される塩基エディタのデアミナーゼドメインは、シチジンデアミナーゼに由来する。いくつかの場合において、シチジンデアミナーゼドメインは、APOBEC1デアミナーゼ、APOBEC2デアミナーゼ、APOBEC3Aデアミナ

50

ーゼ、APOBEC3Bデアミナーゼ、APOBEC3Cデアミナーゼ、APOBEC3Dデアミナーゼ、APOBEC3Fデアミナーゼ、APOBEC3Gデアミナーゼ、またはAPOBEC3Hデアミナーゼなどの、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に由来する。

【0341】

いくつかの態様において、塩基エディタは、塩基切除修復の阻害剤、例えば、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤(UGI)ドメインへ融合され、または融合タンパク質の一部として、塩基切除修復の阻害剤をさらに含む。

【0342】

いくつかの場合において、本明細書に開示される塩基エディタは、NH₂-[デアミナーゼドメイン]-[napR/DNAbp]-[UGIドメイン]-COOH;NH₂-[デアミナーゼドメイン]-[napR/DNAbp]-[UGI]-[UGI]-COOH;NH₂-[デアミナーゼドメイン]-[napR/DNAbp]-[UGI]-COOH;NH₂-[UGI]-[デアミナーゼドメイン]-[napR/DNAbp]-COOH;NH₂-[デアミナーゼドメイン]-[UGI]-[napR/DNAbp]-COOH;NH₂-[napR/DNAbp]-[UGI]-[デアミナーゼドメイン]-COOH;または、NH₂-[napR/DNAbp]-[デアミナーゼドメイン]-[UGI]-COOHなどの構造を含む、融合タンパク質であり;ここで、「-」の各実例は、任意のリンカーを含む。

【0343】

いくつかの場合において、塩基エディタは、ウラシル結合タンパク質(UBP)へ融合されるか、または融合タンパク質の一部として、ウラシル結合タンパク質をさらに含む。「ウラシル結合タンパク質」または「UBP」という用語は、本明細書において使用される場合、ウラシルへ結合することが可能であるタンパク質を指す。いくつかの態様において、ウラシル結合タンパク質は、ウラシル修飾酵素である。いくつかの態様において、ウラシル結合タンパク質は、ウラシル塩基切除酵素である。いくつかの態様において、ウラシル結合タンパク質は、ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)である。いくつかの態様において、ウラシル結合タンパク質は、野生型UDG(一例として、ヒトUDG)がウラシルへ結合する親和性の、少なくとも1%、2%、3%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または少なくとも95%である親和性で、ウラシルに結合する。「塩基切除酵素」または「BEE」という用語は、本明細書において使用される場合、核酸分子(一例として、DNAまたはRNA)から塩基(一例として、A、T、C、G、またはU)を除去することが可能であるタンパク質を指す。いくつかの態様において、BEEは、DNAからシトシンを除去することが可能である。いくつかの態様において、BEEは、DNAからチミンを除去することが可能である。例示的なBEEは、Sang et al., "A Unique Uracil-DNA binding protein of the uracil DNA glycosylase superfamily," *Nucleic Acids Research*, Vol.43, No.17 2015(その全内容が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているUDG Tyr147AlaおよびUDG Asn204Aspを包含するが、これらに限定されない。

【0344】

いくつかの態様において、UBPは、ウラシル修飾酵素である。いくつかの態様において、UBPは、ウラシル塩基切除酵素である。いくつかの態様において、UBPは、ウラシルDNAグリコシラーゼである。いくつかの態様において、UBPは、本明細書において提供されるウラシル結合タンパク質のいずれかである。例えば、UBPは、UDG、UdgX、UdgX*、UdgX_On、またはSMUG1であってもよい。いくつかの態様において、UBPは、ウラシル結合タンパク質、ウラシル塩基切除酵素またはウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG)酵素と、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0345】

いくつかの場合において、塩基エディタは、核酸ポリメラーゼドメイン(NAP)へ融合されるか、または融合タンパク質の一部として、核酸ポリメラーゼドメインを含む。実例としては、核酸ポリメラーゼドメインは、真核生物核酸ポリメラーゼドメインである。い

くつかの場合において、核酸ポリメラーゼドメインは、DNAポリメラーゼドメインである。いくつかの場合において、核酸ポリメラーゼドメインは、損傷乗り越えポリメラーゼ活性を有する。いくつかの場合において、核酸ポリメラーゼドメインは、損傷乗り越えDNAポリメラーゼである。いくつかの場合において、核酸ポリメラーゼドメインは、Rev 7、Rev1複合体、ポリメラーゼイオタ、ポリメラーゼカッパ、およびポリメラーゼエータにからのものである。いくつかの場合において、核酸ポリメラーゼドメインは、アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ、イプシロン、ガンマ、エータ、イオタ、カッパ、ラムダ、ミュー、およびニューからなる真核生物ポリメラーゼの群から選択される。

【0346】

いくつかの場合において、本明細書に開示される塩基エディタは、 NH_2 -[デアミナーゼドメイン]-[napR/DNAbpドメイン]-[UBP]-[NAP]-COOH; NH_2 -[デアミナーゼドメイン]-[napR/DNAbp]-[NAP]-[UBP]-COOH; NH_2 -[デアミナーゼドメイン]-[NAP]-[napR/DNAbp]-[UBP]-COOH;または、 NH_2 -[NAP]-[デアミナーゼドメイン]-[napR/DNAbp]-[UBP]-COOHなどの構造を含む融合タンパク質であり;ここで、「-」の各実例は、任意のリンカーを含む。

【0347】

いくつかの場合において、本明細書に開示される塩基エディタは、napR/DNAbpプログラミング核酸分子と複合体化される。いくつかの場合において、本明細書に開示される塩基編集システムは、塩基エディタおよびnapR/DNAbpプログラミング核酸分子、一例として、napR/DNAbpプログラミング核酸分子と複合体化した塩基エディタを含む。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルは塩基エディタと、napR/DNAbpプログラミング核酸分子、一例として、napR/DNAbpプログラミング核酸分子と複合体化した塩基エディタと、の両方を含む、塩基編集システムを送達する。いくつかの場合において、塩基エディタは、本明細書に開示される送達ビヒクルを通じて、または他の送達方法と一緒に、napR/DNAbpプログラミング核酸分子とは別個に細胞中へと送達される。

【0348】

「napR/DNAbpプログラミング核酸分子」または同等に「ガイド配列」という用語は、タンパク質に関連する1以上の核酸分子(または、その一部もしくは領域)に相補的である特定の標的ヌクレオチド配列(一例として、ゲノムの遺伝子座)へ局在するように、napR/DNAbpタンパク質と関連し、それを配向するか、または別様にプログラムし、それによって、napR/DNAbpタンパク質を特定の標的部位のヌクレオチド配列へ結合させる、1以上の核酸分子を指す。非限定的な例は、CRISPR-Casゲノム編集システムのCasタンパク質のガイドRNAである。

【0349】

本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されることができる、デアミナーゼドメイン、napR/DNAbpドメイン、UGIドメイン、および全塩基エディタタンパク質についての例示的な立体配置、配列、およびそれらの突然変異、ならびに塩基編集システム(一例として、塩基エディタとnapR/DNAbpプログラミング核酸分子の両方を含む)の例示的な立体配置は、米国特許出願公開第US20170121693号、同第US20180073012号、同第US20180312828号、同第US20210230577号、同第US20210198330号、同第US20210277379号、同第US2020399626号、同第US2021371858号、同第US2021380955号、同第US2021277379号、同第US2021301274号;国際公開第WO20051562号、同第WO21041885号、同第WO21050512号、および同第WO21113494号に記載されるものを包含し、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されることができる、デアミナーゼドメイン、napR/DNAbpドメイン、UGIドメインおよび全塩基エディタタンパク質についての例示的な立体配置、配列、およびそれらの突然変異はまた、Komor AC et al.Nature.2016 May 19;533(7603):420-4;Kim YB et al.Nat Biotechnol.2017 Apr;35(4):371-376;Rees HA et al.Nat Commun.2017 Jun 6;8:15790;Newby GA et al.Mol Ther.2021 Nov 3;29(11):3107-3124;Huan

10

20

30

40

50

g TP et al. Nat Protoc. 2021 Feb; 16(2):1089-1128; Lapinaite A et al. Science. 2020 Jul 31; 369(6503):566-571; Anzalone AV et al. Nat Biotechnol. 2020 Jul; 38(7):824-844; Rees HA et al. Nat Rev Genet. 2018 Dec; 19(12):770-788; Koblan LW et al. Nat Biotechnol. 2018 Oct; 36(9):843-846; および Gaudelli NM et al. Nature. 2017 Nov 23; 551(7681):464-471 を包含し、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0350】

プライム編集

いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、プライム編集システムの1以上の構成要素を含む。

【0351】

プライム編集は、生存生物のゲノムが修飾されてもよい、「検索および置換(search-and-replace)」ゲノム編集技術である。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルによって送達されるプライミング(priming)編集システムは、核酸プログラマブルRNAまたはDNA結合タンパク質(napR/DNAbp)、および核酸ポリメラーゼ(一例として、逆転写酵素またはRNA依存性RNAポリメラーゼ)を含む融合タンパク質、ならびにnapR/DNAbpプログラミング核酸分子を使用する。いくつかの場合において、融合タンパク質は、操作された逆転写酵素へ融合された、触媒的に損なわれたCas9エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの場合において、napR/DNAbpプログラミング核酸分子は、標的部位を同定することと、標的DNAヌクレオチドを置き換えるための新しい遺伝情報を提供することと、が可能である、プライム編集ガイドRNA(pegRNA)を含む。本明細書に開示されるプライム編集システムは、二重ストランド破壊(DSB)またはドナーDNAテンプレートを必要とせず、に、標的化された挿入、欠失、および/または塩基同士の(base-to-base)変換を媒介することができる。

【0352】

いくつかの場合において、プライム編集システム、一例として、プライム編集ガイドRNA(pegRNA)のためのnapR/DNAbpプログラミング核酸分子は、(i)編集される標的ヌクレオチド配列を同定することと、(ii)標的配列を置き換える新しい遺伝情報をコードすることと、が可能である。いくつかの場合において、pegRNAは、プライマー結合部位(PBS)、および核酸ポリメラーゼ(一例として、逆転写酵素またはRNAポリメラーゼ)のテンプレート配列を含有する、伸長された単一ガイドRNA(sgRNA)を含む。いくつかの場合において、ゲノム編集、プライマー結合部位は、ニックDNAストランド(nicked DNA strand)の3'末端がpegRNAへハイブリダイズされることを可能にし、一方で、逆転写酵素テンプレートは、編集された遺伝情報の合成のためのテンプレートとして働く。

【0353】

本開示の送達ビヒクルによって送達されることができ、プライム編集システムの1以上の構成要素は、国際公開第WO2020191242号、同第WO2020191234号、同第WO2020086908号、同第WO2021072328号、同第WO2021226558号、および同第WO2020191248号、ならびにAnzalone AV, et al. Nature. 2019 Dec; 576(7785):149-157; Anzalone AV, et al. Nat Biotechnol. 2021 Dec 9; Hsu JY, et al. Nat Commun. 2021 Feb 15; 12(1):1034; Nelson JW, et al. Nat Biotechnol. 2021 Oct 4; Chen PJ, et al. Cell. 2021 Oct 28; 184(22):5635-5652.e29; Scholefield J, et al. Gene Ther. 2021 Aug; 28(7-8):396-401; Newby GA, et al. Mol Ther. 2021 Nov 3; 29(11):3107-3124に記載されるものを包含し、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0354】

後成的編集

いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、後成的エディタ、または後成的編集複合体(一例として、後成的エディタと、1以上の特異的標的配列に結合および/または修飾するように後成的エディタをガイドする核酸分子と、を

含む)のうち、1つ以上の構成要素を含む。

【0355】

いくつかの場合において、本明細書に開示される後成的エディタまたは後成的編集複合体は、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、ジスミターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン化活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性もしくはグリコシラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMOyl化活性、脱SUMOyl化活性、リボシル化活性、デリボシル化(deribosylation)活性、ミリストイル化活性、リモデリング活性、プロテアーゼ活性、オキシドレダクターゼ活性、トランスフェラーゼ活性、ヒドロラーゼ活性、リアーゼ活性、イソメラーゼ活性、シンターゼ活性、シンセターゼ活性、または脱ミリストイル化活性などの、後成的活性を有する。いくつかの場合において、本明細書に開示される後成的エディタまたは後成的編集複合体は、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、デアミナーゼ、ホスホリラーゼ、デホスホリラーゼ、ヒストン修飾酵素、もしくはヌクレオチド修飾酵素などを有する、染色体修飾酵素、または染色体修飾酵素と同等の機能活性を有する機能ドメインを有する。いくつかの場合において、本明細書に開示される後成的エディタまたは後成的編集複合体は、ヒストン修飾酵素、またはヒストン修飾酵素と同等の機能活性を有する機能ドメインを有する。いくつかの場合において、本明細書に開示される後成的エディタまたは後成的編集複合体は、ヌクレオチド修飾酵素、またはヌクレオチド修飾酵素と同等の機能活性を有する機能ドメインを有する。

10

20

【0356】

いくつかの場合において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、標的遺伝子のDNA配列を変更することなく、標的遺伝子の発現をモジュレートする効果を提供する。例えば、いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、標的遺伝子の発現の抑制またはサイレンシングをもたらす。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、標的遺伝子の活性化または発現増加をもたらす。

【0357】

一側面において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、配列特異的ではなく、一例として、後成的エディタまたは後成的編集システムによって実現される後成的修飾は、1以上の標的配列に特異的ではない。別の側面において、本明細書に記載される後成的エディタまたは後成的編集システムは、配列特異的または対立遺伝子特異的である。例えば、後成的エディタは、後成的エディタのDNA結合ドメインによって認識されるDNA配列を特異的に標的としてもよい。いくつかの態様において、標的DNA配列は、標的遺伝子の1コピーに特異的である。いくつかの態様において、標的遺伝子配列は、標的遺伝子の1つの対立遺伝子に特異的である。したがって、後成的修飾およびその発現のモジュレーションは、標的遺伝子の1つのコピーまたは1つの対立遺伝子に特異的であってもよい。

30

【0358】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ヒストンメチルトランスフェラーゼドメインを含む。いくつかの態様において、ヒストンメチルトランスフェラーゼドメインは、DOT1LDメイン、SETドメイン、SUV39H1ドメイン、G9a/EHMT2タンパク質ドメイン、EZH1ドメイン、EZH2ドメイン、SETDB1ドメイン、またはこれらのいずれかの組合せである。

40

【0359】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、DNAメチルトランスフェラーゼドメインまたはヒストンメチルトランスフェラーゼドメインを含む。DNAメチルトランスフェラーゼドメインは、DNAヌクレオチド、例えば、A、T、G、またはCヌクレオチドのいずれかでメチル化を媒介してもよい。いくつかの態様において、メチル化ヌクレオチドは、N6-メチルアデノシン(m6A)である。いくつかの態様におい

50

て、メチル化ヌクレオチドは、5-メチルシトシン(5mC)である。いくつかの態様において、メチル化は、CG(またはCpG)ジヌクレオチド配列におけるものである。いくつかの態様において、メチル化は、CHGまたはCHH配列におけるものであり、ここで、Hは、A、T、またはCのうちいずれか1つである。

【0360】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、メチル基のシトシンへの転移を触媒し、それによって、抑制性調節タンパク質の動員を通じて標的遺伝子の発現を抑制する、DNAメチルトランスフェラーゼDNMTドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、DNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)ファミリータンパク質ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、DNMT1ドメイン、TRDMT1ドメイン、DNMT3ドメイン、DNMT3Aドメイン、DNMT3Bドメイン、DNMT3Cドメイン、DNMT3Lドメイン、TRDMT1(DNMT2)ドメイン、M.Mpelドメイン、M.SssIドメイン、M.HpaIIドメイン、M.AluIドメイン、M.HaeIIIドメイン、M.HhaIドメイン、M.MspIドメイン、Masc1ドメイン、MET1ドメイン、Masc2ドメイン、Dim-2ドメイン、dDnmt2ドメイン、Pmt1ドメイン、DRM1ドメイン、DRM2ドメイン、CMT1ドメイン、CMT2ドメイン、CMT3ドメイン、Ridドメイン、hsdM遺伝子ドメイン、hsdS遺伝子ドメイン、M.TaqIドメイン、M.EcoDamドメイン、M.CcrMIドメイン、CamADドメイン、またはこれらのいずれかの組合せ(一例として、これらのいずれかの組合せを含む融合タンパク質)を含む。

【0361】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、標的遺伝子の発現を抑制する1以上のタンパク質ドメインを動員する。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、標的遺伝子の発現を抑制する1以上のタンパク質ドメインを動員する、足場タンパク質ドメインと相互作用する。例えば、後成的エディタまたは後成的編集システムは、PRMTタンパク質、HDACタンパク質、SETDB1タンパク質、またはNuRDタンパク質ドメインを動員する、足場タンパク質ドメインを動員または相互作用してもよい。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、Kruppel関連ボックス(KRAB)抑制ドメイン;リプレッサー要素サイレンシング転写因子(REST)抑制ドメイン、KRAB関連タンパク質1(KAP1)ドメイン、MADドメイン、FKHR(横紋肉腫遺伝子におけるフォークヘッド)リプレッサードメイン、aEGR-1(初期成長応答遺伝子産物-1)リプレッサードメイン、ets2リプレッサー因子リプレッサードメイン(ERD)、MAD smsIN3相互作用ドメイン(SID)、毛関連塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス(hairy-related basic helix-loop-helix:bHLH)リプレッサータンパク質のWRPWモチーフ;HP1アルファクロモシャドウ抑制ドメイン、またはこれらのいずれかの組合せを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、KRABドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、28(TRIM28、TIF1-ベータ、またはKAP1)タンパク質を含有する、トリパータイトモチーフを含む。

【0362】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、標的遺伝子の発現を抑制するタンパク質ドメインを含む。例えば、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ジンクフィンガーリプレッサータンパク質に由来する機能ドメインを含んでもよい。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、KOX1/ZNF10ドメイン、KOX8/ZNF708ドメイン、ZNF43ドメイン、ZNF184ドメイン、ZNF91 KRABドメイン、HPF4ドメイン、HTF10ドメインもしくはHTF34ドメイン、またはこれらのいずれかの組合せに由来する、機能抑制ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ZIM3タンパク質ドメイン、ZNF436ドメイン、ZNF257ドメイン、ZNF675ドメイン、ZNF490ドメイン、ZNF320ドメイン、ZNF331ドメイン、ZNF816ドメイン、ZNF680ドメイン、ZNF41ドメイン、

ZNF189ドメイン、ZNF528ドメイン、ZNF543ドメイン、ZNF554ドメイン、ZNF140ドメイン、ZNF610ドメイン、ZNF264ドメイン、ZNF350ドメイン、ZNF8ドメイン、ZNF582ドメイン、ZNF30ドメイン、ZNF324ドメイン、ZNF98ドメイン、ZNF669ドメイン、ZNF677ドメイン、ZNF596ドメイン、ZNF214ドメイン、ZNF37Aドメイン、ZNF34ドメイン、ZNF250ドメイン、ZNF547ドメイン、ZNF273ドメイン、ZNF354Aドメイン、ZFP82ドメイン、ZNF224ドメイン、ZNF33Aドメイン、ZNF45ドメイン、ZNF175ドメイン、ZNF595ドメイン、ZNF184ドメイン、ZNF419ドメイン、ZFP28-1ドメイン、ZFP28-2ドメイン、ZNF18ドメイン、ZNF213ドメイン、ZNF394ドメイン、ZFP1ドメイン、ZFP14ドメイン、ZNF416ドメイン、ZNF557ドメイン、ZNF566ドメイン、ZNF729ドメイン、ZIM2ドメイン、ZNF254ドメイン、ZNF764ドメイン、ZNF785ドメイン、またはこれらのいずれかの組合せに由来する機能抑制ドメインを含む。いくつかの態様において、ドメインは、ZIM3ドメイン、ZNF554ドメイン、ZNF264ドメイン、ZNF324ドメイン、ZNF354Aドメイン、ZNF189ドメイン、ZNF543ドメイン、ZFP82ドメイン、ZNF669ドメイン、もしくはZNF582ドメイン、またはこれらのいずれかの組合せである。いくつかの態様において、ドメインは、ZIM3ドメイン、ZNF554ドメイン、ZNF264ドメイン、ZNF324ドメイン、またはZNF354Aドメイン、またはこれらのいずれかの組合せである。

10

【0363】

標的遺伝子発現を低減またはサイレンシングしてもよい後成的エディタまたは後成的編集システムの例示的な機能ドメインの配列が提供され、これらは、PCT/US2021/030643 and Tycko et al.(Tycko J,DelRosso N,Hess GT,Aradhana,Banerjee A,Mukund A, Van MV,Ego BK,Yao D,Spees K,Suzuki P,Marinov GK,Kundaje A,Bassik MC,Bintu L.High-Throughput Discovery and Characterization of Human Transcriptional Effectors.Cell.2020 Dec 23;183(7):2020-2035.e16.doi:10.1016/j.cell.2020.11.024.Epub 2020 Dec 15.PMID:33326746;PMCID:PMC8178797.)に見られることができ、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0364】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ZIM3、ZNF436、ZNF257、ZNF675、ZNF490、ZNF320、ZNF331、ZNF816、ZNF680、ZNF41、ZNF189、ZNF528、ZNF543、ZNF554、ZNF140、ZNF610、ZNF264、ZNF350、ZNF8、ZNF582、ZNF30、ZNF324、ZNF98、ZNF669、ZNF677、ZNF596、ZNF214、ZNF37A、ZNF34、ZNF250、ZNF547、ZNF273、ZNF354A、ZFP82、ZNF224、ZNF33A、ZNF45、ZNF175、ZNF595、ZNF184、ZNF419、ZFP28-1、ZFP28-2、ZNF18、ZNF213、ZNF394、ZFP1、ZFP14、ZNF416、ZNF557、ZNF566、ZNF729、ZIM2、ZNF254、ZNF764、ZNF785、ZNF10(KO X1)、CBX5(クロモシャドウドメイン)、RYBP(PRC1のYAF2_RYBP構成要素)、YAF2(PRC1のYAF2_RYBP構成要素)、MGA(PRC1.6の構成要素)、CBX1(クロモシャドウ)、SCMH1(SAM_1/SPM)、MPP8(クロモドメイン)、SUMO3(Rad60-SLD)、HERC2(Cyt-b5)、BIN1(SH3_9)、PCGF2(RINGフィンガータンパク質ドメイン)、TOX(HMGボックス)、FOXA1(HNF3A C末端ドメイン)、FOXA2(HNF3B C末端ドメイン)、IRF2BP1(IRF-2BP1_2 N末端ドメイン)、IRF2BP2(IRF-2BP1_2 N末端ドメイン)、IRF2BPL IRF-2BP1_2 N末端ドメイン、HOXA13(ホメオドメイン)、HOXB13(ホメオドメイン)、HOXC13(ホメオドメイン)、HOXA11(ホメオドメイン)、HOXC11(ホメオドメイン)、HOXC10(ホメオドメイン)、HOXA10(ホメオドメイン)、HOXB9(ホメオドメイン)、HOXA9(ホメオドメイン)、またはこれらのいずれかの組合せから由来する機能抑制ドメインを含む。

30

40

【0365】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ヒストンデアセチラーゼタンパク質ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは

50

後成的編集システムは、HDACファミリータンパク質ドメイン、例えば、HDAC1、HDAC3、HDAC5、HDAC7、またはHDAC9タンパク質ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ヒストンからアセチル基を除去する。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ヌクレオソームリモデリングドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ヒストンからアセチル基を除去する、ヌクレオソームリモデリングおよびデアセチラーゼ複合体(NURD)を含む。

【0366】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、28(TRIM28、TIF1-ベータ、またはKAP1)タンパク質を含有する、トリパーティットモチーフを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、1以上のKAP1タンパク質を含む。後成的エディタにおけるKAP1タンパク質は、後成的エディタの1以上の他のエフェクタードメイン、または細胞環境における遺伝子発現のモジュレーションに関与する1以上のタンパク質と複合体を形成してもよい。例えば、KAP1は、転写リプレッサーのKRABドメインによって動員されてもよい。いくつかの態様において、KAP1は、ヒストンデアセチラーゼタンパク質、ヒストン-リジンメチルトランスフェラーゼタンパク質(一例として、ヒストンH3尾部[H3K9]のリジン9[K9]へのメチル基の沈着)、クロマチンリモデリングタンパク質、および/またはヘテロクロマチンタンパク質と、相互作用するか、またはこれらを動員する。いくつかの態様において、KAP1タンパク質は、遺伝子発現を低減またはサイレンシングする1以上のタンパク質複合体と、相互作用するか、またはこれを動員する。いくつかの態様において、KAP1タンパク質は、ヘテロクロマチンタンパク質1(HP1)タンパク質(一例として、HP1タンパク質のクロモシャドウドメインを介して)、SETDB1タンパク質、HDACタンパク質、および/またはNuRDタンパク質複合体構成要素と相互作用するか、またはこれらを動員する。いくつかの態様において、KAP1タンパク質は、ヌクレオソームリモデリングおよび脱アセチル化(NuRD)複合体のCHD3サブユニットを動員し、それによって、標的遺伝子の発現を減少またはサイレンシングする。いくつかの態様において、KAP1タンパク質は、SETDB1タンパク質(一例として、標的遺伝子のプロモータ領域に対して)を動員し、それによって、例えば、標的遺伝子のプロモータ領域に関連するH3K9メチル化を介して標的遺伝子の発現を減少またはサイレンシングする。いくつかの態様において、SETDB1タンパク質の動員は、標的遺伝子を保持する染色体領域の異質染色質化をもたらし、それによって、標的遺伝子の発現を低減またはサイレンシングする。いくつかの態様において、KAP1タンパク質は、HP1タンパク質と相互作用するか、またはHP1タンパク質を動員し、それによって、標的遺伝子に関連するヒストン尾部上のH3K9またはH3K14のアセチル化の減少を介して、標的遺伝子の発現を低減またはサイレンシングする。SETDB1の動員は異質染色質化を誘導する。いくつかの態様において、KAP1タンパク質は、ZFP90タンパク質(一例として、ZFP90のアイソフォーム2)および/またはFOXP3タンパク質と相互作用するか、またはこれらを動員する。

【0367】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、1以上のDNA後成的マークと相互作用する、または1以上のDNA後成的マークによって動員される、タンパク質ドメインを含む。例えば、後成的エディタまたは後成的編集システムは、標的遺伝子内のメチル化DNAヌクレオチドと相互作用する、メチルCpG結合タンパク質2(MECP2)タンパク質を含んでもよい。いくつかの態様において、MECP2タンパク質は、標的遺伝子のCpGアイランド内のメチル化DNAヌクレオチドと相互作用する。いくつかの態様において、MECP2タンパク質は、標的遺伝子のCpGアイランドにないメチル化DNAヌクレオチドと相互作用する。いくつかの態様において、後成的エディタにおけるMECP2タンパク質は、凝縮した(condensed)クロマチン構造をもたらし、それによって、標的遺伝子の発現を低減またはサイレンシングする。いくつかの態様において、後成的エディタ中のMECP2タンパク質は、ヒストンデアセチラーゼ(一例として、HDAC)と相互作用

し、それによって、標的遺伝子の発現を抑制またはサイレンシングする。いくつかの態様において、後成的エディタ中のMECP2タンパク質は、標的遺伝子への転写因子または転写アクチベータのアクセスをブロックし、それによって、標的遺伝子の発現を抑制またはサイレンシングする。

【0368】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、クロモシャドウドメイン、ユビキチン-2様Rad60 SUMO様(Rad60-SLD/SUMO)ドメイン、クロマチン構成修飾因子ドメイン(クロモ)ドメイン、Yaf2/RYP C末端結合モチーフドメイン(YAF2_RYP)、CBXファミリーC末端モチーフドメイン(CBX7_C)、ジンクフィンガーC3HC4型(RINGフィンガー)ドメイン(zf-C3HC4_2)、シトクロムb5ドメイン(Cyt-b5)、ヘリックス・ループ・ヘリックスドメイン(HLH)、高移動度群ボックスドメイン(HMG-box)、滅菌アルファモチーフドメイン(SAM_1)、塩基性ロイシンジッパードメイン(bZIP_1)、Myb_DNA結合ドメイン、ホメオドメイン、FCS配列ドメイン(zf-FCS)を伴うMYM型ジンクフィンガー、インターフェロン調節因子2結合タンパク質ジンクフィンガードメイン(IRF-2BP1_2)、SSX抑制領域(SSXR)、Bボックス型ジンクフィンガードメイン(zf-B_box)、滅菌アルファモチーフドメイン(SAM_2)、CXXCジンクフィンガードメイン(zf-CXXC)、染色体凝縮の調節因子1ドメイン(RCC1)、SRC相同性3ドメイン(SH3_9)、滅菌アルファモチーフ/ポイントドメイン(SAM_PNT)、痕跡(Vestigial)/Tondueファミリードメイン(Vg_Tdu)、LIMドメイン、RNA認識モチーフドメイン(RRM_1)、塩基性ロイシンジッパードメイン(bZIP_2)、対合両親媒性ヘリックスドメイン(PAH)、プロテアソームATPase OB C末端ドメイン(Prot_ATP_ID_OB)、nervy相同性2ドメイン(NHR2)、ヘリックス-ヘアピン-ヘリックスモチーフドメイン(HHH_3)、切断刺激因子サブユニットのヒンジドメイン2(CSTF2_ヒンジ)、PPARガンマN末端領域ドメイン(PPARガンマ_N)、CDC48 N末端ドメイン(CDC48_2)、WD40リピートドメイン(WD40)、Fip1モチーフドメイン(Fip1)、PDZドメイン(PDZ_6)、フォン・ヴィルブランド因子C型ドメイン(VWC)、NAB変換領域1ドメイン(NCD1)、S1 RNA結合ドメイン(S1)、HNF3 C末端ドメイン(HNF_C)、Tudorドメイン(Tudor_2)、ヒストン様転写因子(CBF/NF-Y)および古細菌ヒストンドメイン(CBFD_NFYB_HMF)、ジンクフィンガータンパク質ドメイン(DUF3669)、EGF様ドメイン(cEGF)、GATAジンクフィンガードメイン(GATA)、TEA/ATTSドメイン(TEA)、ホルボールエステル/ジアシルグリセロール結合ドメイン(C1-1)、ポリコーン様MTF2因子2ドメイン(Mtf2_C)、FOXOタンパク質ファミリーのトランス活性化ドメイン(FOXO-TAD)、ホメオボックスKNドメイン(Homeobox_KN)、BEDジンクフィンガードメイン(zf-BED)、C3HC4型RINGドメインのジンクフィンガー(zf-C3HC4_4)、RAD51相互作用モチーフドメイン(RAD51_相互作用)、メチル-CpG-結合ドメインタンパク質MBDのp55結合領域(MBDa)、Notchドメイン、Raf様Ras結合ドメイン(RBD)、Spin/Sstyファミリードメイン(Spin-Ssty)、PHDフィンガードメイン(PHD_3)、低密度リポタンパク質受容体ドメインクラスA(Ldl_受容_a)、CSドメイン、DM DNA結合ドメイン、またはQLQドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、YAF2_RYPドメイン、またはホメオドメイン、またはこれらのいずれかの組合せを含む、タンパク質ドメインを含む。いくつかの態様において、YAF2_RYPドメインのホメオドメインは、PRDドメイン、NKLドメイン、HOXLドメイン、またはLIMドメインである。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、SUMO3ドメイン、M期リンタンパク質8(MPP8)からのクロモドメイン、クロモボックス1(CBX1)からのクロモシャドウドメイン、およびScmポリコーン群タンパク質ホモログ1(SCMH1)からのSAM_1/SPMドメインからなる群から選択されるタンパク質ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、HNF3 C末端ドメイン(HNF_C)を含む。いくつかの態様において、HNF_Cドメインは、FOXA1またはFOXA2に由来する。いくつかの態様において、HNF_Cドメインは、EH1(エングレイルド(engrailed)相同性1)モチーフを含む。いくつかの態様において、後成的エディタま

10

20

30

40

50

たは後成的編集システムは、インターフェロン調節因子2結合タンパク質ジンクフィンガードメイン(IRF-2BP1_2)を含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、DNA修復因子HERC2 E3リガーゼからのCyt-b5ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、架橋インテグレート1(BIN1)からのバリエーションSH3ドメイン(SH3_9)を含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、転写因子TOXからのHMG-boxドメイン、またはポリコム構成要素PCGF2からのzf-C3HC4_2 RINGフィンガードメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、クロモドメイン-ヘリカーゼ-DNA-結合タンパク質(Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3:CHD3)を含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ZNF783ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、YAF2_RYBPドメインを含む。いくつかの態様において、YAF2_RYBPドメインは、32アミノ酸Yaf2/RYP C末端結合モチーフドメイン(32 AA RYP)を含む。

10

20

30

40

50

【0369】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、標的遺伝子の発現を活性化する標的遺伝子で後成的修飾を行う。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、標的配列を保持する標的遺伝子にて、DNAまたはDNAと関連するヒストン残基の化学修飾を修飾し、それによって、標的遺伝子の発現を活性化または増加させる。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、DNAデメチラーゼ、DNAジオキシゲナーゼ、DNAヒドロキシラーゼ、またはヒストンデメチラーゼドメインを含む。

【0370】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、DNAヌクレオチドからメチル基を除去し、それによって、標的遺伝子の発現を増加または活性化する、DNAデメチラーゼドメインを含む。例えば、後成的エディタまたは後成的編集システムは、メチル化形態のシトシンを脱メチル化し、それによって、標的遺伝子、例を挙げるならTET1、TET2、もしくはTET3タンパク質ドメインなど、またはこれらのいずれかの組合せの発現を増加させる、TET(10-11転位置メチルシトシンジオキシゲナーゼ(ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase))ファミリータンパク質ドメインを含むことができる。

【0371】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、DNA関連ヒストン中のリジンを脱メチル化し、それによって、標的遺伝子の発現を増加させる、KDMファミリータンパク質ドメインを含む。

【0372】

いくつかの場合において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、TET1、TET2、TET3、TDG、ROS1、DME、DML2、DML3、またはこれらのいずれかの組合せに由来した機能ドメインを含む。

【0373】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、1以上の転写アクチベータドメインを動員するタンパク質ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、1以上の転写因子を動員するタンパク質ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、転写アクチベータまたは転写因子ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、単純ヘルペスウイルスタンパク質16(VP16)活性化ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、複数のVP16活性化ドメインのタンデムリピートを含む、活性化ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、NFκBのp65活性化ドメイン;エプスタイン・バーウイルスRトランスアクチベータ(Rta)活性化ドメインを

含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、複数のアクチベータの融合物、一例として、VP64、p65、およびRta活性化ドメインのトリパートタイトアクチベータ(VPR活性化ドメイン)を含む。

【0374】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、FOXOタンパク質ファミリー(FOXO-TAD)、LMSTENモチーフドメイン(LMSTEN)、調節CREB活性C末端ドメインの形質導入(TORC_C)、QLQドメイン、核受容体コアクチベータドメイン(Nuc_rec_co-act)、オートファジー受容体ジンクフィンガーC2H2ドメイン(Zn-C2H2-12)、後期促進複合体サブユニット16(ANAPC16)、Dpy-30ドメイン、ANC1相同性ドメイン(AHD)、転写2 C末端のシグナル伝達形質導入因子およびアクチベータ(STA T2_C)、I-カップ-キナーゼ-ベータNEMO結合ドメイン(IKKbetaNEMObind)、早期成長応答N末端ドメイン(DUF3446)、TFIIEベータサブユニットコアドメイン(TFIIE_beta)、DPF2/REQのN末端ドメイン(レクイエム_N)、LNRドメイン(Notch)、非典型アームリピート(Arm_3)、タンパク質キナーゼC末端ドメイン(PKinase_C)、WWドメイン、SH3ドメイン(SH3_1)、Myb様DNA結合ドメイン、WDドメインGベータリピート(WD40)、PHDフィンガー(PHD)、RNA認識モチーフドメイン(RRM_1)、GATAジンクフィンガードメイン(GATA)、Vps4 C末端オリゴマー形成ドメイン(Vps4_C)、またはこれらのいずれかの組合せを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、標的遺伝子の発現を活性化するKRABドメインを含む。例えば、KRABドメインは、ZNF473 KRABドメイン、ZFP28 KRABドメイン、ZNF496 KRABドメイン、またはZNF597 KRABドメイン、またはこれらのいずれかの組合せであってもよい。

【0375】

標的遺伝子発現を活性化または増加させることができる例示的なドメインは、VP16、VP64、VP160、HIF1アルファ、CITED2、Stat3、p65、p53、ZNF473、FOXO1、Myb、CRTC1、Med9、EGR3、SMARCA2、Dpy-30、NCOA3、ZFP28、ZNF496、ZNF597、HSF1、RTA、またはこれらのいずれかの組合せを包含することができるが、これらに限定されない。標的遺伝子発現を活性化または増加させることができる他の例示的なドメインは、ABL1、AF9、ANM2、APBB1、APC16、BTK、CACO1、CRT C2、CRTC3、CXXC1、DPF1、DPY30、EGR3、ENL、FIGN、FOXO1、FOXO3、I KKA、IMA5、ITCH、KIBRA、KPCI、KS6B2、MTA3、MYB、MYBA、NCOA2、N COA3、NOTC1、NOTC1、NOTC2、PRP19、PYGO1、PYGO2、SAV1、SMCA2、SMRC2、STAT2、T2EB、U2AF4、WBP4、WWP1、WWP2、WWTR1、ZFP28、ZN473、ZN496

ZN597、またはこれらのいずれかの組合せを包含することができるが、これらに限定されない。

【0376】

いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、標的遺伝子に関連するヒストンのアセチル化を調節する。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ヒストンアセチルトランスフェラーゼドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ヒストンアセチルトランスフェラーゼドメインと相互作用して、ヒストンアセチル化をもたらす、タンパク質ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ1(HAT1)ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、ヒトE1A関連タンパク質p300のヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)コアドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、CBP/p300ヒストンアセチルトランスフェラーゼまたはその触媒ドメインを含む。いくつかの態様において、後成的エディタまたは後成的編集システムは、CREBBP、GCN4、GCN5、SAGA、SALSA、HAP2、H AP3、HAP4、PCAF、KMT2A、またはこれらのいずれかの組合せを含む。

【0377】

いくつかの場合において、本明細書に開示される後成的エディタは、標的ポリヌクレオチドに結合し、かつ後成的モジュレーション活性を有するあらゆる薬剤であることができ、または本明細書に開示される後成的編集システムは、標的ポリヌクレオチドに結合し、かつ後成的モジュレーション活性を有するあらゆる薬剤を含むことができる。

【0378】

いくつかの態様において、本明細書に開示される後成的エディタは、DNA結合ドメインを用いて特定の標的配列でポリヌクレオチドに結合する。いくつかの場合において、本明細書に開示される後成的編集システムは、後成的エディタのDNA結合をガイドする核酸を含む。いくつかの態様において、後成的エディタは、標的ポリヌクレオチドで、または標的ポリヌクレオチドに隣接する、核酸配列の後成的状態をモジュレートすることが可能であるエフェクタードメインを含む。

10

【0379】

転写因子

いくつかの態様において、本開示の送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、転写因子を含む。転写因子は、本明細書に記載されるDNA結合ドメインへ融合されることができる。

【0380】

転写因子の非限定的な例は、転写アクチベータまたは転写リプレッサードメイン(一例として、Kruppel関連ボックス(KRABまたはSKD);Mad mSIN3相互作用ドメイン(SID);ERFリプレッサードメイン(ERD)、等);ジンクフィンガーベースの人工転写因子(一例として、Sera(2009)Adv. Drug Deliv. 61:513を参照);TALEベースの人工転写因子(一例として、Liu et al.(2013)Nat. Rev. Genetics 14:781を参照);CRISPR/Casベースの人工転写因子(一例として、Pandelakis M, et al. Cell Syst. 2020 Jan 22; 10(1):1-14; Martinez-Escobar, et al. Frontiers in oncology vol. 10 604948.3 Feb. 2021を参照)、および同様のものを包含することができる。

20

【0381】

いくつかの場合において、転写因子は、VP64ポリペプチド(転写活性化)を含む。いくつかの場合において、転写因子は、Kriippel関連ボックス(KRAB)ポリペプチド(転写抑制)を含む。いくつかの場合において、転写因子は、Mad mSIN3相互作用ドメイン(SID)ポリペプチド(転写抑制)を含む。いくつかの場合において、転写因子は、ERFリプレッサードメイン(ERD)ポリペプチド(転写抑制)を含む。例えば、いくつかの場合において、転写因子は転写アクチベータであり、転写アクチベータはGAL4-VP16である。

30

【0382】

抗体

いくつかの態様において、本開示の送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、抗体もしくはその機能的断片、または抗原結合ドメインを含む融合タンパク質を含む、またはコードする。

【0383】

いくつかの態様において、本明細書に開示される抗体もしくはその機能的断片、または本明細書に開示される抗原結合ドメインは、ウイルス感染、細菌感染、および/もしくは寄生虫感染などの疾患;炎症性および/もしくは自己免疫疾患;または、がんおよび/もしくは腫瘍など新生物に関連する抗原へ結合する。いくつかの態様において、本明細書に開示される抗体もしくはその機能的断片、または本明細書に開示される抗原結合ドメインは、腫瘍関連抗原(一例として、タンパク質またはポリペプチド)に結合する。いくつかの態様において、本明細書に開示される抗体もしくはその機能的断片、または本明細書に開示される抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはそれらの機能的誘導体、バリエーション、もしくは断片(Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv、scFv、ミニボディ、ダイアボディ、ならびにラクダ類由来ナノボディの重鎖可変ドメイン(VH)、軽鎖可変ドメイン(VL)、および可変ドメイン(VHH)

40

50

などの単ドメイン抗体を包含するが、これらに限定されない)である。

【0384】

いくつかの態様において、本明細書に開示される抗体もしくはその機能的断片、または本明細書に開示される抗原結合ドメインは、以下を含む、または以下に由来する、または以下からなる群から選択される抗体と等しく機能する:20-(74)-(74)(ミラツズマブ;ベルツズマブ)、20-2b-2b、3F8、74-(20)-(20)(ミラツズマブ;ベルツズマブ)、8H9、A33、AB-16B5、アバゴボマブ(abagovomab)、アブシキシマブ、アビツズマブ(abituzumab)、ABP 494(セツキシマブバイオシミラー)、アブリルマブ(abrilumab)、ABT-700、ABT-806、アクチマブ-A(Actimab-A)(アクチニウムAc-225リンツズマブ)、アクトクスマブ(actoxumab)、アダリムマブ、ADC-1013、ADCT-301、ADCT-402、アデカツムマブ(adecatumumab)、アデュカヌマブ、アフエリモマブ、AFM13、アフツズマブ、AGEN1884、AGS15E、AGS-16C3F、AGS67E、アラシズマブペゴール(alacizumab pegol)、ALD518、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブペンテト酸、アマツキシマブ、AMG 228、AMG 820、アナツモマブマフェナトックス(anatumomab mafenatox)、アネツマブラブタンシン(anetumab ravtansine)、アニフロルマブ、アンルキンズマブ(anrakinzumab)、APN301、APN311、アポリズマブ、APX003/SIM-BD0801(セバシズマブ(sevacizumab))、APX005M、アルシツモマブ、ARX788、アスクリンバクマブ(ascrinvacumab)、アセリズマブ(aselizumab)、ASG-15ME、アテゾリズマブ、アチヌマブ(atinumab)、ATL101、アトリズマブ(また、トシリズマブとも称される)、アトロリムマブ(atorolimumab)、アベルマブ、B-701、バピネオズマブ、バシリキシマブ、バビツキシマブ、BAY1129980、BAY1187982、ベクツモマブ(bectumomab)、ベゲロマブ(begelomab)、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ(bertilimumab)、ベシレソマブ、ベタルチン(Betalutin)(177Lu-テトラキセタン-テツロマブ)、ベバシズマブ、BEVZ92(ベバシズマブバイオシミラー)、ベズロトクスマブ(bezlotoxumab)、BGB-A317、BHQ880、BI 836880、BI-505、ビシロマブ(biciromab)、ビマグルマブ(bimagrumab)、ビメキズマブ(bimekizumab)、ビバツズマブ(bivatuzumab)メルタンシン、BIW-8962、ブリナツモマブ、ブロソズマブ(blosozumab)、BMS-936559、BMS-986012、BMS-986016、BMS-986148、BMS-986178、BNC101、ボコシズマブ(bococizumab)、ブレンツキシマブベトチン、BrevaRex、ブリアキヌマブ、プロダルマブ、プロルシズマブ、ブロンチクツマブ(brontictuzumab)、C2-2b-2b、カナキヌマブ、カンツズマブメルタンシン、カンツズマブラブタンシン(ravtansine)、カブラシズマブ、カプロマブペンデチド、カルルマブ(carlumab)、カツマキソマブ、CBR96-ドキシウルビシンイムノコンジュゲート、CBT124(ベバシズマブ)、CC-90002、CDX-014、CDX-1401、セデリズマブ(cedelizumab)、セルトリズマブペゴール、セツキシマブ、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15029、CGEN-15049、CGEN-15052、CGEN-15092、Ch.14.18、シタツズマブボガトックス(citatzumab bogatox)、シクスツムマブ、クラザキズマブ(clazakizumab)、クレノリキシマブ、クリバツズマブ(clivatuzumab)テトラキセタン、CM-24、コドリツズマブ(codrituzumab)、コルツキシマブラブタンシン(coltuximab ravtansine)、コナツムマブ(conatumumab)、コンシズマブ、Cotara(ヨウ素131デルロツキシマブビオチン(derlotuximab biotin))、cR6261、クレネズマブ(crenezumab)、DA-3111(トラスツズマブバイオシミラー)、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダロツズマブ(dalotuzumab)、ダピロリズマブペゴール(dapirolizumab pegol)、ダラツムマブ、Daratumumab Enhance(ダラツムマブ)、ダルロイキン(Darleukin)、デクトレクマブ(dectrekumab)、デムシズマブ(demcizumab)、デニンツズマブマホドチン(denintuzumab mafodotin)、デノスマブ、デバツキシズマブ(Debatuxizumab)、デバツキシズマブマホドチン(Debatuxizumab mafodotin)、デルロツキシマブビオチン(derlotuximab biotin)、デツモマブ(detumomab)、DI-B4、ジヌツキシマブ、ジリダブマブ(diridavumab)、DKN-01、DMOT4039A、ドルリモマブアリトックス(dorlimomab aritox)、ドロジツマブ(droazitumab)、DS-

10

20

30

40

50

1123、DS-8895、デュリゴツマブ(duligotumab)、デュピルマブ、デュルバルマブ、
ドゥシギツマブ(dusigitumab)、エクロメキシマブ(ecromeximab)、エキリズマブ、
エドバコマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エフングマブ(efungumab)、エル
デルマブ(eldelumab)、エルゲムツマブ(elgemtumab)、エロツズマブ、エルシリモマ
ブ(elsilimomab)、エマクツズマブ(emactuzumab)、エミベツズマブ(emibetuzum
ab)、エナバツズマブ(enavatuzumab)、エンホルツマブベトチン、エンリモマブ(enli
momab)ペゴール、エノブリツズマブ(enoblituzumab)、エノキズマブ(enokizumab
)、エノチクマブ(enoticumab)、エンシツキシマブ(ensituximab)、エピツモマブシ
ツキセタン(epitumomab cituxetan)、エプラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキシ
マブ(ertumaxomab)、エタラシズマブ(etaracizumab)、エトロリズマブ(etrolizum
ab)、エビナクマブ(evinacumab)、エボロクマブ、エキシビビルマブ(exbivirumab)
、ファノレソマブ(fanolesomab)、ファラリモマブ(faralimomab)、ファーレツズマ
ブ、ファシヌマブ(fasinumab)、FBTA05、フェルビズマブ(felvizumab)、フェザキ
ヌマブ(fezakinumab)、FF-21101、FGFR2抗体薬物コンジュゲート、フィブロムン(
Fibromun)、フィクラツズマブ(ficlatuzumab)、フィギツムマブ、フィリブマブ(firi
vumab)、フランボツマブ(flanvotumab)、フレチクマブ(fletikumab)、フォントリ
ズマブ、フォラルマブ(foralumab)、フォラビルマブ(foravirumab)、FPA144、フ
レソリムマブ(fresolimomab)、FS102、フルラヌマブ(fulranumab)、フツキシマブ
(futuximab)、ガリキシマブ、ガニツマブ(ganitumab)、ガンテネルマブ、ガビリモマ
ブ(gavilimomab)、ゲムツズマブオゾガマイシン(gemtuzumab ozogamicin)、ゲリ
ニムズマブ(Gerilimzumab)、ゲボキズマブ、ギレンツキシマブ(girentuximab)、グ
レムバツムマブ(glembatumumab)ベトチン、GNR-006、GNR-011、ゴリムマブ、
ゴミリキシマブ(gomiliximab)、GSK2849330、GSK2857916、GSK3174998、G
SK3359609、グセルクマブ、Hu14.18K322A MAb、hu3S193、Hu8F4、HuL2G
7、HuMab-5B1、イバリズマブ(ibalizumab)、イブリツモマブチウキセタン、イクル
クマブ(icrucumab)、イダルシズマブ、IGN002、IGN523、イゴボマブ(igovomab)
、IMAB362、IMAB362(クローディキシマブ(claudiximab))、イマルマブ(imalum
ab)、IMC-CS4、IMC-D11、イムシロマブ(imciromab)、イムガツズマブ(imgatuzu
mab)、IMGN529、IMMU-102(イットリウム90エプラツズマブテトラキセタン)、IM
MU-114、ImmuTune IMP701アンタゴニスト抗体、INCAGN1876、インクラクマ
ブ(inclacumab)、INCSHR1210、インダツキシマブラブタンシン(indatuximab ra
vtansine)、インツサツマブ(indusatumab)ベトチン、インフリキシマブ、イノリモマ
ブ(inolimomab)、イノツズマブオゾガマイシン、インテツムマブ(intetumumab)、I
pafricept、IPH4102、イピリムマブ、イラツムマブ(iratumumab)、イサツキシマ
ブ、イスチラツマブ、イトリズマブ、イクセキズマブ、JNJ-56022473、JNJ-61610
588、ケリキシマブ、KTN3379、L19IL2/L19TNF、ラベツズマブ、ラベツズマブゴ
ビテカン(Govitecan)、LAG525、ランブロリズマブ、ランパリズマブ(lampalizuma
b)、L-DOS47、レブリキズマブ(lebrikizumab)、レマレソマブ(lemalesomab)、レ
ンジルマブ(lenzilumab)、レルデリムマブ(lerdelimomab)、ロイコツキシマブ(Leu
kotuximab)、レクサツムマブ、リビビルマブ(libivirumab)、リファスツズマブ(lifa
stuzumab)ベトチン、リゲリズマブ(ligelizumab)、リトロマブサテトラキセタン(lil
otomab satetraxetan)、リンツズマブ、リリルマブ(lirilumab)、LKZ145、ロデル
シズマブ(lodelcizumab)、ロキベトマブ(lokiivetmab)、ロルボツズマブ(lorvotuzu
mab)メルタンシン、ルカツムマブ(lucatumumab)、ルリズマブ(lulizumab)ペゴール
、ルミリキシマブ、ルムレツズマブ(lumretuzumab)、LY3164530、マパツズマブ、
マルゲツキシマブ、マスリモマブ(maslimomab)、マツズマブ、マブリリムマブ(mavr
ilimomab)、MB311、MCS-110、MEDI0562、MEDI-0639、MEDI0680、MEDI
-3617、MEDI-551(イネビリズマブ(inebilizumab))、MEDI-565、MEDI6469、
メボリズマブ、メテリムマブ(metelimomab)、MGB453、MGD006/S80880、MGD
007、MGD009、MGD011、ミラツズマブ、ミラツズマブ-SN-38、ミンレツモマブ(

10

20

30

40

50

minretumomab)、ミルベツキシマブラブタンシン(mirvetuximab soravtansine)、ミツモマブ(mitumomab)、MK-4166、MM-111、MM-151、MM-302、モガムリズマブ、MOR202、MOR208、MORAb-066、モロリムマブ(morolimimumab)、モタビズマブ、モキセツモマブパストクス(moxetumomab pasudotox)、ムロモナブ-CD3、ナコロマブタフェナトクス(nacolumab tafenatox)、ナモルマブ(namilumab)、ナプツモマブエスタフェナトクス、ナルナツマブ(narnatumab)、ナタリズマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネモリズマブ、ネレリモマブ(nerelimomab)、ネスバクマブ(nesvacumab)、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノフェツモマブメルペンタン(nofetumomab merpentan)、NOV-10、オビルトキサキシマブ(obiltoxaximab)、オビヌツズマブ、オカラツズマブ(ocaratumumab)、オクレリズマブ、オデュリモマブ(odulimomab)、オフアツムマブ、オララツマブ(olaratumab)、オロキズマブ(olokizumab)、オマリズマブ、OMP-131R10、OMP-305B83、オナルツズマブ(onartuzumab)、オンツキシズマブ(ontuxizumab)、オピシヌマブ(opicinumab)、オボルツズマブモナトクス(oportuzumab monatox)、オレゴボマブ、オルチクマブ(orticumab)、オテリキシズマブ、オトレルツズマブ(otlertuzumab)、OX002/MEN1309、オキセルマブ(oxelumab)、オザネズマブ(ozanezumab)、オゾラリズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、パンコマブ(pankomab)、PankoMab-GEX、パノバクマブ(panobacumab)、パルサツズマブ(parsatumumab)、パスコリズマブ(pascolizumab)、パソツキシズマブ(pasotuxizumab)、パテクリズマブ(pateclizumab)、パトリツマブ(patritumab)、PAT-SC1、PAT-SM6、ペンブロリズマブ、ペムツモマブ(pemtumomab)、ペラキズマブ(perakizumab)、ペルツズマブ、パキセリズマブ、PF-05082566(ウトミルマブ(utomilumab))、PF-06647263、PF-06671008、PF-06801591、ピディリズマブ、ピナツズマブ(pinatumumab)ベトチン、ピンツモマブ(pintumomab)、プラクルマブ(placulumab)、ポラツズマブベトチン、ポネズマブ、プリリキシマブ(priliximab)、プリトキサキシマブ(pritoxaximab)、プリツムマブ(pritumumab)、PRO 140、プロキシニウム(Proxinium)、PSMA ADC、キリズマブ(quilizumab)、ラコツモマブ(racotumomab)、ラドレツマブ(radretumab)、ラフィビルマブ(rafivirumab)、ラルパンシズマブ(ralpancizumab)、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、レファネズマブ(refanezumab)、レガビルマブ、REGN1400、REGN2810/SAR439684、レスリズマブ、RFM-203、RG7356、RG7386、RG7802、RG7813、RG7841、RG7876、RG7888、RG7986、リロツムマブ、リヌクマブ(rinucumab)、リツキシマブ、RM-1929、RO7009789、ロバツムマブ(robatumumab)、ロレズマブ(roledumab)、ロモソズマブ、ロンタリズマブ(rontalizumab)、ロベリズマブ(rovelizumab)、ルブリズマブ(ruplizumab)、サシツズマブゴビテカン、サマリズマブ(samalizumab)、SAR408701、SAR566658、サリルマブ、SAT012、サツモマブペンデチド(satumomab pendetide)、SCT200、SCT400、SEA-CD40、セクキヌマブ、セリバンツマブ(seribantumab)、セトキサキシマブ(setoxaximab)、セビルマブ(sevirumab)、SGN-CD19A、SGN-CD19B、SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-LIV1A、シブロツズマブ(sibrotuzumab)、シファリムマブ(sifalimumab)、シルツキシマブ、シムツズマブ(simtuzumab)、シプリズマブ、シルクマブ(sirukumab)、ソフィツズマブ(sofituzumab)ベトチン、ソラネズマブ、ソリトマブ(solitomab)、ソネプシズマブ(sonenpcizumab)、ソンツズマブ(sontuzumab)、スタムルマブ(stamulumab)、スレソマブ(sulesomab)、スビズマブ(suvizumab)、SYD985、SYM004(フツキシマブ(futuximab)およびモドツキシマブ(modotuximab))、Sym015、TAB08、タバルマブ、タカツズマブ(tacatumumab)テトラキセタン、タドシズマブ(tadocizumab)、タリズマブ、タネズマブ、タニビルマブ(Tanibirumab)、タプリツモマブパプトクス(taplitumomab paptox)、タレクスツマブ(tarextumab)、TB-403、テフィバズマブ(tefibazumab)、テロイキン(Teleukin)、テリモマブアリトクス(telimomab aritox)、テナツモマブ(tenatumomab)、テネリキシマブ(teneliximab)、テプリズマブ、テプロツムマブ、テシドルマブ(tesidol

10

20

30

40

50

umab)、テツロマブ、TG-1303、TGN1412、トリウム-227-エブラツズマブコンジュゲート、トレメリマブ、ティガツズマブ、チルドラキズマブ、チソツマブベトチン、TNX-650、トシリズマブ、トラリズマブ(toralizumab)、トサトクスマブ(tosatoxumab)、トシツモマブ、トベツマブ(tovetumab)、トラロキヌマブ(tralokinumab)、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、TRBS07、TRC105、トレガリズマブ(tr egalizumab)、トレメリマブ、トレボグルマブ(trevogrumab)、TRPH 011、TRX 518、TSR-042、TTI-200.7、ツコツズマブ(tucotuzumab)セルモロイキン、ツビルマブ、U3-1565、U3-1784、ウブリツキシマブ(ublrituximab)、ウロクブルマブ(ulocuplumab)、ウレルマブ(urelumab)、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バダスツキシマブタリリン(Vadastuximab Talirine)、バンドルツズマブ(vandortuzumab)ベトチン、バンチクツマブ(vantictumab)、バヌシズマブ(vanucizumab)、バパリキシマブ(vapaliximab)、バルリルマブ(varlilumab)、バテリズマブ(vatelizumab)、VB6-845、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ(vepalimomab)、ベセンクマブ(vesencumab)、ビジリズマブ、ボロシキシマブ、ボルセツズマブマホドチン、ボツムマブ(votumumab)、YYB-101、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ザツキシマブ(zatuximab)、ジラリムマブ(ziralimumab)、およびゾリモマブアリトックス(zolimomab aritox)。ある特定の態様において、リガンド相互作用ドメインは、前述した抗体のFcドメインに結合する。

10

【0385】

いくつかの態様において、本明細書に開示される抗体もしくはその機能的断片、または本明細書に開示される抗原結合ドメインは、以下からなる群から選択される抗体に結合する:20-(74)-(74)(ミラツズマブ;ベルツズマブ)、20-2b-2b、3F8、74-(20)-(20)(ミラツズマブ;ベルツズマブ)、8H9、A33、AB-16B5、アバゴボマブ(abagovomab)、アブシキシマブ、アビツズマブ(abituzumab)、ABP 494(セツキシマブバイオシミラー)、アブリルマブ(abrilumab)、ABT-700、ABT-806、アクチマブ-A(Actimab-A)(アクチニウムAc-225リンツズマブ)、アクトクスマブ(actoxumab)、アダリムマブ、ADC-1013、ADCT-301、ADCT-402、アデカツムマブ(adecatumumab)、アデュカヌマブ、アフエリモマブ、AFM13、アフツズマブ、AGEN1884、AGS15E、AGS-16C3F、AGS67E、アラシズマブペゴール(alacizumab pegol)、ALD518、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブペンテト酸、アマツキシマブ、AMG 228、AMG 820、アナツモマブマフェナトックス(anatumomab mafenatox)、アネツマブラブタンシン(anetumab ravtansine)、アニフロルマブ、アンルキンズマブ(anrukinzumab)、APN301、APN311、アポリズマブ、APX003/SIM-BD0801(セバシズマブ(sevacizumab))、APX005M、アルシツモマブ、ARX788、アスクリンバクマブ(ascrinvacumab)、アセリズマブ(aselizumab)、ASG-15ME、アテゾリズマブ、アチヌマブ(atinumab)、ATL101、アトリズマブ(また、トシリズマブとも称される)、アトロリムマブ(atorolimumab)、アベルマブ、B-701、バピネオズマブ、バシリキシマブ、バビツキシマブ、BAY1129980、BAY1187982、ベクツモマブ(bectumomab)、ベゲロマブ(begelomab)、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベルチリムマブ(bertilimumab)、ベシレソマブ、ベタルチン(Betalutin)(177Lu-テトラキセタン-テツロマブ)、ベバシズマブ、BEVZ92(ベバシズマブバイオシミラー)、ベズロトクスマブ(bezlotoxumab)、BGB-A317、BHQ880、BI 836880、BI-505、ビシロマブ(biciromab)、ビマグルマブ(bimagrumab)、ビメキズマブ(bimekizumab)、ビバツズマブ(bivatuzumab)メルタンシン、BIW-8962、ブリナツモマブ、ブロソズマブ(blosozumab)、BMS-936559、BMS-986012、BMS-986016、BMS-986148、BMS-986178、BNC101、ボコシズマブ(bococizumab)、ブレンツキシマブベトチン、BrevaRex、ブリアキヌマブ、プロダルマブ、プロルシズマブ、ブロンチクツマブ(brontictuzumab)、C2-2b-2b、カナキヌマブ、カンツズマブメルタンシン、カンツズマブラブタンシン(ravtansine)、カブラシズマブ、カプロマブペンデチド、カルルマブ(carlumab)、カツマキソマブ、CBR96-ドキシウルビシンイムノコンジュゲート、CBT124(ベバシズマブ)、CC-9

20

30

40

50

0002、CDX-014、CDX-1401、セデリズマブ(cedelizumab)、セルトリズマブペゴール、セツキシマブ、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15029、CGEN-15049、CGEN-15052、CGEN-15092、Ch.14.18、シタツズマブボガトックス(citatumab bogatox)、シクスツムマブ、クラザキズマブ(clazakizumab)、クレノリキシマブ、クリバツズマブ(clivatuzumab)テトラキセタン、CM-24、コドリツズマブ(codrituzumab)、コルツキシマブラブタンシン(coltuximab ravtansine)、コナツムマブ(conatumumab)、コンシズマブ、Cotara(ヨウ素131デルロツキシマブビオチン(derlotuximab biotin))、cR6261、クレネズマブ(crenezumab)、DA-3111(トラスツズマブバイオシミラー)、ダセツズマブ、ダクリズマブ、ダロツズマブ(dalotuzumab)、ダピロリズマブペゴール(dapirolizumab pegol)、ダラツムマブ、Daratumumab Enhance(ダラツムマブ)、ダルロイキン(Darleukin)、デクトレクマブ(dectrekumab)、デムシズマブ(demcizumab)、デニンツズマブマホドチン(denintuzumab mafodotin)、デノスマブ、デパツキシズマブ(Depatuxizumab)、デパツキシズマブマホドチン(Depatuxizumab mafodotin)、デルロツキシマブビオチン(derlotuximab biotin)、デツモマブ(detumomab)、DI-B4、ジヌツキシマブ、ジリダブマブ(diridavumab)、DKN-01、DMOT4039A、ドルリモマブアリトックス(dorlimomab aritox)、ドロジツマブ(droazitumab)、DS-1123、DS-8895、デュリゴツマブ(duligotumab)、デュピルマブ、デュルバルマブ、ドゥシギツマブ(dusigitumab)、エクロメキシマブ(ecromeximab)、エクリズマブ、エドバコマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エフングマブ(efungumab)、エルデルマブ(eldelumab)、エルゲムツマブ(elgemtumab)、エロツズマブ、エルシリモマブ(elsilimomab)、エマクツズマブ(emactuzumab)、エミベツズマブ(emibetuzumab)、エナバツズマブ(enavatuzumab)、エンホルツマブベトチン、エンリモマブ(enlimomab)ペゴール、エノブリツズマブ(enoblituzumab)、エノキズマブ(enokizumab)、エノチクマブ(enoticumab)、エンシツキシマブ(ensituximab)、エピツモマブシツキセタン(epitumomab cituxetan)、エブラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキソマブ(ertumaxomab)、エタラシズマブ(etaracizumab)、エトロリズマブ(etrolizumab)、エビナクマブ(evinacumab)、エボロクマブ、エキシビビルマブ(exbivirumab)、ファノレソマブ(fanolesomab)、ファラリモマブ(faralimomab)、ファーレッツズマブ、ファシヌマブ(fasinumab)、FBTA05、フェルビズマブ(felvizumab)、フェザキヌマブ(fezakinumab)、FF-21101、FGFR2抗体薬物コンジュゲート、フィブロムン(Fibromun)、フィクラツズマブ(ficlatuzumab)、フィギツムマブ、フィリブマブ(firivumab)、フランボツマブ(flanvotumab)、フレチクマブ(fletikumab)、フォントリズマブ、フォラルマブ(foralumab)、フォラビルマブ(foravirumab)、FPA144、フレソリムマブ(fresolimomab)、FS102、フルラヌマブ(fulranumab)、フツキシマブ(futuximab)、ガリキシマブ、ガニツマブ(ganitumab)、ガンテネルマブ、ガビリモマブ(gavilimomab)、ゲムツズマブオゾガマイシン(gemtuzumab ozogamicin)、ゲリニムズマブ(Gerilimzumab)、ゲボキズマブ、ギレンツキシマブ(girentuximab)、グレムバツムマブ(glembatumumab)ベトチン、GNR-006、GNR-011、ゴリムマブ、ゴミリキシマブ(gomiliximab)、GSK2849330、GSK2857916、GSK3174998、GSK3359609、グセルクマブ、Hu14.18K322A MAbs、hu3S193、Hu8F4、HuL2G7、HuMab-5B1、イバリズマブ(ibalizumab)、イブリツモマブチウキセタン、イクルクマブ(icrucumab)、イダルシズマブ、IGN002、IGN523、イゴボマブ(igovomab)、IMAB362、IMAB362(クローディキシマブ(claudiximab))、イマルマブ(imalumab)、IMC-CS4、IMC-D11、イムシロマブ(imciromab)、イムガツズマブ(imgatuzumab)、IMGN529、IMMU-102(イットリウム90エブラツズマブテトラキセタン)、IMMU-114、ImmuTune IMP701アンタゴニスト抗体、INCAGN1876、インクラクマブ(inclacumab)、INCSHR1210、インダツキシマブラブタンシン(indatuximab ravtansine)、インヅサツマブ(indusatumab)ベトチン、インフリキシマブ、イノリモマブ(inolimomab)、イノツズマブオゾガマイシン、インテツムマブ(intetumumab)、Ipafricept、IPH4102、イピリムマブ、イラツムマブ(

10

20

30

40

50

iratumumab)、イサツキシマブ、イストラツマブ、イトリズマブ、イキセキズマブ、J
NJ-56022473、JNJ-61610588、ケリキシマブ、KTN3379、L19IL2/L19TNF、
ラベツズマブ、ラベツズマブゴビテカン(Govitecan)、LAG525、ランブロリズマブ、
ランパリズマブ(lampalizumab)、L-DOS47、レブリキズマブ(lebrikizumab)、レ
マレソマブ(lemalesomab)、レンジルマブ(lenzilumab)、レルデリムマブ(lerdelim
umab)、ロイコツキシマブ(Leukotuximab)、レクサツムマブ、リビビルマブ(libivir
umab)、リファスツズマブ(lifastuzumab)ベトチン、リゲリズマブ(ligelizumab)、
リトロマブサテトラキセタン(lilotomab satetraxetan)、リンツズマブ、リリルマブ(
lirilumab)、LKZ145、ロデルシズマブ(lodelcizumab)、ロキベトマブ(lokivetma
b)、ロルボツズマブ(lorvotuzumab)メルタンシン、ルカツムマブ(lucatumumab)、
ルリズマブ(lulizumab)ペゴール、ルミリキシマブ、ルムレツズマブ(lumretuzumab)
、LY3164530、マパツズマブ、マルゲツキシマブ、マスリモマブ(maslimomab)、マ
ツズマブ、マブリリムマブ(mavrilimumab)、MB311、MCS-110、MEDI0562、M
EDI-0639、MEDI0680、MEDI-3617、MEDI-551(イネビリズマブ(inebilizumab
))、MEDI-565、MEDI6469、メボリズマブ、メテリムマブ(metelimumab)、MGB4
53、MGD006/S80880、MGD007、MGD009、MGD011、ミラツズマブ、ミラツズ
マブ-SN-38、ミンレツモマブ(minretumomab)、ミルベツキシマブラブタンシン(mir
vetuximab soravtansine)、ミツモマブ(mitumomab)、MK-4166、MM-111、M
M-151、MM-302、モガムリズマブ、MOR202、MOR208、MORAb-066、モロリ
ムマブ(morolimumab)、モタビズマブ、モキセツモマブパストトクス(moxetumomab
pasudotox)、ムロモナブ-CD3、ナコロマブタフェナトックス(nacolomab tafenato
x)、ナモルマブ(namilumab)、ナブツモマブエスタフェナトクス、ナルナツマブ(narn
atumab)、ナタリズマブ、ネバクマブ、ネシツムマブ、ネモリズマブ、ネレリモマブ(n
erelimomab)、ネスバクマブ(nesvacumab)、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノフェツ
モマブメルペンタン(nofetumomab merpentan)、NOV-10、オビルトキサキシマブ(
obilttoxaximab)、オビヌツズマブ、オカラツズマブ(ocaratuzumab)、オクレリズマ
ブ、オデュリモマブ(odulimomab)、オフアツムマブ、オララツマブ(olaratumab)、
オロキズマブ(olokizumab)、オマリズマブ、OMP-131R10、OMP-305B83、オナ
ルツズマブ(onartuzumab)、オンツキシズマブ(ontuxizumab)、オピシヌマブ(opici
numab)、オポルツズマブモナトックス(oportuzumab monatox)、オレゴボマブ、オル
チクマブ(orticumab)、オテリキシズマブ、オトレルツズマブ(otlertuzumab)、O
X002/MEN1309、オキセルマブ(oxelumab)、オザネズマブ(ozanezumab)、オゾラ
リズマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、パンコマブ(pankomab)、P
ankoMab-GEX、パノバクマブ(panobacumab)、パルサツズマブ(parsatuzumab)、
パスコリズマブ(pascolizumab)、パソツキシズマブ(pasotuxizumab)、パテクリズ
マブ(pateclizumab)、パトリツマブ(patritumab)、PAT-SC1、PAT-SM6、ペンブ
ロリズマブ、ペムツモマブ(pemtumomab)、ペラキズマブ(perakizumab)、ペルツズ
マブ、パキセリズマブ、PF-05082566(ウトミルマブ(utomilumab))、PF-066472
63、PF-06671008、PF-06801591、ピディリズマブ、ピナツズマブ(pinatuzuma
b)ベトチン、ピンツモマブ(pintumomab)、プラクルマブ(placulumab)、ポラツズマ
ブベトチン、ポネズマブ、プリリキシマブ(priliximab)、プリトキサキシマブ(pritox
aximab)、プリツムマブ(pritumumab)、PRO 140、プロキシニウム(Proxinium)、
PSMA ADC、キリズマブ(quilizumab)、ラコツモマブ(racotumomab)、ラドレツマ
ブ(radretumab)、ラフィビルマブ(rafivirumab)、ラルパンシズマブ(ralpancizum
ab)、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、レファネズマブ(refanezumab)
、レガビルマブ、REGN1400、REGN2810/SAR439684、レスリズマブ、RFM-203
、RG7356、RG7386、RG7802、RG7813、RG7841、RG7876、RG7888、RG7
986、リロツムマブ、リヌクマブ(rinucumab)、リツキシマブ、RM-1929、RO7009
789、ロバツムマブ(robatumumab)、ロレズマブ(roledumab)、ロモソズマブ、ロン
タリズマブ(rontalizumab)、ロベリズマブ(rovelizumab)、ルプリズマブ(ruplizum

ab)、サシツズマブゴビテカン、サマリズマブ(samalizumab)、SAR408701、SAR566658、サリルマブ、SAT 012、サツモマブペンデチド(satumomab pendetide)、SCT200、SCT400、SEA-CD40、セクキヌマブ、セリバンツマブ(seribantumab)、セトキサキシマブ(setoxaximab)、セビルマブ(sevirumab)、SGN-CD19A、SGN-CD19B、SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-LIV1A、シブロツズマブ(sibrotuzumab)、シファリムマブ(sifalimumab)、シルツキシマブ、シムツズマブ(simtuzumab)、シブリズマブ、シルクマブ(sirukumab)、ソフィツズマブ(sofituzumab)ベトチン、ソラネズマブ、ソリトマブ(solitomab)、ソネプシズマブ(sonepcizumab)、ソントツズマブ(sontuzumab)、スタムルマブ(stamulumab)、スレソマブ(sulesomab)、スビズマブ(suvizumab)、SYD985、SYM004(フツキシマブ(futuximab)およびモドツキシマブ(modotuximab))、Sym015、TAB08、タバルマブ、タカツズマブ(tacatuzumab)テトラキセタン、タドシズマブ(tadocizumab)、タリズマブ、タネズマブ、タニビルマブ(Tanibirumab)、タプリツモマブパプトクス(taplitumomab paptox)、タレクスツマブ(tarextumab)、TB-403、テフィバズマブ(tefibazumab)、テロイキン(Teleukin)、テリモマブアリトクス(telimomab aritox)、テナツモマブ(tenatumomab)、テネリキシマブ(teneliximab)、テプリズマブ、テプロツムマブ、テシドルマブ(tesidolumab)、テツロマブ、TG-1303、TGN1412、トリウム-227-エブラツズマブコンジュゲート、トレメリムマブ、ティガツズマブ、チルドラキズマブ、チソツマブベトチン、TNX-650、トシリズマブ、トラリズマブ(toralizumab)、トサトクスマブ(tosatouxumab)、トシツモマブ、トベツマブ(tovetumab)、トラロキヌマブ(tralokinumab)、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシン、TRBS07、TRC105、トレガリズマブ(tregalizumab)、トレメリムマブ、トレボグルマブ(trevogrumab)、TRPH 011、TRX518、TSR-042、TTI-200.7、ツコツズマブ(tucotuzumab)セルモロイキン、ツビルマブ、U3-1565、U3-1784、ウブリツキシマブ(ublituximab)、ウロクブルマブ(ulocuplumab)、ウレルマブ(urelumab)、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、バダスツキシマブタリリン(Vadastuximab Talirine)、バンドルツズマブ(vandortuzumab)ベトチン、バンチクツマブ(vantictumab)、バヌシズマブ(vanucizumab)、バパリキシマブ(vapaliximab)、バルリルマブ(varlilumab)、バテリズマブ(vatelizumab)、VB6-845、ベドリズマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ(vepalimomab)、ベセンクマブ(vesencumab)、ビジリズマブ、ボロシキシマブ、ボルセツズマブマホドチン、ボツムマブ(votumumab)、YYB-101、ザルツムマブ、ザノリムマブ、ザツキシマブ(zatuximab)、ジラリムマブ(ziralimumab)、およびゾリモマブアリトックス(zolimomab aritox)。ある特定の態様において、リガンド相互作用ドメインは、前述した抗体のFcドメインに結合する。

【0386】

いくつかの態様において、本明細書に開示される抗体もしくはその機能的断片、または本明細書に開示される抗原結合ドメインは、以下からなる群から選択される抗原に結合する:1-40-β-アミロイド、4-1BB、5AC、5T4、アクチビン受容体様キナーゼ1、ACVR2B、腺がん抗原、AGS-22M6、アルファ-フェトプロテイン、アンジオポエチン2、アンジオポエチン3、anthrax toxin、AOC3(VAP-1)、B7-H3、Bacillus anthracis炭疽病、BAFF、ベータ-アミロイド、B-リンパ腫細胞、C242抗原、C5、CA-125、Canis lupus familiaris IL31、炭酸脱水酵素9(CA-IX)、心筋ミオシン、CCL11(エオタキシン-1)、CCR4、CCR5、CD11、CD18、CD125、CD140a、CD147(ペイシジン)、CD15、CD152、CD154(CD40L)、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(IgE受容体)、CD25(IL-2受容体のα鎖)、CD27、CD274、CD28、CD3、CD3イプシロン、CD30、CD33、CD37、CD38、CD4、CD40、CD40リガンド、CD41、CD44 v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD74、CD79B、CD80、CEA、CEA関連抗原、CFD、ch4D5、CLDN18.2、Clostridium difficile、クランピング因子A、CSF1R、CSF2、CTLA-4、C-X-Cケモカイン受容体4型、サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、ダビガトラン、DLL4、DPP

10

20

30

40

50

4、DR5、E.coli志賀毒素1型、E.coli志賀毒素2型、EGFL7、EGFR、エンドトキシン、EpCAM、エプシアリン、ERBB3、Escherichia coli、呼吸器多核体ウイルスのFタンパク質、FAP、フィブリンIIベータ鎖、フィブロネクチンエクストラドメインB、葉酸ヒドロラーゼ、葉酸受容体1、葉酸受容体アルファ、Frizzled受容体、ガングリオシドGD2、GD2、GD3ガングリオシド、グリピカン3、GMCSF受容体α鎖、GPNMB、成長分化因子8、GUCY2C、赤血球凝集素、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルス、HER1、HER2/neu、HER3、HGF、HHGFR、ヒストン複合体、HIV-1、HLA-DR、HNGF、Hsp90、ヒト散乱係数受容体キナーゼ、ヒトTNF、ヒトベータ-アミロイド、ICAM-1(CD54)、IFN-α、IFN-γ、IgE、IgE Fc領域、IGF-1受容体、IGF-1、IGHE、IL 17A、IL 17F、IL 20、IL-12、IL-13、IL-17、IL-1β、IL-22、IL-23、IL-31RA、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6受容体、IL-9、ILGF2、A型インフルエンザ赤血球凝集素、A型インフルエンザウイルス赤血球凝集素、インスリン様成長因子I受容体、インテグリンα4β7、インテグリンα4、インテグリンα5β1、インテグリンα7β7、インテグリンαIIbβ3、インテグリンαvβ3、インターフェロンα/β受容体、インターフェロンガンマ誘導タンパク質、ITGA2、ITGB2(CD18)、KIR2D、Lewis-Y抗原、LFA-1(CD11a)、LINGO-1、リポテイコ酸、LOXL2、L-セレクトイン(CD62L)、LTA、MCP-1、メソセリン、MIF、MS4A1、MSLN、MUC1、ムチンCanAg、ミエリン関連糖タンパク質、ミオスタチン、NCA-90(顆粒球抗原)、神経アポトーシス調節プロテインナーゼ1、NGF、N-グリコリルノイラミン酸、NOGO-A、Notch受容体、NRP1、Oryctolagus cuniculus、OX-40、oxLDL、PCSK9、PD-1、PDCD1、PDGF-R α、リン酸-ナトリウム共輸送体、ホスファチジルセリン、血小板由来成長因子受容体ベータ、前立腺がん細胞、Pseudomonas aeruginosa、狂犬病ウイルス糖タンパク質、RANKL、呼吸器多核体ウイルス、RHD、Rh因子、RON、RTN4、スクレロスチン、SDC1、セレクトインP、SLAMF7、SOST、スフィンゴシン-1-ホスフェート、Staphylococcus aureus、STEAP1、TAG-72、T-cell受容体、TEM1、テネイシンC、TFPI、TGF-β 1、TGF-β 2、TGF-β、TNF-α、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、MUC1の腫瘍特異性糖鎖付加、腫瘍関連カルシウムシグナル形質導入因子2、TWEAK受容体、TYRP1(糖タンパク質75)、VEGFA、VEGFR1、VEGFR2、ビメンチン、およびVWF。

10

20

30

40

50

【0387】

核酸分子

いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、核酸分子を含む。核酸分子は、本明細書に記載されるタンパク質またはポリペプチドをコードする、コード配列を有することができる。実例としては、核酸分子は、核酸分子によってコードされるタンパク質を送達する目的で、本明細書に開示される送達ビヒクルによって送達されることができる。いくつかの場合において、核酸分子は機能的核酸分子であり、実例としては、核酸分子は、タンパク質合成のためのテンプレートとして使用される以外の生物学的機能を有する、非コード配列またはコード配列を有することができる。実例としては、核酸分子は、RNAスプライシングを調節し、mRNAの翻訳を調節し、転写調節のためにゲノムDNAを標的化し、またはタンパク質もしくはオルガネラに結合することができる。

【0388】

いくつかの場合において、核酸分子は、in vitroでの送達ビヒクルのエレクトロポレーションなどの直接負荷によって、送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)へと負荷される。いくつかの場合において、核酸分子は、送達ビヒクルの一部である、または既に送達ビヒクルへと負荷されている、核酸結合タンパク質(一例として、Casタンパク質)へ結合することによって、送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)へと負荷される。

【0389】

核酸分子の非限定的な例は、DNA、nDNA(核DNA)、mtDNA(ミトコンドリアDNA)、タンパク質コードDNA、遺伝子、オペロン、染色体、ゲノム、トランスポゾン、レト

ロトランスポゾン、ウイルスゲノム、イントロン、エクソン、修飾DNA、mRNA(メッセンジャーRNA)、tRNA(転移RNA)、修飾RNA、マイクロRNA、siRNA(短干渉RNA)、tmRNA(転移メッセンジャーRNA)、rRNA(リボソームRNA)、mtRNA(ミトコンドリアRNA)、snRNA(小核RNA)、小核小体RNA(snoRNA)、SmY RNA(mRNAトランス-スプライシングRNA)、gRNA(ガイドRNA)、TERC(テロメラーゼRNA構成要素)、aRNA(アンチセンスRNA)、cis-NAT(Cis-天然アンチセンス転写物)、CRISPR RNA(crRNA)、lncRNA(長鎖非コードRNA)、piRNA(piwi-相互作用RNA)、shRNA(低分子ヘアピン型RNA)、tasiRNA(トランス作動性siRNA)、eRNA(エンハンサRNA)、サテライトRNA、pcRNA(タンパク質コードRNA)、dsRNA(二重ストランドRNA)、RNAi(干渉RNA)、circRNA(環状RNA)、リプログラミングRNAs、アプタマー、およびあらゆるこれらの組合せを包含する。いくつかの態様において、核酸は、野生型核酸である。いくつかの態様において、核酸は、突然変異核酸である。いくつかの態様において、核酸は、複数の核酸配列の融合物またはキメラである。

10

【0390】

いくつかの態様において、本開示の送達ビヒクルによって送達される核酸、一例としてDNA配列は、遺伝子突然変異を修正するように編集される。実例としては、編集された核酸は、遺伝子編集技術、一例として、ガイドRNAおよびCRISPR-Cas9/Cpf1を用いて、または異なる標的化エンドヌクレアーゼ(一例として、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化様ヌクレアーゼ(TALEN))を用いて、編集されている。いくつかの場合において、核酸は、in vitroで合成される。いくつかの態様において、遺伝子突然変異は、対象の疾患に関連する。DNAに対する編集の例は、小さな挿入/欠失、大きな欠失、テンプレートDNAによる遺伝子補正、またはDNAの大きな挿入を包含する。いくつかの態様において、遺伝子編集は、非相同末端接合(NHEJ)または相同組換え修復(HDR)によって達成される。いくつかの態様において、編集は、ノックアウトである。いくつかの態様において、編集は、ノックインである。いくつかの態様において、DNAの両方の対立遺伝子が編集される。いくつかの態様において、単一の対立遺伝子が編集される。いくつかの態様において、複数の編集が行われる。

20

【0391】

いくつかの態様において、カーゴは、核酸を包含してもよい。例えば、カーゴは、内在性タンパク質の発現を増強するためのRNA、または内在性タンパク質のタンパク質発現を阻害するsiRNAもしくはmiRNAを包含してもよい。例えば、内在性タンパク質は、標的細胞の構造または機能をモジュレートしてもよい。いくつかの態様において、カーゴは、標的細胞の構造または機能をモジュレートする操作されたタンパク質をコードする核酸を包含してもよい。いくつかの態様において、カーゴは、標的細胞における構造または機能をモジュレートする転写アクチベータを標的化する、核酸である。

30

【0392】

送達ビヒクルおよびカーゴ立体配置の例

送達ビヒクルおよびカーゴ立体配置の非限定的な例は、以下を包含する:

【0393】

(1)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

40

【0394】

(2)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴ-gag融合を発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

50

【0395】

(3)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴ-PH融合を発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0396】

(4)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴ-gag/PH融合を発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0397】

(5)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、二量体化分子(A/Cヘテロ二量体化剤)の存在下において、DmrAもしくはDmrCへ融合されたカーゴおよびgagを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0398】

(6)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、二量体化分子(A/Cヘテロ二量体化剤)の存在下において、DmrAもしくはDmrCへ融合されたカーゴおよびPHを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0399】

(7)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、二量体化分子(A/Cヘテロ二量体化剤)の存在下において、DmrAもしくはDmrCへ融合されたカーゴおよびgag/PHを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0400】

(8)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴで複合体化されるそのMS2 RNAステムループ(MS2 SL)へ結合する、RNA結合タンパク質(RBP)であるMS2へ融合されたカーゴおよびgagを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0401】

(9)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴで複合体化されるそのRNAステムループ(MS2 SL)へ結合する、RNA結合タンパク質(RBP)であるMS2へ融合されたカーゴおよびPHを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0402】

(10)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴで複合

10

20

30

40

50

体化されるそのRNAステムループ(MS2 SL)へ結合する、RNA結合タンパク質(RBP)であるMS2へ融合されたカーゴおよびgag/PHを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0403】

(11)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴおよびgag、ならびにカーゴで複合体化されるそのRNAステムループ(MS2 SL)へ結合するDmrAまたはDmrCへ融合する、RNA結合タンパク質(RBP)であるMS2を発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、二量体化分子(A/Cヘテロ二量体化剤)の存在下において、粒子の内側にパッケージングされる。

10

【0404】

(12)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴおよびPH、ならびにカーゴで複合体化されるそのRNAステムループ(MS2 SL)へ結合するDmrAまたはDmrCへ融合する、RNA結合タンパク質(RBP)であるMS2を発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、二量体化分子(A/Cヘテロ二量体化剤)の存在下において、粒子の内側にパッケージングされる。

20

【0405】

(13)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴおよびgag/PH、ならびにカーゴで複合体化されるそのRNAステムループ(MS2 SL)へ結合するDmrAまたはDmrCへ融合する、RNA結合タンパク質(RBP)であるMS2を発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、二量体化分子(A/Cヘテロ二量体化剤)の存在下において、粒子の内側にパッケージングされる。

【0406】

(14)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴと融合されたscFvによって結合された反復GCN4ドメインへ融合されたカーゴおよびgagを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

30

【0407】

(15)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴと融合されたscFvによって結合された反復GCN4ドメインへ融合されたカーゴおよびPHを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

40

【0408】

(16)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、カーゴと融合されたscFvによって結合された反復GCN4ドメインへ融合されたカーゴおよびgag/PHを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0409】

50

(17)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、DmrAまたはDmrCへ融合されるgagおよび反復GCN4ドメインを発現する生産細胞によって、二量体化分子(A/Cヘテロ二量体化剤)の存在下において、粒子の内側にパッケージングされる。GCN4は、生産細胞においてもまた発現されているカーゴと融合されたscFvによって結合される。粒子はまた、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されることもできる。

【0410】

(18)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、DmrAまたはDmrCへ融合されるPHおよび反復GCN4ドメインを発現する生産細胞によって、二量体化分子(A/Cヘテロ二量体化剤)の存在下において、粒子の内側にパッケージングされる。GCN4は、生産細胞においてもまた発現されているカーゴと融合されたscFvによって結合される。粒子はまた、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されることもできる。

【0411】

(19)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴは、DmrAまたはDmrCへ融合されるgag/PHおよび反復GCN4ドメインを発現する生産細胞によって、二量体化分子(A/Cヘテロ二量体化剤)の存在下において、粒子の内側にパッケージングされる。GCN4は、生産細胞においてもまた発現されているカーゴと融合されたscFvによって結合される。粒子はまた、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されることもできる。

【0412】

(20)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(AAV粒子)は、カーゴを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0413】

(21)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(AAV粒子)は、カーゴおよびgagを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0414】

(22)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(AAV粒子)は、カーゴおよびPHを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0415】

(23)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(AAV粒子)は、カーゴおよびgag/PHを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0416】

(24)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(カプシドタンパ

10

20

30

40

50

ク質であるVP2に挿入されたDmrBを有する、AAV粒子)は、DmrBへ融合されたカーゴおよびgagを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されている粒子のいずれかによって、DmrB二量体化剤(dimerizer)分子の存在下において粒子の内側にパッケージングされる。

【0417】

(25)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(カプシドタンパク質であるVP2に挿入されたDmrBを有する、AAV粒子)は、DmrBへ融合されたカーゴおよびPHを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されている粒子のいずれかによって、DmrB二量体化剤(dimerizer)分子の存在下において粒子の内側にパッケージングされる。

10

【0418】

(26)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(カプシドタンパク質であるVP2に挿入されたDmrBを有する、AAV粒子)は、DmrBへ融合されたカーゴおよびgag/PHを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されている粒子のいずれかによって、DmrB二量体化剤(dimerizer)分子の存在下において粒子の内側にパッケージングされる。

【0419】

(27)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(カプシドタンパク質であるVP2に挿入されたDmrBを有する、AAV粒子)は、DmrA、DmrB、またはDmrCへ融合されたカーゴおよびgagを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されている粒子のいずれかによって、DmrB二量体化剤分子およびA/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下において粒子の内側にパッケージングされる。

20

【0420】

(28)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(カプシドタンパク質であるVP2に挿入されたDmrBを有する、AAV粒子)は、DmrA、DmrB、またはDmrCへ融合されたカーゴおよびPHを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されている粒子のいずれかによって、DmrB二量体化剤分子およびA/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下において粒子の内側にパッケージングされる。

30

【0421】

(29)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(カプシドタンパク質であるVP2に挿入されたDmrBを有する、AAV粒子)は、DmrA、DmrB、またはDmrCへ融合されたカーゴおよびgag/PHを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されている粒子のいずれかによって、DmrB二量体化剤分子およびA/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下において粒子の内側にパッケージングされる。

40

【0422】

(30)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(単ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

【0423】

(31)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質およびgagを発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(単ス

50

トランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

【0424】

(32)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質およびPHを発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(単ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

【0425】

(33)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質およびgag/PHを発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(単ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

【0426】

(34)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

【0427】

(35)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質およびgagを発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

【0428】

(36)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質およびPHを発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

【0429】

(37)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質およびgag/PHを発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

【0430】

(38)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質と、カーゴ中の特定の配列に結合するジンクフィンガータンパク質(ZFP)へ融合されたgagと、を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

【0431】

(39)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質と、カーゴ中の特定の配列に結合するジンクフィンガータンパク質(ZFP)へ融合されたPHと、を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

【0432】

(40)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質と、カーゴ中の特定の配列に結合するジンクフィンガータンパク質(ZFP)へ融合されたgag/PHと、を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

10

20

30

40

50

【0433】

(41)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質およびgagと、A/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下においてDmrAまたはDmrCへ融合されたカーゴ中の特定の配列に結合するジンクフィンガータンパク質(ZFP)と、を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

【0434】

(42)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質およびPHと、A/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下においてDmrAまたはDmrCへ融合されたカーゴ中の特定の配列に結合するジンクフィンガータンパク質(ZFP)と、を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

10

【0435】

(43)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質およびgag/PHと、A/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下においてDmrAまたはDmrCへ融合されたカーゴ中の特定の配列に結合するジンクフィンガータンパク質(ZFP)と、を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。

20

【0436】

(44)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質と、カーゴ中の特定の配列に結合するジンクフィンガータンパク質(ZFP)へ融合されたgagと、を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(Cas9 RNP-ZFP 融合により結合された二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。あるいは、Cas9 RNP-ZFP融合物は、生産細胞によって発現れせることができ、粒子は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されることができる。

30

【0437】

(45)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質と、カーゴ中の特定の配列に結合するジンクフィンガータンパク質(ZFP)へ融合されたPHと、を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(Cas9 RNP-ZFP 融合により結合された二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。あるいは、Cas9 RNP-ZFP融合物は、生産細胞によって発現れせることができ、粒子は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されることができる。

40

【0438】

(46)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質と、カーゴ中の特定の配列に結合するジンクフィンガータンパク質(ZFP)へ融合されたgag/PHと、を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(Cas9 RNP-ZFP 融合により結合された二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。あるいは、Cas9 RNP-ZFP融合物は、生産細胞によって発現れせることができ、粒子は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されることができる。

【0439】

(47)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、A

50

/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下においてカーゴ中の特定の配列に結合するDmrAまたはDmrCへ融合されたジンクフィンガータンパク質(ZFP)へ融合された、エンベロープタンパク質およびgagを発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(Cas9 RNP-ZFP融合により結合された二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。あるいは、Cas9 RNP-ZFP融合物は、生産細胞によって発現れせることができ、粒子は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されることができる。

【0440】

(48)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、A/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下においてカーゴ中の特定の配列に結合するDmrAまたはDmrCへ融合されたジンクフィンガータンパク質(ZFP)へ融合された、エンベロープタンパク質およびPHを発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(Cas9 RNP-ZFP融合により結合された二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。あるいは、Cas9 RNP-ZFP融合物は、生産細胞によって発現れせることができ、粒子は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されることができる。

10

【0441】

(49)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、A/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下においてカーゴ中の特定の配列に結合するDmrAまたはDmrCへ融合されたジンクフィンガータンパク質(ZFP)へ融合された、エンベロープタンパク質およびgag/PHを発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(Cas9 RNP-ZFP融合により結合された二重ストランドDNA)は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって粒子の内側にパッケージングされることができる。あるいは、Cas9 RNP-ZFP融合物は、生産細胞によって発現れせることができ、粒子は、エレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷されることができる。

20

【0442】

(50)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(RNA)は、カーゴを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

30

【0443】

(51)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(RNA)は、カーゴおよびgagを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

40

【0444】

(52)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(RNA)は、カーゴおよびPHを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0445】

(53)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(RNA)は、カーゴおよびgag/PHを発現する生産細胞、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に

50

記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子のいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0446】

(54)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(MS2ステムループ(複数可)を有するRNA)は、MS2へ融合されたカーゴおよびgagを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0447】

(55)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(MS2ステムループ(複数可)を有するRNA)は、MS2へ融合されたカーゴおよびPHを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0448】

(56)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(MS2ステムループ(複数可)を有するRNA)は、MS2へ融合されたカーゴおよびgag/PHを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0449】

(57)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(MS2ステムループ(複数可)を有するRNA)は、A/Cヘテロ二量体化剤の存在下において、カーゴおよびgagならびにDmrAまたはDmrCへ融合されたMS2を発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0450】

(58)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(MS2ステムループ(複数可)を有するRNA)は、A/Cヘテロ二量体化剤の存在下において、カーゴおよびPHならびにDmrAまたはDmrCへ融合されたMS2を発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0451】

(59)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(MS2ステムループ(複数可)を有するRNA)は、A/Cヘテロ二量体化剤の存在下において、カーゴおよびgag/PHならびにDmrAまたはDmrCへ融合されたMS2を発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0452】

(60)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(RBPステムループ(複数可)を有するRNA)は、別のRBPへ融合されたRBPおよびgagへ融合されたカーゴを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側

10

20

30

40

50

にパッケージングされる。

【0453】

(61)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(RBPステムループ(複数可)を有するRNA)は、別のRBPへ融合されたRBPおよびPHへ融合されたカーゴを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0454】

(62)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(RBPステムループ(複数可)を有するRNA)は、別のRBPへ融合されたRBPおよびgag/PHへ融合されたカーゴを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0455】

(63)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(RBPステムループ(複数可)を有するRNA)は、A/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下において、RBPおよびgagへ融合されたカーゴならびにDmrAまたはDmrCへ融合された別のRBPを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0456】

(64)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(RBPステムループ(複数可)を有するRNA)は、A/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下において、RBPおよびPHへ融合されたカーゴならびにDmrAまたはDmrCへ融合された別のRBPを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0457】

(65)送達ビヒクル(一例として、VLP、一例として、heVLPまたはヒト化VLP)は、エンベロープタンパク質を発現する生産細胞によって作製される。カーゴ(RBPステムループ(複数可)を有するRNA)は、A/Cヘテロ二量体化剤分子の存在下において、RBPおよびgag/PHへ融合されたカーゴならびにDmrAまたはDmrCへ融合された別のRBPを発現する生産細胞によって、またはエレクトロポレーションなどの本明細書に記載される様々な粒子負荷方法によって負荷される粒子によってのいずれかによって、粒子の内側にパッケージングされる。

【0458】

システム

複数の側面において、本開示の送達ビヒクルの1以上の構成要素をコードする核酸分子がまた、本明細書において提供される。実例としては、融合タンパク質をコードする核酸分子が提供される。細胞融合タンパク質をコードする核酸分子もまた提供される。複数の側面において、本開示の送達ビヒクルの1以上の構成要素をコードする核酸分子を包含する組成物またはシステムが、本明細書において提供される。組成物またはシステムは、実例としては、組成物またはシステム中の核酸分子を生産細胞へとトランスフェクトまたは別様に送達することによって、本開示の送達ビヒクルを生産するために使用されることができる。核酸分子は、生産細胞内で発現されることができ、その結果、生産細胞がアセンブリされ、パッケージングされ、その後、生産細胞に送達ビヒクルを放出させる。

10

20

30

40

50

【0459】

いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルを生産するように遺伝子修飾されている生産細胞株が、本明細書において提供される。実例としては、生産細胞は、本開示の送達ビヒクルの1以上の構成要素をコードする、1以上の核酸分子を有することができる。生産細胞は、安定な細胞株であることができ、または一時的に遺伝子修飾されることができる。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルが生産される生産細胞を含むシステムが、本明細書において提供される。いくつかの場合において、システムは、生産された送達ビヒクルをさらに含む。いくつかの場合において、生産細胞は、好適な細胞株、一例として、VERO、WI38、MRC5、A549、HEK293、HEK293T、B-50、またはいずれかの他のHeLa細胞、HepG2、Saos-2、HuH7、チャイニーズハムスター卵巣(CH O)細胞、およびHT1080細胞株などの、ヒト細胞株である。

10

【0460】

いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルは、70%を超える遺伝子編集効率を促進する。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルは、従来のVLP(一例として、Mangeot, P. E. et al. Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. Nat. Commun. 10, 45 (2019)に記載されているVLP)と比較した場合、塩基編集効率の8倍の増加を含む遺伝子編集効率を促進する。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルは、形質導入された標的細胞において低減した免疫原性を呈する。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルは、ゲノム編集システムを標的細胞へと送達する場合、標的細胞において低減されたオフターゲットゲノム編集を生じる。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルは、Cas非依存性オフターゲット編集の100倍超の低減をもたらす。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルは、少なくとも10倍、例を挙げるなら12~900倍などの、より低いCas依存性オフターゲット編集をもたらす。

20

【0461】

医薬組成物および処置方法

本明細書において提供される送達ビヒクルは、様々な分野および方法において用途を見出すことができる。いくつかの場合において、本開示の送達ビヒクルは、治療用ポリペプチド、治療用核酸分子、または治療用リボ核タンパク質複合体などの1以上の治療用カーゴを、細胞へ送達するために使用されることができる。

30

【0462】

いくつかの場合において、送達ビヒクルが送達される標的細胞は、in vitro細胞、ex vivo細胞、またはin vivo細胞である。本開示の送達ビヒクルは、動物細胞、植物細胞、細菌細胞、藻類細胞、または真菌細胞などの種々の細胞型への、カーゴの送達に適用可能であることができる。

【0463】

いくつかの場合において、標的細胞は、動物細胞、例を挙げるなら、無脊椎動物(一例として、ショウジョウバエ、刺胞動物、棘皮動物、線形動物)、脊椎動物(一例として、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物)、哺乳動物(一例として、有蹄動物(一例として、ブタ、雌ウシ、ヤギ、ヒツジ、ラクダ);げっ歯類(一例として、ラット、マウス);非ヒト霊長類;ヒト;ネコ科(一例として、ネコ);イヌ科(一例として、イヌ);等)、および同様のものに由来する細胞、またはこれらの中に存在する細胞などを包含する。いくつかの態様において、標的細胞は、水産養殖動物(魚、カニ、エビ、カキ等)、哺乳動物、一例として、ペットもしくは動物園動物(ネコ、イヌ、トカゲ、鳥類、ライオン、トラ、およびクマ等)、家畜もしくは作業動物(ウマ、雌ウシ、ブタ、ニワトリ等)、またはヒトからの細胞である。いくつかの場合において、標的細胞は、培養細胞、初代細胞もしくは細胞株、幹細胞、前駆細胞、分化細胞、生殖細胞、がん細胞(一例として、腫瘍原性、転移性)、非腫瘍原性細胞(正常細胞)、胎児細胞、胚細胞、成体細胞、有糸分裂細胞、非有糸分裂細胞、またはこれらのいずれかの組合せを含む。

40

【0464】

50

いくつかの場合において、標的細胞は、がん細胞を包含し、本開示の送達ビヒクルによって送達されるカーゴは、腫瘍退縮をもたらすことができる薬剤(一例として、送達ビヒクルが入るがん細胞の細胞死)を包含する。実例としては、カーゴは、腫瘍退縮性ポリペプチド、一例として、がん細胞を特異的に死滅させることができるポリペプチドを包含することができる。追加的または代替的に、カーゴは、腫瘍退縮性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを包含することができる。いくつかの場合において、送達ビヒクル(一例として、VLP、heVLP、またはヒト化VLP)は、腫瘍退縮をもたらすことができる、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、もしくは小分子薬剤、またはこれらのいずれかの組合せを送達する。いくつかの場合において、送達ビヒクルは、細胞融合タンパク質でシュードタイプ化されている、またはがん細胞に対する向性を媒介する1以上の標的化部分を運搬する。

10

【0465】

いくつかの態様において、標的細胞は、器官、組織、または生物からのものである。標的細胞は、本明細書に開示される方法で使用する前に、一例として、外科的に、静脈穿刺等によって切り取られて、対象から除去されることができる。標的細胞は、細胞培養物からのものであることができる。

【0466】

本開示の送達ビヒクルは、種々の異なる細胞型、例を挙げるなら、幹細胞(一例として、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞);生殖細胞(一例として、卵母細胞、精子、卵原細胞、精原細胞、等);体細胞、一例として、線維芽細胞、オリゴデンドロサイト、グリア細胞、造血細胞、ニューロン、筋細胞、骨細胞、肝細胞、膵臓細胞、免疫細胞、上皮細胞、または内皮細胞などであるが、これらに限定されないものへと、カーゴを送達するために適用可能であることができる。いくつかの場合において、免疫細胞は、T細胞、B細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、またはマクロファージである。いくつかの場合において、免疫細胞は、細胞傷害性T細胞である。いくつかの場合において、免疫細胞は、ヘルパーT細胞である。いくつかの場合において、免疫細胞は、調節性T細胞(Treg)である。標的細胞の他の非限定的な例は、ヒト胚性幹細胞、胎児心筋細胞、筋線維芽細胞、間葉系幹細胞、心筋細胞、脂肪細胞、全能性細胞、多能性細胞、血液幹細胞、筋芽細胞、成体幹細胞、骨髄細胞、間葉系細胞、胚性幹細胞、実質細胞、上皮細胞、内皮細胞、中皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、外来性細胞、内在性細胞、幹細胞、造血幹細胞、骨髄由来前駆細胞、心筋細胞、骨格細胞(skeletal cells)、胎児細胞、未分化細胞、多能性前駆細胞、単能性前駆細胞、単球、心筋芽細胞、骨格筋芽細胞、マクロファージ、毛細血管内皮細胞、異種間細胞、同種異系細胞、および出生後幹細胞を包含する。標的細胞は、分化した組織に存在するが、しかし、自己再生の特性および複数の細胞型を生じさせる能力を保持する、成体幹細胞であることができる。いくつかの場合において、標的細胞は、体性幹細胞、例を挙げるなら、筋幹細胞;造血幹細胞;上皮幹細胞;神経幹細胞;間葉系幹細胞;乳房幹細胞;腸管幹細胞;中胚葉性幹細胞;内皮幹細胞;嗅覚幹細胞;神経堤幹細胞;および、同様のものなどである。

20

30

【0467】

いくつかの場合において、標的細胞は、植物細胞である。例えば、標的細胞は、主要な農作物、一例として、大麦、豆(乾燥食用)、キャノーラ、トウモロコシ、ワタ(ピマ種)、ワタ(アップランド種)、亜麻仁、乾草(アルファルファ種)、乾草(非アルファルファ種)、カラスムギ、ピーナッツ、イネ、ソルガム、ダイズ、サトウダイコン、サトウキビ、ヒマワリ(油)、ヒマワリ(非油)、サツマイモ、タバコ(バーレー種)、タバコ(黄色種)、トマト、コムギ(デュラム種)、コムギ(春)、コムギ(冬)、および同様のものの細胞であることができる。別の例として、標的細胞は、一例として、アルファルファスプラウト、アロエの葉、クズウコン、オモダカ、チョウセンアザミ、アスパラガス、タケノコ、バナナの花、マメモヤシ、マメ、ビートの頂部(beet tops)、ビート、ゴーヤ、チンゲンサイ、ブロッコリー、ブロッコリーラブ(broccoli rabe)(ラピニ)、芽キャベツ、キャベツ、キャベツスプラウト、サボテンの葉(ノパル)、カラバサ(calabaza)、カルドン(cardoo

40

50

ns)、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハヤトウリ、チョロギ(クロン(crosnes))、白菜、芹菜、ニラ、サイシン、シュンギク(トンハオ(tung ho))、カラードグリーン(collard greens)、トウモロコシ茎、スイートコーン、キュウリ、ダイコン、タンポポの葉(dandelion green)、タロイモ、ダウ・ミュー(dau mue)(トウミョウ(pea tips))、ドンカ(donqua)(冬メロン)、ナス、エンダイブ(endive)、キクヂシャ(escarole)、フィドルヘッドシダ(fiddle head ferns)、ウロコナズナ(field cress)、フリゼ、芥菜(カラシナ)、ガロン(gallon)、ガラシ(サイアム、タイジンジャー)、ニンニク、ショウガの根、ゴボウ、青野菜、ハノーバーサラダ野菜(hanover salad greens)、ウアウソントレ(huauzontle)、クワイモ、ヒカマ、ケールグリーン、コールラビ、シロザ(キレット(quilete))、レタス(ビブ種)、レタス(ボストン種)、レタス(ボストンレッド種(boston red))、レタス(緑葉)、レタス(アイスバーグ種)、レタス(ロラロッサ種)、レタス(オークリーフ(緑色)種)、レタス(オークリーフ(赤色)種)、レタス(加工品)、レタス(赤葉)、レタス(ロメイン種)、レタス(ルビーロメイン(ruby romaine)種)、レタス(ロシアレッドマスタード)、リンコック(linkok)、ロボック(lo bok)、ロングビーン(long beans)、レンコン、マーシュ、マゲイ(アガベ)葉、マランガ、メスキュランミックス(mesculin mix)、ミズナ、モーブ(moap)(ヘチマ(smooth luffa))、モー(moo)、モクア(moqua)(ファジースクワッシュ(fuzzy squash))、マッシュルーム、マスタード、ナガイモ、オクラ、クウシンサイ、タマネギの葉(onions green)、ウポ(opo)(ロングスクワッシュ(long squash))、観賞用コーン(ornamental corn)、観賞用ヒョウタン(ornamental gourds)、パセリ、パースニップ、エンドウマメ、コショウ(ベル型)、コショウ、カボチャ、ラディッキオ、カイワレダイコン、ラディッシュ、セイヨウアブラナ葉(rape greens)、セイヨウアブラナ葉(rape greens)、ルバーブ、ロメイン(ベビーレッド(baby red))、ルタバガ、サリコニア(シービーン(sea bean))、シンカ(sinqua)(トカドヘチマ(angled/ridged luffa))、ハウレンソウ、スクワッシュ、ストローベイル、サトウキビ、サツマイモ、スイスチャード、タマリンド、タロイモ、タロイモ葉、タロイモ根、ターサイ、テペガジェ(tepeguaje)(ガジェ(guaje))、ティンドラ(tindora)、トマティヨ(tomatillos)、トマト、トマト(チェリートマト)、トマト(グレープ型)、トマト(プラム型)、ターメリック、ターニップトップの葉(turnip tops greens)、ターニップ、シログワイ、ヤンピ(yampi)、ヤムイモ(ネームズ(names))、油菜(yu cho y)、ユカイモ(キャッサバ)、および同様のものを包含するが、これらに限定されない、野菜作物の細胞である。

10

20

30

40

50

【0468】

いくつかの場合において、本開示の組成物および方法が適用可能な標的細胞は、節足動物細胞である。例えば、細胞は、一例として、Chelicerata、Myriapodia、Hexipodia、Arachnida、Insecta、Archaeognatha、Thysanura、Palaeoptera、Ephemeroptera、Odonata、Anisoptera、Zygoptera、Neoptera、Exopterygota、Plecoptera、Embioptera、Orthoptera、Zoraptera、Derimaptera、Dictyoptera、Notoptera、Grylloblattidae、Mantophasmatidae、Phasmatodea、Blattaria、Isoptera、Mantodea、Parapneuroptera、Psocoptera、Thysanoptera、Phthiraptera、Hemiptera、Endopterygota、Holometabola、Hymenoptera、Coleoptera、Strepsiptera、Raphidioptera、Megalopectera、Neuroptera、Mecoptera、Siphonaptera、Diptera、Trichoptera、またはLepidopteraの亜目、科、亜科、群、亜群、または種の細胞であることができる。

【0469】

いくつかの場合において、本開示の組成物および方法が適用可能な標的細胞は、昆虫細胞である。例えば、いくつかの場合において、細胞は、蚊、バッタ、ナンキンムシ、ハエ、ノミ、ハチ、スズメバチ、アリ、シラミ、ガ、または甲虫の細胞である。

【0470】

医薬組成物

一側面において、本開示のいくつかの態様にかかる送達ビヒクルを含む医薬組成物が、

本明細書において提供される。実例としては、本明細書において提供される医薬組成物は、少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤と共に製剤化された、いくつかの態様にかかる少なくとも1つの送達ビヒクルを含むことができる。

【0471】

実例としては、本明細書に開示される送達ビヒクルは、注射、一例として、皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射、またはくも膜下腔内注射による非経口投与のための少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤と共に、製剤化されることができる。いくつかの場合において、医薬組成物は、ボラス注射または連続注入によって注射される。医薬組成物の投与方法は、経口投与、直腸投与、非経口、静脈内投与、硝子体内投与、筋肉内投与、吸入、鼻腔内投与、局所投与、経皮投与、点眼投与、または耳投与を包含するが、これらに限定されない。

10

【0472】

医薬組成物は、単位剤形、一例として、アンプルまたは複数用量容器で提示されることができる。医薬組成物は、油性または水性のビヒクル中の懸濁液、溶液、またはエマルジョンなどの形態を取ることができ、かつ懸濁化剤、安定化剤、および/または分散剤などの配合剤を含有することができる。医薬組成物の液体調製物は、懸濁化剤(一例として、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素化食用脂);乳化剤(一例として、レシチンまたはアカシア);非水性ビヒクル(一例として、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコール、または分画された野菜油);および保存料(一例として、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸)などの薬学的に許容される添加剤を用いて、従来手段によって調製されることができる。調製物はまた、pH調整および/またはオスモル濃度調整のための緩衝塩を含有することができる。あるいは、医薬組成物は、好適なビヒクル、一例として、滅菌パイロジェンフリー水で構成するための粉末形態であることができる。

20

【0473】

本明細書に開示される医薬組成物において使用されることができる薬学的に許容される賦形剤は、いくつかの場合において、あらゆる薬学的に許容される材料、組成物またはビヒクル、実例としては、固体または液体充填剤、希釈剤、賦形剤、担体、溶媒またはカプセル化材料を含み、これらは、一例として、ある器官または身体の一部から、別の器官または身体の一部(一例として、血液から目的のあらゆる組織および/または器官および/または身体部分から)への、治療用送達小胞の懸濁化、その活性の維持、またはその運搬または輸送に関与することができる。

30

【0474】

薬学的に許容される賦形剤は、非担体賦形剤であることができる。非担体賦形剤は、本明細書に記載される医薬組成物のためのビヒクルまたは培地として働く。非担体賦形剤は、本明細書に記載される医薬組成物のためのビヒクルまたは培地として働く。非担体賦形剤の非限定的な例は、溶媒、水性溶媒、非水性溶媒、分散媒、希釈剤、分散液、懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤、乳化剤、保存料、ポリマー、ペプチド、タンパク質、細胞、ヒアルロニダーゼ、分散剤、造粒剤、崩壊剤、結合剤、緩衝剤(一例として、リン酸緩衝食塩水(PBS))、潤滑剤、油、およびそれらの混合物を包含する。非担体賦形剤は、米国食品医薬品局(FDA)によって承認され、細胞透過効果を呈しない不活性成分データベースに列挙されている、不活性成分のいずれか1つであることができる。医薬組成物は、任意に、1以上の追加的な活性物質、一例として、治療的および/または予防的に活性な物質を含んでもよい。本発明の医薬組成物は、滅菌および/またはパイロジェンフリーであってもよい。医薬剤の製剤および/または製造における一般的な考慮事項は、例えば、Remington:The Science and Practice of Pharmacy 21st ed.,Lippincott Williams&Wilkins,2005(参照により本明細書に組み込まれる)に見られてもよい。

40

【0475】

本明細書に記載される医薬組成物は、治療および獣医学用途に使用されることができる。いくつかの態様において、本明細書において提供される医薬組成物は、対象への投与に

50

好適であり、ここで、対象は、非ヒト動物であり、例えば、獣医学的使用に好適である。組成物を様々な動物への投与に好適なものにするためのヒトへの投与に好適な医薬組成物の修飾は十分に理解されており、当業者の獣医学薬理学者は、単に通常の、もしあれば、実験でそのような修飾を設計および/または実施することができる。医薬組成物の投与が企図される対象は、あらゆる動物、例を挙げるなら、ヒトおよび/もしくは他の霊長類など;商業的に関連する哺乳動物を含む哺乳動物、一例として、ペットおよび家畜動物、例を挙げるなら、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ、マウス、および/もしくはラットなど;ならびに/またはオウム、家禽、鶏、アヒル、ガチョウ、鶏または鶏および/または、商業的に関連する鳥類を包含する鳥類、例を挙げるなら、オウム、家禽、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、メンドリもしくはオンドリ、および/もしくはシチメンチョウなど;動物園の動物、一例として、ネコ科;非哺乳動物、一例として、爬虫類、魚類、両生類、等を包含するが、これらに限定されない。

10

【0476】

本明細書に記載される医薬組成物の製剤は、薬理学の分野で公知のまたは今後開発されるあらゆる方法によって調製されてもよい。一般に、そのような調製方法は、活性成分を、賦形剤および/または1以上の他の副成分へと会合させ、次いで、必要および/または望ましい場合、産物を分割、成形、および/またはパッケージングする工程を包含する。

【0477】

いくつかの態様において、薬学的に許容される担体または賦形剤は、糖(一例として、スクロース、ラクトース、マンニトール、マルトース、ソルビトール、もしくはフルクトース)、中性塩(一例として、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸カリウム、炭酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、リン酸カリウム(potassium acid phosphate)、もしくは酢酸ナトリウム)、酸性構成要素(一例として、フマル酸、マレイン酸、アジピン酸、クエン酸、もしくはアスコルビン酸)、アルカリ性構成要素(一例として、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)、メグルミン、ナトリウムもしくはカリウムの三塩基性リン酸塩または二塩基性リン酸塩)、またはアミノ酸(一例として、グリシンまたはアルギニン)である。

20

【0478】

いくつかの態様において、医薬組成物は、希釈剤(一例として、非経口的に許容される希釈剤)を含むことができる。希釈剤は、液体希釈剤または固体希釈剤であってもよい。いくつかの態様において、希釈剤は、RNA可溶化剤、緩衝液、または等張剤であってもよい。RNA可溶化剤の例は、水、エタノール、メタノール、アセトン、ホルムアミド、2-プロパノールを包含する。緩衝剤の例は、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、Bis-Tris、2-[(2-アミノ-2-オキソエチル)-(カルボキシメチルメチル)アミノ]酢酸(AD A)、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、ピペラジン-N,N'-bis(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、2-[[1,3-ジヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-2-イル]アミノ]エタンスルホン酸(TES)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)、Tris、トリシン、Gly-Gly、ピシン、またはリン酸塩を包含する。等張剤の例は、グリセリン、マンニトール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、トレハロース、またはスクロースを包含する。

30

40

【0479】

処置の方法

複数の側面において、本開示のいくつかの態様にかかる送達ビヒクルまたは医薬組成物を投与することによって、対象を処置する方法もまた。本明細書において提供される。

【0480】

本開示の方法における対象は、動物であることができる。いくつかの態様において、対象は、動物細胞である。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、ヒトである。いくつかの態様において、対象は、水産養殖動物(魚、カニ、エビ、カキ等)、哺乳動物、一例として、ペットもしくは動物園動物(ネコ、イ

50

ヌ、トカゲ、鳥類(一例として、オウム)、ライオン、トラ、およびクマ等)、家畜または作業動物(ウマ、ウシ(一例として、乳牛および肉牛)ブタ、ニワトリ、シチメンチョウ、メンドリもしくはオンドリ、ヤギ、ヒツジ、等)、またはヒトである。いくつかの態様において、本明細書に開示される標的細胞は、本開示の方法が適用可能な対象にある。

【0481】

本明細書に記載される方法は、対象を処置するための治療的または獣医学的方法であることができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、実例としては、対象の1以上の細胞における遺伝子突然変異に起因する、機能的でない、機能性に乏しい、または発現が乏しいタンパク質もしくは遺伝子産物に起因する疾患を、処置するために使用される。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、遺伝性疾患(一例として、突然変異、置換、欠失、拡大、または組換え)、一遺伝子性疾患、遺伝性代謝疾患、がん、神経変性疾患、心血管疾患、肺疾患、腎疾患、肝臓疾患、遺伝性疾患、血管疾患、眼疾患、筋骨格疾患、リンパ性疾患、聴覚および内耳疾患、代謝性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、または感染性疾患を処置するために使用される。いくつかの場合において、網膜下注射用に製剤化された医薬組成物を投与することによって、網膜疾患、一例として、レーバー先天性黒内障を処置するための医薬組成物および方法が、本明細書において提供される。

10

【0482】

例

以下の例は、本開示のいくつかの態様をさらに説明するために提供されるが、しかし、本開示の範囲を限定することを意図するものではない;それらの例示的な性質によって、当業者に知られている他の手順、方法論、または技術が代替的に使用されてもよいことが理解されよう。

20

【0483】

例1:材料および方法

この例は、以下の例2および例3に記載される実験において使用された材料および方法を記載する。

【0484】

細胞培養条件

HEK293T細胞(ATCC;CRL-3216)、Gesicle Producer 293T細胞(タカラ;632617)、3T3細胞(ATCC;CRL-1658)、およびNeuro-2a細胞(ATCC;CCL-131)は、10%(v/v)ウシ胎児血清を補充した、DMEM+GlutaMAX(Life Technologies)中で維持された。初代ヒト線維芽細胞および初代マウス線維芽細胞は、20%(v/v)FBS、2mM GlutaMAX(Thermo Fisher;35050061)、1%ペニシリンおよびストレプトマイシン(Thermo Fisher;15070063)、1×非必須アミノ酸(Thermo Fisher;11140050)、1×抗酸化サプリメント(Sigma Aldrich;A1345)、10ng/mLのマウス顎下腺からの上皮成長因子(Sigma Aldrich;E4127)、ならびに0.5ng/mL線維芽細胞成長因子(Sigma Aldrich;F3133)を含有する、MEMアルファ培地(Thermo Fisher;12571063)中で維持された。細胞は、5%二酸化炭素と共に37°Cで培養され、MycoAlert(Lonza Biologicals)で試験されることによってマイコプラズマについて陰性であることを確認された。

30

40

【0485】

初代ヒトT細胞の単離

初代ヒトT細胞は、以前に記載されたように単離された(Chen et al.,2021)。バフィーコートは、Memorial Blood Centers(St.Paul, MN)から入手され、末梢血単核細胞は、SepMate tubes(STEMCELL Technologies;85450)を用いて単離された。EasySep Human T-cell Isolation Kitは、T細胞を豊富にし、次いで、長期貯蔵のために凍結するために使用された。

【0486】

クローニング

この研究で使用された全てのプラスミドは、以前に記載されたように(Doman et al.,

50

2020)、USERクローニングまたはKLDクローニングのいずれかを用いてクローニングされた。DNAは、PhusionU Green Multiplex PCR Master Mix(Thermo Fisher Scientific)を用いてPCR増幅された。化学的にコンピテントなMach1(Thermo Fisher Scientific)E.coliが、プラスミド増殖に使用された。

【0487】

BE-eVLPの生産および精製

BE-eVLPは、Gesicle Producer 293T細胞の一過性トランスフェクションによって生産された。ジェシクル細胞が、T-75フラスコ(Corning)にフラスコあたり 5×10^6 細胞の密度で播種された。20~24時間後、細胞は、製造業者のプロトコルに従って、jetPRIMEトランスフェクション試薬(Polyplus)を用いてトランスフェクトされた。v1~v3のBE-eVLPを生産するために、VSV-G(400ng)、MLVgag-pro-pol(2,800ng)、MLVgag-ABE8e(1,700ng)、およびsgRNA(4,400ng)を発現するプラスミドの混合物が、T-75フラスコごとに同時トランスフェクトされた。MLVgag-ABE8e:MLVgag-pro-pol化学量論最適化のために、これらの2つの構成要素のプラスミドDNAの総量が、4,500ngに固定され、各々の相対量が変化された。v4 BE-eVLPを生産するために、VSV-G(400ng)、MMLVgag-pro-pol(3,375ng)、MMLVgag-3xNES-ABE8e(1,125ng)、およびsgRNA(4,400ng)を発現するプラスミドの混合物が、T-75フラスコごとに同時トランスフェクトされた。BE-eVLP構築物タンパク質配列が表3に提供される。

【0488】

トランスフェクションの40~48時間後、生産細胞上清は、採取され、500gで5分間にわたり遠心分離されて、細胞残屑が除去された。清澄化されたeVLP含有上清が、0.45 μ mのPVDFフィルタを通じて濾過された。細胞培養で使用されたBE-eVLPについては、特に明記しない限り、濾過した上清は、PEG-it Virus Precipitation Solution(System Biosciences;LV825A-1)を製造業者のプロトコルに従って用いて100倍濃縮された。マウスへと注射されたBE-eVLPについて、濾過した上清は、PBS中20%(w/v)スクロースのクッションを用いた超遠心分離によって、1000~3000倍濃縮された。超遠心分離は、Optima XPN Ultracentrifuge(Beckman Coulter)のSW28ロータまたはSorvall WX+Ultracentrifuge(Thermo Fisher Scientific)のAH-629ロータのいずれかを用いて、26,000rpmで2時間(4℃)にわたり実施した。超遠心分離の後、BE-eVLPペレットは、冷たいPBS(pH7.4)中に再懸濁され、1,000gで5分間にわたり遠心分離されて、残屑が除去された。BE-eVLPは、-1℃/分の速度で凍結され、-80℃で貯蔵された。BE-VLPは使用の直前に氷上で解凍された。

【0489】

細胞培養およびゲノムDNA単離におけるBE-eVLP形質導入

細胞は、48ウェルプレート(Corning)に、ウェルあたり30,000~40,000細胞の密度で形質導入のためにプレーティングされた。20~24時間後、BE-eVLPは、各ウェルの培養培地に直接添加された。形質導入の48~72時間後、細胞ゲノムDNAは、以前に報告された(Doman et al.,2020)ように単離された。簡潔には、細胞は、PBSで1回洗浄され、150 μ Lの溶解緩衝液(10mM Tris-HCl pH8.0、0.05%SDS、25 μ g mL⁻¹プロテイナーゼK(Thermo Fisher Scientific))中において、37℃で1時間にわたり溶解され、続いて、80℃で30分間にわたり熱不活性化された。

【0490】

ゲノムDNAのハイスループット配列決定

ゲノムDNAは上記のように単離された。ゲノムDNA単離の後、1 μ Lの単離DNA(1~10ng)が、最初の2つのPCR反応のためのインプットとして使用された。

【0491】

ゲノム遺伝子座は、PhusionUポリメラーゼ(Thermo Fisher Scientific)を用いてPCR1で増幅された。ゲノム遺伝子座のPCR1プライマーが表3に列挙される。PCR1は、以下のように実施された:95℃で3分間;95℃で15秒間、61℃で20秒間、および72℃で30秒間の30~35サイクル;72℃で1分間。PCR1産物は1%アガロースゲルで確認さ

10

20

30

40

50

れた。1 μ LのPCR1は、Illuminaバーコードを導入するために、PCR2のインプットとして使用された。PCR2は、Phusion HS II kit(Life Technologies)を用いて9サイクルの増幅のために行われた。PCR2の後、試料は、プールされ、Qiaquick Gel Extraction Kit(Qiagen)を用いて1%アガロースゲルでゲル精製された。ライブラリ濃度は、Qubit High-Sensitivity Assay Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて定量された。試料は、Illumina MiSeq 300 v2 Kit(Illumina)を用いて、Illumina MiSeq instrument(ペア・エンド・リード、リード1:200~280サイクル、リード2:0サイクル)で配列決定された。

【0492】

ハイスループット配列決定データ分析

配列決定リードは、MiSeq Reporterソフトウェア(Illumina)を用いて逆多重化され、前述されたように(Doman et al., 2020)、CRISPResso2(Clement et al., 2019)を用いて分析された。バッチ分析モード(分析された各ユニークなアンプリコンおよびsgRNAの組合せに対して1バッチ)が全ての場合に使用された。リードは、最小平均品質スコア(Q>30)によって分析前に、フィルタリングされた。以下の定量化ウィンドウパラメータが使用された:-w 20-wc-10。塩基編集効率は、特定の位置に所与の塩基変換を含有する、配列決定リードのパーセンテージとして報告される。Prism 9(GraphPad)が、ドットプロットおよびバープロットを産生するために使用された。

【0493】

BE-eVLPタンパク質含有量の免疫プロット分析

BE-eVLPは、95℃で15分間にわたり加熱することによって、Laemmli試料緩衝液(50mM Tris-HCl pH7.0、2%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、10%(v/v)グリセロール、2mMジチオスレイトール(DTT))に溶解された。溶解したBE-eVLPは、乾燥ニトロセルロース膜(Thermo Fisher Scientific)にスポットされ、30分間乾燥された。膜は、ブロッキング緩衝液:TBST(150mM NaCl、0.5%Tween-20、および50mM Tris-HCl)中の1%ウシ血清アルブミン(BSA)で揺動させながら、室温で1時間ブロッキングされた。ブロッキング後、膜は、ブロッキング緩衝液で希釈される以下の一次抗体:マウス抗Cas9(Thermo Fisher;MA5-23519、1:1000希釈)、マウス抗MLV p30(Abcam;ab130757、1:1500希釈)、またはマウス抗VSV-G(Sigma Aldrich;V5507、1:50000万希釈)のうち1つと、揺動させながら4℃で一晩インキュベートされた。膜は、1×TBST(Tris緩衝化生理食塩水+0.5%Tween-20)により10分間にわたって各々室温で3回洗浄され、次いで、ヤギ抗マウス抗体(LI-COR IRDye 680RD;926-68070、ブロッキング緩衝液での1:10000希釈)と、1時間にわたり室温で揺動しながらインキュベートされた。膜は、以前のように洗浄され、Odyssey Imaging System(LI-COR)を用いて画像化された。

【0494】

BE-eVLPタンパク質含有量のウェスタンブロット分析

BE-eVLPは上記のように溶解された。タンパク質抽出物は、NuPAGE Tris-Acetate SDS泳動緩衝液(Thermo Fisher Scientific)中のNuPAGE 3~8%Tris-Acetate gel(Thermo Fisher Scientific)で、45分間にわたり150Vの電気泳動によって分離された。PVDF膜への転移は、iBlot 2 Gel Transfer Device(Thermo Fisher Scientific)を用いて20Vで7分間にわたり実施された。膜は、1時間にわたり室温で、ブロッキング緩衝液:TBST(150mM NaCl、0.5%Tween-20、および50mM Tris-HCl)中の1%ウシ血清アルブミン(BSA)で揺動させながら、ブロッキングされた。ブロッキング後、膜は、マウス抗Cas9(Cell Signaling Technology;14697、1:1000希釈)と揺動させながら4℃で一晩インキュベートされた。膜は、1×TBSTにより10分間にわたって各々室温で3回洗浄され、次いで、ヤギ抗マウス抗体(LI-COR IRDye 680RD;926-68070、ブロッキング緩衝液での1:10000希釈)と、1時間にわたり室温で揺動しながらインキュベートされた。切断されたABEおよび完全長gag-ABEの相対量は、ImageJを用いたデンシトメトリーによって定量され、全(切断+完全長)ABEに対する切断されたAB

10

20

30

40

50

Eの分画が計算された。

【0495】

生産細胞の免疫蛍光顕微鏡法

Gesicle Producer 293T細胞は、ポリ-D-リジン(PerkinElmer)でコーティングされたPhenoPlate(商標)96ウェルマイクロプレートに、ウェルあたり15,000細胞の密度で播種された。24時間後、細胞は、製造業者のプロトコルに従って、jetPRIMEトランスフェクション試薬(Polyplus)を用いて、1ngのv2.4またはv3.4のBE-eVLPプラスミド、40ngのマウスDnmt1標的sgRNAプラスミド、および40ngのpUC19プラスミドにより同時トランスフェクトされた。40時間後、32%パラホルムアルデヒド水溶液(Electron Microscopy Sciences)は、細胞培地中へと直接滴加されて、4%パラホルムアルデヒドの最終濃度になった。その後、細胞は室温で20分間にわたり固定された。固定後、細胞は、PBSで3回洗浄され、次いで、室温で30分間にわたり、1xPBST(PBS+0.1%Triton X-100)で透過処理された。次いで、細胞は、ブロッキング緩衝液(1xPBST中の3%w/v BSA)中において、30分間にわたり室温でブロッキングされた。ブロッキング後、細胞は、ブロッキング緩衝液に希釈された、マウス抗Cas9(Cell Signaling Technology;14697、1:250希釈)およびウサギ抗チューブリン(Abcam;52866、1:400希釈)と共に4℃で一晩インキュベートされた。細胞は、1xPBSTで4回洗浄され、次いで、ブロッキング緩衝液中に希釈された、ヤギ抗マウスAlexaFluor(登録商標)647コンジュゲート抗体(abcam;150115、1:500希釈)、ヤギ抗ウサギAlexaFluor(登録商標)488コンジュゲート抗体(abcam;150077、1:500希釈)、および1μM DAPIと共に、室温で1時間にわたりインキュベートされた。細胞は、1xPBSTで3回、およびPBSで2回洗浄した後、Opera Phenix High-Content Screening System(Perkin Elmer)を用いて画像化された。画像は、共焦点モードで20倍水浸対物レンズを用いて取得された。自動画像分析はHarmony software(PerkinElmer)を用いて実施された。正規化された細胞質強度は、細胞あたりのチューブリンシグナルの平均細胞質強度に対する、細胞あたりのCas9シグナルの平均細胞質強度の比を計算することによって、決定された。

10

20

【0496】

陰性染色透過型電子顕微鏡

陰性染色TEMはMITのKoch Nanotechnology Materials Core Facilityで実施された。v4 BE-eVLPは、15,000gで5分間にわたり遠心分離されて、残屑が除去された。清澄化された上清から、10μLの試料および緩衝液含有溶液は、連続炭素フィルムでコーティングされた200メッシュの銅グリッドへ添加された。試料は60秒間にわたり吸着させられ、その後、過剰な溶液がキムワイプで除去された。1%リンタンングステン酸水溶液を含有する10μLの陰性染色溶液は、TEMグリッドへ添加され、染色液は、すぐにキムワイプで拭き取られた。次いで、グリッドは、化学フード内で室温にて風乾された。次いで、グリッドは、TEMカラム内に装備されたJEOLシングル・チルト・ホルダに取り付けられた。試験片は、液体窒素で冷却された後、JEOL 2100 FEG顕微鏡を用いて200kVで、10,000~60,000倍の倍率で観察された。画像は、Gatan 2kx2k UltraScan CCDカメラを用いて撮影された。

30

40

【0497】

BE-eVLPタンパク質含有量の定量

タンパク質定量のために、BE-eVLPは、上記のようにLaemmli試料緩衝液中で溶解された。精製されたBE-eVLP中のBEタンパク質の濃度は、FastScan(商標)Cas9(S.pyogenes)ELISAキット(Cell Signaling Technology;29666C)を、製造業者のプロトコルに従って用いて定量された。組換えCas9(S.pyogenes)ヌクレアーゼタンパク質(New England Biolabs;M0386)は、定量化のための標準曲線を産生するために使用された。精製BE-eVLP中のMLV p30タンパク質の濃度は、MuLV Core Antigen ELISA kit(Cell Biolabs;VPK-156)を、製造者のプロトコルに従って用いて定量された。MLV粒子について以前に報告されたように(Renner et al.,2020)、溶液中の観察され

50

たp30の20%がVLPに関連していると仮定して、VLP関連p30タンパク質の濃度が計算された。MLV粒子について以前に報告されたように(Renner et al., 2020)、eVLPあたり1800分子のp30のコピー数を仮定することによって、eVLPあたりのBEタンパク質分子の数が計算された。同じ分析が、全ての治療適用実験についてeVLP力価を決定するために使用された。

【0498】

BE-eVLP sgRNAの抽出および定量

RNAは、QIAmp Viral RNA Mini Kit(Qiagen;52904)を、製造者のプロトコルに従って用いてBE-eVLPから抽出された。抽出されたRNAは、SuperScript(商標)III First-Strand Synthesis SuperMix(Thermo Fisher Scientific;18080400)およびsgRNA特異的DNAプライマー(表3)を、製造者のプロトコルに従って用いて逆転写された。qPCRは、SYBR緑色染料(Lonza;50512)を含む、CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad)を用いて実施された。cDNAインプット量が、MLV p30含有量に対して正規化され、eVLPあたりのsgRNA存在量が、v1 BE-VLPに対する $\log_2$ [変化倍数](DCq)として計算された。

【0499】

細胞生存率アッセイ

細胞生存率は、Promega CellTiter-Glo発光細胞生存率キット(Promega;G7570)を用いて定量された。4×10⁴細胞(HEK293TおよびNIH 3T3の場合)、および2.5×10⁴細胞(RDEBペイシエント線維芽細胞の場合)は、ウェルあたり250 μLの培地に播種された。細胞は、16~18時間にわたり接着された後、BE-eVLPで処置された。形質導入の48時間後、100 μLのCellTiter-Glo試薬は、暗所で各ウェルに添加された。細胞は室温で10分間インキュベートされ、80 μLの溶液は黒色96ウェル平底プレート(Greiner Bio-one;655096)へと移され、発光はM1000 Proマイクロプレートリーダー(Tecan)で1秒の積分時間にて測定された。Opti-MEMで処置した細胞は100%生存細胞と定義された。BE-eVLP処理ウェル中の生細胞のパーセンテージは、各処置ウェルからの発光リードをPBS処置細胞の発光に対して正規化することによって計算された。

【0500】

プラスミドのトランスフェクション

プラスミドのトランスフェクションは以前に記載されたように実施された(Doman et al., 2020)。プラスミドは、エンドトキシン除去を伴うPlasmidPlus Midi Kit(Qiagen)を用いてトランスフェクションのために調製された。HEK293T細胞は、48ウェルプレート(Corning)に、ウェルあたり40,000細胞の密度でトランスフェクションのためにプレーティングされた。20~24時間後、細胞は、製造業者のプロトコルに従って、ウェルあたり1.5 μLのLipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)を用いて、1 μgの総DNAでトランスフェクトされた。特に明記しない限り、ウェルあたり750 ngの塩基エディタプラスミドおよび250 ngのガイドRNAプラスミドは、同時トランスフェクトされた。ゲノムDNAは、上記のようにトランスフェクションの72時間後に、トランスフェクト細胞から単離された。

【0501】

HEK293T細胞におけるオフターゲットDNA塩基編集の評価

HEK293T細胞は、v4 BE-eVLPを形質導入される、または上記のようにBEコードプラスミドをトランスフェクトされた。Cas依存性オフターゲット編集を評価するために、細胞は、同じ日に1 μLのv4 BE-eVLPでトランスフェクトまたは形質導入され、両方の場合において、ゲノムDNAは処置の72時間後に単離された。オンターゲットおよびオフターゲット遺伝子座は上記のように増幅および配列決定された。直交Rループアッセイは、Cas非依存性オフターゲット編集を評価するために以前に記載されたように(Doman et al., 2020)、実施された。プラスミドトランスフェクション後のSaCas9の発現およびオフターゲットRループの形成のための時間を可能にするために、細胞は、dSaCas9および直交sgRNAコードプラスミドによるトランスフェクションの24時間後に、1 μLのP

EG濃縮v4 BE-eVLPを形質導入された。ゲノムDNAは、トランスフェクションの72時間後(形質導入の48時間後)に単離され、上記のように配列決定された。実験概略図については図11Aもまた参照されたい。

【0502】

BEコードDNAの定量

BE-eVLP調製物中のBEコードDNAの量を定量するために、v4 BE-eVLPは、上記のように溶解され、溶解物は、BE特異的プライマーを用いたqPCR反応へのインプットとして使用された(表3)。プラスミドでトランスフェクトされたHEK293T細胞に対するeVLPを形質導入されたHEK293T細胞における、BEコードDNAの量を定量するために、DNAは、上記のように細胞溶解物から単離され、BE特異的プライマーを用いたqPCR反応へのインプットとして使用された(表3)。どちらの場合も、標準曲線は、既知の濃度のBEコードプラスミド標準を用いて産生され、元の試料中に存在するBEコードDNAの量を推測するために使用された。

10

【0503】

T細胞の形質導入およびゲノムDNA調製

解凍した細胞(0日目)は、10%ABヒト血清(Valley Biomedical;HP1022)、2mg/mLのN-アセチル-システイン(Sigma Aldrich;A7250)、300IU/mLの組換えヒトIL-2(Peprotech;200-02)、および5ng/mLの組換えヒトIL-7(Peprotech;200-07)、および5ng/mLのIL-15(Peprotech;500-P15)を伴う、X-VIVOTM 15無血清造血細胞培地(Lonza;BE02-0606F)からなる基礎T細胞培地中に、24時間にわたり静置された。

20

【0504】

1日目に、50μLのT細胞培地中の50,000個の細胞は、10μg/cm²のRetroNectin(登録商標)(Clontech/タカラ;カタログ番号T100A/B)でコーティングされた96ウェルプレートにプレーティングされた。5μL(3.0×10¹⁰eVLP)の超遠心分離精製v4 BE-eVLPは、1日目に細胞に形質導入されるように使用され、2日目に、細胞は、Dynabeads(商標)Human T-Expander CD3/CD28ビーズ(Thermo Fisher;11161D)で刺激された。ビーズは、50μLの体積で、3:1のビーズ対細胞比にて添加された。3日目に、細胞は、総培地容量200μL中の5μL(3.0×10¹⁰eVLP)のv4 BE-eVLPを、2回目に形質導入された。

30

【0505】

24時間後(4日目)、細胞は、1mLの新鮮なT細胞培地に再懸濁され、48ウェルプレートのウェルに再プレーティングされた。6日目に、細胞は、採取され、ゲノムDNAは、QuickExtract(商標)DNA Extraction Solution(Lucigen;EE 09050)を用いて単離された。

【0506】

レンチウイルスベクタークローニングおよび生産

レンチウイルスベクターは、lentiCRISPRv2骨格(Addgene#135955)へのUSERクローニングを介して構築された。レンチウイルス転移ベクターは、NEB Stable Competent E.coli(New England Biolabs)中で増殖された。HEK293T/17(ATCC CRL-11268)細胞は、10%ウシ胎児血清(v/v)が補充される抗生物質フリーDMEMにおいて維持された。

40

【0507】

1日目に、5×10⁶個の細胞は、T75フラスコ中の10mLの培地にプレーティングされた。翌日、細胞は、70μLのFuGENEを伴う1,500μLのOpti-MEM中に希釈された、6μgのVSV-Gエンベローププラスミド、9μgのpsPAX2(ウイルスパッケージングタンパク質をコードするプラスミド)、および9μgの転移ベクタープラスミド(目的の遺伝子をコードするプラスミド)でトランスフェクトされた。トランスフェクションの2日後、培地は、500gで5分間にわたり遠心分離されて、0.45μmのPVDF真空フィルタを用いた濾過後に細胞残屑が除去された。レンチウイルスは、eVLP生産のために上記のように、

50

20%(w/v)スクロースクッションによる超遠心分離によってさらに濃縮された。

【0508】

AAV生産

AAV生産は、いくつかの変更を加えて前述されたように(Deverman et al., 2016; Levy et al., 2020)、実施された。HEK293T/17細胞は、150mmのディッシュ(Thermo Fisher Scientific; 157150)において、抗生物質を有しない10%ウシ胎児血清を伴うDMEMにおいて維持され、2~3日ごとに継代された。生産のための細胞は、ポリエチレンイミントランスフェクションの1日前に1:3に分割された。次いで、プレートあたり、5.7 µgのAAVゲノム、11.4 µgのpHelper(Clontech)、および22.8 µgのAAV8 rep-capプラスミドはトランスフェクトされた。トランスフェクションの翌日、培地は、5%ウシ胎児血清を伴うDMEMに交換された。トランスフェクションの3日後、細胞は、ゴムセルスクレーパ(Corning)で掻き取られ、10分間にわたり2,000gで遠心分離されることによってペレット化され、プレートあたり500 µLの高張性溶解緩衝液(40 mM Tris塩基、500 mM NaCl、2 mM MgCl₂および100 U mL⁻¹塩活性ヌクレアーゼ

10

【0509】

(ArcticZyme; 70910-202))中に再懸濁化され、37℃で1時間インキュベートされて細胞が溶解された。培地は、デカントされ、2.5 M NaCl(最終濃度: 8% PEG/500 mM NaCl)中40%ポリ(エチレングリコール)(PEG)の5×溶液と合わせられ、氷上で2時間にわたりインキュベートされてPEG沈殿が促進され、3,200gで30分間にわたり遠心分離された。上清は廃棄され、ペレットは、プレートあたり500 µLの溶解緩衝液中に再懸濁され、細胞溶解物へ添加された。粗溶解物は、4℃で一晩インキュベートされるか、または超遠心分離に直接使用されるか、のいずれかであった。

20

【0510】

細胞溶解物は、2,000gで10分間にわたり遠心分離によって清澄化され、16ゲージの5インチ使い捨て針(Air-Tite N165)を介してBeckman Quick-Sealチューブへ加えられた。不連続なイオジキサノール勾配は、層: 500 mM NaClおよび1×PBS-MK(1×PBSプラス1 mM MgCl₂、および2.5 mM KCl)中の9 mLの15%イオジキサノール、1×PBS-MK中の6 mLの25%イオジキサノール、ならびに1×PBS-MK中の各5 mLの40%および60%イオジキサノールを、順次浮遊させることによって形成された。最終濃度1 µg mL⁻¹のフェノールレッドは、同定を促進するために、15%、25%、および60%の層へ添加された。超遠心分離は、Optima XPN-100 Ultracentrifuge(Beckman Coulter)においてTi 70ロータを用いて、58,600 rpmで2時間15分間にわたり18℃で実施された。

30

【0511】

超遠心分離後、3 mLの溶液は、40~60%イオジキサノール界面から18ゲージ針を介して抜き取られ、100 kDのMWCOカラム(EMD Millipore)を用いて0.001% F-68を含有するPBSで透析された。濃縮したウイルス溶液は、0.22 µmフィルタを用いて滅菌濾過された。最終的なAAV調製物は、qPCR(AAVpro Titration Kit version 2; Clontech)を介して定量され、使用するまで4℃で貯蔵された。

【0512】

動物

全てのマウス実験は、Broad Institute、the University of California、IrvineおよびUniversity of Pennsylvaniaの施設内動物実験委員会によって承認された。P0研究のための時限妊娠C57BL/6Jマウスは、Charles River Laboratories(027)から購入された。野生型成体C57BL/6Jマウス(000664)および有色rd12マウス(005379)はJackson Laboratoryから購入された。全てのマウスは、標準的なげっ歯類の食餌および水にad libitumでアクセスされる、12時間の明暗サイクルで維持された部屋に収容された。動物は様々な実験群にランダムに割り当てられた。

【0513】

P0心室注射

50

P0心室注射は、以前に記載されたように(Levy et al.,2020)実施された。Drummond PCRピペット(5-000-1001-X10)は、Sutter P1000マイクロピペットプーラのランプ試験値で引っ張られ、キムワイブに3回通され、チップサイズを約100 μm にされた。少量のFast Greenは、BE-eVLP注射溶液に添加されて、心室標的化が評価された。注射溶液は、包含されるDrummondプランジャを用いてフロント充填を介して負荷された。P0仔マウスは、動かなくなり、つま先のピンチに反応しなくなるまで、氷上に2〜3分間置くことによって麻酔された。次いで、2 μL の注射混合物(合計3.2 pmolのBEタンパク質をカプセル化する、 2.6×10^{10} eVLPを含有)は、各心室へとフリーハンドで注射された。心室標的化は、頭部の透過照明を介した心室全体にわたるFast Greenの広がりによって評価された。

10

【0514】

核の単離および選別

核は、前述したように(Levy et al.,2020)、皮質および中脳から単離された。簡潔には、解剖した皮質および中脳を、乳棒Aを使用して20回ストロークしながらガラス製のDounceホモジナイザー(Sigma-Aldrich;D8938)を用いて、続いて、2 mLの氷冷EZ-PREP緩衝液(Sigma-Aldrich;NUC-101)中で乳棒Bから20回ストロークして、ホモジナイズされた。試料は、次いで、氷上に追加的に2 mLのEZ-PREP緩衝液を含有する、新しいチューブへとデカントされた。5分後、ホモジナイズした組織は、5分間にわたり500 gで4°Cにて遠心分離された。核ペレットは、PBS中の100 $\mu\text{g/mL}$ のBSA(NEB;B9000S)および3.33 μM Vybrant DyeCycle Ruby(Thermo Fisher;V10309)からなる4 mLの氷冷Nuclei Suspension Buffer(NSB)中に再懸濁され、続いて、500 gで5分間にわたり4°Cで遠心分離された。遠心分離の後、上清は除去され、核は、1〜2 mLのNSB中に再懸濁され、35 μm セルストレーナに通され、続いて、Broad InstituteフローサイトメトリーコアにてSony MA900 Cell Sorter(Sony Biotechnology)を用いて流動選別された。例えば、FACSゲーティングについては図S5Aを参照されたい。核はDNAAdvance溶解緩衝液へと選別され、ゲノムDNAは、製造業者のプロトコル(Beckman Coulter;A48705)に従って精製された。

20

【0515】

後眼窩注射

50 μL のVLP(4×10^{11} または 7×10^{11} のVLPを含有する)は、10分間にわたり15,000 gで遠心分離されて、残屑が除去された。清澄化した上清を、注射直前に、0.9% NaCl(Fresenius Kabi;918610)中に120 μL へ希釈した。総AAVの 1×10^{11} ウイルスゲノム(vg)は、注射直前に、0.9% NaCl(Fresenius Kabi;918610)中に120 μL へ希釈した。

30

【0516】

麻酔は4%イソフルランで誘導された。誘導後、両側のつま先ピンチに対する不応答性によって測定されるように、右眼は、皮膚への穏やかな圧力によって突き出され、インスリン注射器は、斜角を眼から外方に向け球後洞へと前進され、そこで、VLPまたはAAV混合物がゆっくり注射された。次いで、1滴のプロパラカイン塩酸塩点眼液(Patterson Veterinary;07-885-9765)が、鎮痛剤として眼に適用された。ゲノムDNAは、Agen court DNAAdvanceキット(Beckman Coulter;A48705)を、製造者の説明書に従って用いて、様々な組織から精製された。

40

【0517】

組織学および染色

肝臓組織は、4%PFA中にて一晩4°Cで固定された。翌日、固定した肝臓は、10 mMグリシンを伴う1 $\times$ PBSへと移されてフリーアルデヒドが少なくとも24時間クエンチされ、続いて、Harvard Medical SchoolのRodent Histopathology Coreでパラフィン処理された。次いで、肝臓パラフィンブロックが、5 μm の切片へとカットされ、その後、組織病理学的試験のためにヘマトキシリンおよびエオシン染色が行われた。

【0518】

50

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) アッセイ

血液は、顎下出血を介して注射の7日後に回収され、室温で1時間にわたり凝固された。次いで、血清は、2000gで15分間にわたり遠心分離によって分離され、分析のために IDEXX Bioanalytics, MA へと送られた。

【0519】

血清 Pcsk9 測定

Pcsk9 の血清レベルを追跡するために、血液は、血清分離チューブ中の顎下出血を用いて回収された。血清は、2000gで15分間にわたる遠心分離によって分離され、-80℃で貯蔵された。Pcsk9 レベルは、マウスプロタンパク質コンバーターゼ9/PCSK9 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems; MPC900) を、製造者の説明書に従って使用する ELISA によって決定された。

【0520】

CIRCLE-seq

以下の修飾を除いて、以前に記載されたように (Tsai et al., 2017)、配列決定による切断効果の *in vitro* 報告のための環状化 (Circularization for *In vitro* Reporting of Cleavage Effects by sequencing: CIRCLE-seq) が、実施および分析された: Cas9 切断工程については、ガイド変性、インキュベーション、およびプロテイナーゼ K 処置は、CHANGE-seq プロトコル (Lazzarotto et al., 2020) に記載されたより効率的な方法を用いて行われた。具体的には、ガイド配列「GCCCATACCTTGGAGCAACGG」(配列番号 52) を有する sgRNA は、それらの標準的な化学修飾、最初の3つおよび最後の3つの塩基の 2'-O-メチル、ならびに最初の3つおよび最後の2つの塩基の間のホスホロチオエート結合と共に Synthego から注文された。5' 「G」ヌクレオチドは、20ヌクレオチド特異的ガイド配列と共に包含されて、発現され VLP へとパッケージングされた配列が再現された。sgRNA は、ヌクレアーゼフリー水中で 9 μM へ希釈され、90℃で5分間のインキュベーションによってリフォールディングされ、続いて、0.1℃/秒のランプ速度で 25℃までゆっくりアニーリングされた。sgRNA は、ヌクレアーゼを備えた 5 μL の 10× Cas9ヌクレアーゼ反応緩衝液、4.5 μL の 1 μM Cas9ヌクレアーゼ (20 μM ストックから、1× Cas9ヌクレアーゼ反応緩衝液中に希釈)、および 1.5 μL の 9 μM アニーリング sgRNA を混合した後、10分間の室温インキュベーションを介して Cas9ヌクレアーゼ (NEB; M0386T) と複合体化される。マウス N2A 細胞からの環状 DNA は、125 ng の総質量に添加され、50 μL の最終体積へ希釈された。37℃で1時間インキュベートした後、プロテイナーゼ K (NEB; P8107S) は、水中で4倍希釈され、5 μL の希釈混合物は、切断反応へ添加された。37℃で15分間のプロテイナーゼ K 処置後、DNA は、A テール化され、アダプターライゲーションされ、かつ USER 処置され、CIRCLE-seq プロトコルに記載されるように (Tsai et al., 2017)、PCR 増幅された。PCR の後、試料は、分取 1% アガロースゲルに負荷され、DNA は、300 bp ~ 1 kb の範囲で抽出されてプライマー二量体を排除した後、Illumina MiSeq で配列決定された。データは、CIRCLE-seq 分析パイプラインを用いてプロセッシングされ、ヒトゲノム Hg19 (GRCh37) へパラメータ: 「read_threshold: 4; window_size: 3; mapq_threshold: 50; start_threshold: 1; gap_threshold: 3; mismatch_threshold: 6; merged_analysis: True」でアラインされた。

【0521】

CIRCLE-seq によって指定されたオフターゲット部位のアンプリコン配列決定

以前の研究では、CIRCLE-seq によって指定された、徹底的に評価された ABE8e オフターゲット部位について、オフターゲット編集効率が、CIRCLE-seq リードカウントで良好に追跡されなかったことが観察された (Newby et al., 2021)。しかしながら、編集が観察された、指定されたオフターゲット部位は、いくつかの顕著な類似性を共有していた。すなわち、検証されたオフターゲット編集を有する 54 個のオフターゲット部位の 90.7% 超が、PAM に近位の 9 個のヌクレオチド中のガイドに対する 0 個のミスマッチまたは 1 個のミスマッチを有していた。この領域に 1 を超えるミスマッチを有する少数の部位は

、全て低効率で編集された(編集効率によってランク付けされた場合、部位の下半分)。この知識に基づいて、PAMに近位のプロトスペーサの9ヌクレオチド中に1またはそれより少ないミスマッチを示したCIRCLE-seqリスト中の14個のオフターゲット部位が、選ばれて、真のオフターゲット部位が配列決定される可能性を高めるために評価された(表3)。

【0522】

マウス網膜下注射

マウスは、体重20gあたり0.1mLの用量で、リン酸緩衝生理食塩水中20mg/mLケタミンおよび1.75mg/mLキシラジンからなるカクテルの腹腔内注射によって麻酔され、マウスの瞳孔は、1%トロピカミド点眼液(Akorn;17478-102-12)の局所投与によって散大された。網膜下注射は、眼科手術用顕微鏡(Zeiss)下において実施された。切開は、25ゲージ針を用いて鼻側の角膜輪部に隣接する角膜を貫通して行われた。SilFlex tubing(World Precision Instruments;SILFLEX-2)によってRPE-KIT(World Precision Instruments、no.RPE-KIT)へ接続された34ゲージの平滑末端針(World Precision Instruments;NF34BL-2)は、水晶体を避けながら角膜切開を通じて挿入され、網膜を通じて前進された。各マウスは、眼あたり1 μ Lの実験試薬(レンチウイルスまたはeVLP)を注射された。レンチウイルス力価は、QuickTiter(商標)Lentivirus Titer Kit(Cell Biolabs;VPK-107-5)によって測定された際、 1×10^9 TU/mL超であった。BE-eVLPは、3pmol/ μ Lのカプセル化BEタンパク質含有量に対応する、 4×10^{10} eVLP/ μ Lの力価へ正規化された。注射後、瞳孔は、GenTeal Severe Lubricant Eye Gel(0.3%ヒプロメロース、Alcon)を適用して水和され、回復のために保持された。

【0523】

RPEの解離およびゲノムDNAおよびRNAの調製

光学顕微鏡下において、マウスの眼は、解剖されて、網膜および前側セグメントから後側眼杯(RPE、脈絡膜、および強膜を含有)を分離された。各後側眼杯は、AllPrep DNA/RNA Mini Kit(Qiagen;80284)を備えた、350 μ LのRLT Plus組織溶解緩衝液中に、直ちに浸漬された。1分間のインキュベーション後、RPE細胞は、穏やかなピペティングによって後側眼杯から溶解緩衝液中で剥離され、続いて、残りの後側眼杯を除去された。RPE細胞を含有する溶解緩衝液は、AllPrep DNA/RNA Mini Kitプロトコルを用いて、DNAおよびRNA抽出のためにさらにプロセッシングされた。最終的なDNAおよびRNAは、それぞれ、30 μ Lおよび15 μ Lの水中に溶出された。cDNA合成は、SuperScript(商標)III First-Strand Synthesis SuperMix(Thermo Fisher;18080400)を用いて実施された。

【0524】

マウスRPE組織抽出物のウェスタンブロット分析

マウスRPE組織からタンパク質溶解物を調製するために、RPE、脈絡膜、および強膜からなる解剖されたマウスの眼杯は、プロテアーゼ阻害剤を伴う30 μ LのRIPA緩衝液を含有する微量遠心チューブへ移され、運動組織粉砕機(Fisher Scientific;K749540-0000)でホモジナイズされ、30分間にわたり20,000gで4 $^{\circ}$ Cにて遠心分離された。得られた上清は、Dynabeads Protein G(Thermo Fisher;10003D)で事前に清澄化されて、ゲル負荷前に、血液から汚染物質が除去された。NuPAGE LDS Sample Buffer(Thermo Fisher;NP0007)およびNuPAGE Sample Reducing Agent(Thermo Fisher;NP0004)と予め混合した20 μ LのRPE溶解物は、NuPAGE 4~12%Bis-Trisゲル(Thermo Fisher;NP0321BOX)の各ウェルへと負荷され、130Vで1時間にわたり分離され、PVDF膜(Millipore;IPVH00010)上に移された。0.1%(v/v)Tween-20(PBS-T)を含有するPBS中の5%(w/v)脱脂乳で1時間ブロッキングした後、膜は、1%(w/v)脱脂乳で希釈した、一次抗体、マウス抗RPE65モノクローナル抗体(1:1,000;組織内生産)(Golczak et al.,2010)と共に、PBS-T中にて4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートされた。一晩のインキュベーション後、膜は、各々、PBS-Tで5分間にわたり3回洗浄され、次いで、ヤギ抗マウスIgG-HRP抗体(1:5,000;Cell Signaling Technology;7076S)と室

温で1時間にわたりインキュベートされた。

【0525】

膜をPBS-Tで各5分間にわたり3回洗浄した後、タンパク質バンドは、SuperSignal West Pico Chemiluminescent基質(Thermo Fisher;34580)へ曝露された後、可視化された。膜は、同じプロトコルに従って、マウス抗Cas9モノクローナル抗体(1:1,000;Invitrogen;MA523519)およびウサギ抗 β -アクチンポリクローナル抗体(1:1,000;Cell Signaling Technology;4970S)を用いて、剥ぎ取られ、ABEおよび β -アクチン発現について再検出された。対応する二次抗体は、ヤギ抗マウスIgG-HRP抗体(1:5,000;Cell Signaling Technology;7076S)およびヤギ抗ウサギIgG-HRP抗体(1:5,000;Cell Signaling Technology;7074S)であった。

10

【0526】

網膜電図検査

記録の前に、マウスは24時間にわたり一晩、暗順応後された。安全光の下において、マウスは、体重20gあたり0.1mLの用量で、リン酸緩衝生理食塩水中20mg/mLケタミンおよび1.75mg/mLキシラジンからなるカクテルの腹腔内注射によって麻酔され、マウスの瞳孔は、1%トロピカミド点眼液(Akorn;17478-102-12)、続いて水和のために2.5%ヒプロメロース(アコーン;9050-1)の局所投与によって散大された。マウスは、加熱したDiagnosys Celeris rodent ERGデバイス(Diagnosys LLC)に置かれた。眼電極は角膜上に置かれ、参照電極は耳の間の皮下に位置づけられた。眼は、 $-0.3\log(cd \cdot s/m^2)$ の緑色光(ピーク発光544nm、バンド幅約160nm)刺激で刺激された。10秒の刺激間隔による10刺激への応答が、一緒に平均され、a波およびb波振幅が、平均ERG波形から取得された。ERGは、Celerisげっ歯類電気生理学システム(Diagnosys LLC)で記録され、Espion V6ソフトウェア(Diagnosys LLC)で分析された。

20

【0527】

定量および統計分析

データは、平均および平均の標準誤差(s.e.m.)として提示される。統計的方法は、試料サイズを事前に決定するために使用されなかった。統計分析は、GraphPad Prismソフトウェアを用いて実施された。使用される試料サイズおよび統計的試験が図の説明文に記載されている。

【0528】

例2:塩基編集のためのウイルス様粒子の開発および試験

初期(v1)BE-VLP設計として、高活性アデニン塩基エディタ(Richter et al.,2020)であるABE8eは、粒子成熟の際にFMLVプロテアーゼによって切断されるリンカーペプチドを介して、フレンドマウス白血病ウイルス(FMLV)gagポリタンパク質のC末端へ融合された(図1A)。FMLVベースのVLPは、Cas9 RNPをパッケージングおよび送達するために、以前は首尾よく使用されていた(Mangeot et al.,2019)。BE-VLPは、このFMLV gag-ABE 8e融合構築物、野生型FMLV gag-pro-polポリタンパク質、VSV-Gエンベロープ糖タンパク質、およびHEK293T細胞ゲノム部位2または部位3(以下、HEK2またはHEK3と称する)を標的とするsgRNAを発現するプラスミドにより、Gesicle 293T生産細胞をトランスフェクトすることによって生産された。

40

【0529】

生産細胞上清からのBE-VLP採取の後、HEK293T細胞は、濃縮BE-VLPをin vitroで形質導入された。有望なことに、v1 BE-VLPは、HEK2およびHEK3ゲノム遺伝子座を、未選別細胞において最高用量で97%を超える効率でロバストに編集した(図1B)。これらのBE-VLPが、Cas9、MLVカプシド、およびVSV-Gタンパク質を含有することが、免疫プロット法を介して確認された(図8A)。これらの観察は、FMLVレトロウイルス足場がBE-VLP形成を支持し、v1 BE-VLPがin vitroでHEK293T細胞に効率的に形質導入および編集をすることができることを指し示した。

【0530】

VLP成熟後のカーゴ放出の改善

50

v1 BE-VLPは、HEK293T細胞のHEK2およびHEK3遺伝子座をロバストに編集したが、一方で、これらの一般的に使用される試験遺伝子座は、遺伝子編集に特に受け入れられ、治療的関連性を欠いている(Anzalone et al., 2020)。BE-VLPの治療可能性を評価するために、BE-VLPの能力は、 β -異常ヘモグロビン症を処置するための確立された塩基編集戦略である、赤血球中の胎児ヘモグロビンの発現を上方制御するBCL11A赤血球特異的エンハンサに突然変異を導入するように評価された(Richter et al., 2020; Zeng et al., 2020)。v1 BE-VLPは、HEK293T細胞におけるBCL11Aエンハンサ遺伝子座において高用量で、73%の編集を達成したが、しかし、編集レベルは用量の減少と共に急激に低下したことが観察された(図8B)。これらの結果は、v1 BE-VLP活性が改善されることができるとを指し示した。

10

【0531】

粒子成熟後のMLVプロテアーゼによるgag-ABE8eリンカーの切断は、フリーABE8e RNPを遊離させるために必要とされる。一連の第2世代(v2)操作されたBE-eVLPは、MLV gagとABE8eとの間に種々のプロテアーゼ切断可能リンカー配列を含有するように構築された(図8C)。

【0532】

最初に、レトロウイルス足場は、フレンドMLVから、プロテアーゼ基質特異性が広く特徴付けられている類似のMLV株である、モロニーMLV(MMLV)へと切り替えられた(Feher et al., 2006)。次いで、MMLVプロテアーゼによって様々な効率で切断されることが知られている4つの異なるリンカー配列が、試験され、v1 BE-VLPと比較して編集効率を改善したいくつかの新しいgag-ABE8eリンカーが同定された(図2B)。具体的には、v2.4 BE-eVLPは、v1 BE-VLPと比較して、試験した全ての用量で1.2~1.5倍高い編集効率を呈した(図2B)。v2.1~v2.4のBE-eVLP中のリンカー配列の切断効率を調査するために、ウエスタンブロットが実施されて、精製されたBE-VLP中に存在する完全長gag-ABE8eに対する切断されたABE8eの分画が決定された。この分析により、v2.4 リンカーは、v2.1およびv2.2リンカーよりも効率的に切断されるが、しかし、v2.3リンカーよりも効率的に切断されないことが明らかになった(図8Dおよび図8E)。

20

【0533】

これらの結果は、v2.4 BE-eVLP中のリンカー配列が、VLP成熟後のABE8e RNPの効率的な放出を支持するが、しかし、VLPへの組み込み前のABE8e RNPの早期放出を排除する、最適な速度で切断されるモデルを支持する。この知見は、gag-カーゴタンパク質リンカー配列が、VLPアーキテクチャの重要なパラメータであり、この配列を最適化して、これらの2つの制約の間でリンカー切断速度論のバランスをとることが、eVLP活性を改善できることを実証している。

30

【0534】

カーゴの局在化およびeVLPへの負荷の改善

以前に最適化されたBEは、それらのN末端およびC末端で二分された核局在化シグナル(NLS)に融合され、それは、BEの核内移行を促し、ゲノムDNAへのそれらのアクセスを増強する(Koblan et al., 2018)。しかしながら、gag-BE融合物は、それらが形成するときVLPへと組み込まれるために、生産細胞の細胞質および外膜へ局在化されなければならない(図2C)。ある特定の理論に拘束されることを望むものではないが、gag-BE融合内の2つのNLSの存在は、外膜へのgag-BEの局在化を妨害し、VLPへのBEの組み込みを邪魔することができる。

40

【0535】

生産細胞におけるサイトゾルgag-カーゴ局在化を助長するために、第3世代(v3)eVLPアーキテクチャは、NLSに加えて核外移行シグナル(NES)を含有するように設計された。以前の研究は、MLVベースのVLPがgagタンパク質内の複数の場所でのNESの付加に耐えることができることを実証した(Wu and Roth, 2014)。v3設計では、MMLVプロテアーゼ切断可能リンカー配列は、NESがVLP成熟後にカーゴから切断されることを確実にするように、NESの隣の場所に置かれ(図2Dおよび図9A)、それによって、形質導入

50

細胞の核へと効率的にインポートされることができNLSフラグカーゴタンパク質が遊離される。全てのv3 BE-eVLPアーキテクチャは、v2.4 BE-eVLPからの最適なgag-ABE 8eリンカー配列を含有した。BE-eVLP v3.1、v3.2、およびv3.3は、追加のMMLVプロテアーゼ切断可能リンカーを介してABE8eのC末端で融合された3xNESモチーフを保持し、v2.4 BE-eVLPと比較して同等または低い効率を呈した(図2E)。しかしながら、v2.4に最適化された切断可能リンカー配列の直前にMMLV gagのC末端で3xNESモチーフを含有する、v3.4 BE-eVLPは、v2.4 BE-eVLPと比較して、試験した全ての用量でBCL11Aエンハンサ遺伝子座における編集効率において1.1~2.1倍の改善を呈した(図2E)。特に、v3.1、v3.2、およびv3.3のBE-eVLPで必要とされる2つの異なる切断事象と比較して、v3.4のBE-eVLPは、単一のウイルスプロテアーゼ切断事象のみを必要とし、NLSにフラグするNESフリーBE(図2Dおよび図9A)を遊離させる。これは、それらの優れた効率を説明し得る。gag-ABE局在化に対するNES添加の効果をさらに調査するために、v3.4 gag-3xNES-ABE構築物またはv2.4 gag-ABE構築物でトランスフェクトした生産細胞の免疫蛍光顕微鏡法が実施された。この分析は、v2.4トランスフェクト生産細胞と比較して、v3.4トランスフェクト生産細胞で検出されたABEタンパク質の細胞質内局在の1.3倍の増加を明らかにした(図10Bおよび図10C)。

10

【0536】

これらの結果は、BE-eVLP活性は、形質導入細胞へと放出されたBEの核局在化を維持しながら、生産細胞におけるgag-BE融合物の核外局在化を促進することによって改善されることができると実証している。

20

【0537】

例3.eVLPの構成要素化学量論の改善

この例は、v3.4 eVLPのgag-カーゴ:gag-pro-pol化学量論の調製、および送達効率に対するその効果を実証する。

【0538】

最適なgag-カーゴ:gag-pro-pol化学量論は、VLPへとパッケージングされるために利用可能なgag-カーゴの量と、VLP成熟に必要とされるMMLVプロテアーゼの量(gag-pro-pol中の「pro」)とのバランスをとるものと仮定された(図2F)。

【0539】

この化学量論をモジュレートするために、VLP生産のためにトランスフェクトされた野生型MMLV gag-pro-polプラスミドに対するgag-3xNES-ABE 8eの比が変化された。gag-BEプラスミドの量が、v3.4 BE-eVLPを生産するために使用される元の割合(38%のgag-BEプラスミドおよび62%のgag-pro-polプラスミド)を超えて増加することは、編集効率を改善しないことが見出された(図2G)。gag-BEプラスミドの割合を38%~25%へ減少させることは、編集効率をやや改善した(図2G)。しかしながら、gag-BEプラスミドの割合を25%未満にさらに減少させることは、編集効率を低減させた(図2G)。この一連のVLP操作の結果は、最適なgag-BE:gag-pro-pol化学量論(25%gag-BE)を、v3.4 BE-eVLPアーキテクチャと組み合わせる第4世代(v4)BE-eVLP製剤(図2G)を明らかにした。v4 BE-eVLPは、透過型電子顕微鏡によって可視化され、それらの球状形態および100~150nmのおよその粒子直径が確認された(図10A)。

30

40

【0540】

次に、BE-eVLPのタンパク質含有量に対するアーキテクチャ工学の効果が決定された。抗Cas9および抗MLV(p30)抗体を有するELISAは、v1~v4のBE-eVLPに存在するBE分子およびp30(MLVカプシド)分子の数が定量されるように、実施された(図10Bおよび図10C)。これらの実験は、v2.4、v3.4、およびv4のBE-eVLPが、v1のBE-VLPと比較して、それぞれ、粒子あたり1.8倍、19.2倍、および11倍多いBEカーゴタンパク質分子を含有することを明らかにした(図3A)。粒子あたりのBEタンパク質含有量のこの増加は、溶解されたVLPの標的化RT-qPCRによって測定される粒子あたりのsgRNAの相対量の増加と相関する(図3B)。興味深いことに、v4 BE-eVLPは、v3.4 BE-eVLPよりも粒子あたりのBEタンパク質分子が少ないが、しかし同じ量のsgRNA分子を含有し、こ

50

れは、v3.4およびv4 BE-eVLPが、粒子あたり同様の量の活性BE RNPを含有してもよいことを示唆している。くわえて、v4 BE-eVLPは、v3.4 BE-eVLPよりも高い力価で生産される(図10C)。

【0541】

これらの結果は、粒子あたりの活性BE RNP分子の数を増加させることが、BE-eVLP編集効率を改善し得ることができるというモデルを支持する。しかしながら、粒子あたりのBE分子の数をある特定の閾値を超えて増加させることは、有害であることができるが、これは、これらの追加的なBE分子がsgRNAと複合体化しているようには見えず、VLPあたりに組み込まれるカーゴ分子の数と全体的なVLP力価との間に明らかなトレードオフが存在するからである。

【0542】

上記の連続的なVLP操作の努力は、HEK293T細胞におけるBCL11Aエンハンサ遺伝子座でのv4 BE-eVLPの編集効率を、最大用量で95%に実質的へ改善した(図3C)。v4 BE-eVLPは、v1 BE-VLPと比較して単位体積あたりの編集効率において5.6倍の改善を呈し、v2.4 BE-eVLPと比較して2.2倍の改善を呈する(図3C)。v4 BE-eVLPは、HEK293T細胞におけるウイルス粒子あたりの塩基編集活性において8.5倍の改善を呈することもまた観察された(図10D)。v4 VLP工学が、1つの特定のゲノム遺伝子座または標的細胞株に制限されない一般的な塩基編集の改善を支持することを確認するために、Dnmt1遺伝子座を標的とするv1、v2.4、v3.4、およびv4 BE-eVLPは、3T3マウス線維芽細胞で試験された。4つのeVLPアーキテクチャの編集効率の非常に類似した傾向が観察され、3T3細胞におけるv1 BE-VLPと比較して、v4 BE-eVLPの単位体積あたりの編集効率で8.6倍改善された(図3D)。くわえて、v4 BE-eVLPによる処置は、HEK293T細胞または3T3細胞の生存率に悪影響を及ぼさなかった(図10E)。v4 BE-eVLPはまた、HEK293T細胞におけるBCL11AエンハンサおよびHEK2ゲノム遺伝子座のロバストな複数の編集を支持した(図3E)。これらの結果は、v4 BE-eVLPが、処置された細胞に対する摂動を最小限に抑えながら、高効率の塩基編集を媒介することを示している。

【0543】

Cas9ヌクレアーゼ(Cas9-VLP)およびEMX1ゲノム遺伝子座を標的化するsgRNAをパッケージングしたv1およびv4 VLPが構築された。4.7倍の改善が、HEK293T細胞において、v1 Cas9-VLPと比較して、v4 Cas9-eVLPによって産生された単位体積あたりのインデル頻度において観察された(図10F)。この観察は、操作されたv4 eVLPアーキテクチャが、BEに限定されないタンパク質のVLP媒介送達に改善を提供することを示唆している。

【0544】

eVLPの魅力的な特徴は、原則としてそれらの細胞指向性が、異なるエンベロープ糖タンパク質を用いてそれらを生産することによってモジュレートされることができることである。FuG-B2エンベロープ糖タンパク質でシュードタイプ化されたv4 BE-eVLPが構築された(Kato et al., 2011)。FuG-B2は、狂犬病ウイルスエンベロープ糖タンパク質の細胞外ドメインおよび膜貫通ドメイン、ならびにVSV-Gの細胞質ドメインを含有する、操作されたエンベロープ糖タンパク質であり、かつ、ニューロン特異的形質導入のためにシュードタイプレンチウイルスに使用されることができる(Kato et al., 2011)。実際、FuG-B2シュードタイプ化v4 BE-eVLPは、Neuro-2a細胞(マウス神経芽細胞腫細胞株)を効率的に形質導入および編集するが、しかし、マウス3T3線維芽細胞は形質導入および編集しないことが観察された(図3Fおよび図10G)。これらの結果は、eVLPの組織特異性が、特定の細胞集団を形質導入するためにシュードタイプレンチウイルスに使用されるものなどの他の糖タンパク質での交換によって標的化されることができることを検証する。

【0545】

BEは、Cas9オフターゲット結合部位のサブセットにおけるCas依存性オフターゲット編集、ならびにゲノム全体にわたって低レベルでのCas非依存性オフターゲット編集を媒

10

20

30

40

50

介することができる(Anzalone et al., 2020)。HEK293T細胞におけるABE8eプラスミドトランスフェクションと比較したv4 BE-eVLPによるCas依存性のオフターゲット編集を評価するために、標的化アンプリコン配列決定が、HEK2、HEK3、およびBCL11Aエンハンサ遺伝子座を標的とする3つの異なるsgRNAに関連する既知のCas9オフターゲット部位で実施された。同等以上のオンターゲット編集効率が、これらの3つのゲノム遺伝子座でのプラスミドトランスフェクションと比較してv4 BE-eVLPから観察されたが、しかし、v4 BE-eVLPからのCas依存性オフターゲット編集は12~900倍低かった(図3G)。

【0546】

Cas非依存性オフターゲットDNA編集を評価するために、全ゲノム配列決定を必要とせずにガイドされない様式でDNAを脱アミノ化する塩基エディタの能力を評価するための戦略として以前に検証された複数の研究室である、直交Rループアッセイが実施された(Doman et al., 2020; Yu et al., 2020)。同じBEをコードするDNAプラスミドのトランスフェクションと比較して、v4 BE-eVLPは、事実上検出されないレベルまで、Cas非依存性オフターゲット編集における100倍超の低減を呈した(図3Hおよび図11B)。これらの結果は、非常に活性なBEによるオフターゲット編集がRNP送達で実質的に最小限に抑えられることができるという以前の知見を確認し、拡張しており(Doman et al., 2020; Jang et al., 2021; Lyu et al., 2021; Newby et al., 2021; Rees and Liu, 2018; Richter et al., 2020; Yeh et al., 2018)、かつ、最小限のオフターゲット編集で非常に効率的なオンターゲット塩基編集を支持するeVLPの能力を強調している。

【0547】

eVLPのDNAを含まない性質は、原則として、形質導入細胞のゲノムへのDNA統合の可能性、既存のウイルス送達様式を超える重要な安全上の利点を回避する(David and Doherty, 2017; Milone and O'Doherty, 2018)。精製v4 BE-eVLPがVLPあたり0.03分子未満のBEコードDNAを含有することが、qPCRによって確認された(図3I)。くわえて、かなりの量(8.7 ng/μL)のBEコードDNAが、BEコードプラスミドでトランスフェクトされたHEK293T細胞からの細胞溶解物中に検出されたが、一方でBEコードDNAは、未処置細胞からの試料におけるバックグラウンドレベル(0.02 ng/μL未満)を超えるv4 BE-eVLP処置HEK293T細胞からの細胞溶解物中には検出されなかった(図3J)。これらの結果は、BE-eVLPが、BEをコードする検出されたレベルのDNAに形質導入細胞を曝露せず、それによって、カーゴDNAのゲノム統合の可能性を最小限に抑えることを実証している。

【0548】

v4 BE-eVLPは初代ヒト細胞および初代マウス細胞を効率的に編集する。v4 BE-eVLPの有用性をさらに調べるために、種々の初代ヒト細胞または初代マウス細胞をex vivoで標的化および編集する能力が試験された。初代ヒトパイシエント由来線維芽細胞において劣性栄養障害性表皮水泡症(RDEB)を引き起こすCOL7A1におけるナンセンス突然変異のABE媒介性修正が以前に報告されている(Osborn et al., 2020)。ホモ接合COL7A1(R185X)突然変異を保持する初代線維芽細胞にv4 BE-eVLPを形質導入した後、標的アデニン塩基で95%超の編集が観察され、eVLP処置細胞と未処置細胞との間で細胞生存率に差はなかった(図4Aおよび図11C)。くわえて、以前に同定された10のオフターゲット部位(Osborn et al., 2020)で最小のCas依存性オフターゲット編集が観察された(図11D)。

【0549】

ムコ多糖症IH型のマウスモデル(Wang et al., 2010)に由来する初代線維芽細胞におけるナンセンス突然変異を補正するv4 BE-eVLPの能力がまた評価された。v4 BE-eVLP形質導入後のIdua(W392X)突然変異の95%超の補正が観察された(図4B)。これらの結果は、BE-eVLP活性が不死化細胞株に制限されないことを検証し、かつv4 BE-eVLPが、100%に近い初代ヒト線維芽細胞および初代マウス線維芽細胞における塩基編集のレベルを達成することができることを実証する。

【0550】

次に、初代ヒトT細胞におけるBE-eVLP媒介性編集が調査された。MHCクラスIおよびMHCクラスIIを包含するT細胞の表面上の免疫調節性タンパク質の発現を低減させる遺伝子編集戦略は、「既製(off-the-shelf)」の同種異系キメラ抗原受容体(CAR)T細胞を可能にすることによってT細胞療法を前進させることができる。以前の報告は、B2MおよびCIITA遺伝子のスプライス部位を妨害することは、初代ヒトT細胞におけるMHCクラスIおよびMHCクラスIIの発現が低減することを示している(Gaudelli et al., 2020; LeibundGut-Landmann et al., 2004; Serreze et al., 1994)。初代ヒトT細胞をv4 BE-eVLPで処置することは、B2MおよびCIITAスプライス部位の45~60%の妨害をもたらした(図4C)。まとめると、これらの結果は、BE-VLPが、ex vivoで臨床的に関連する初代ヒト細胞型を効率的に編集し、かつ初代ヒトT細胞におけるBE-VLP編集効率の更なる最適化の基礎を構築することができることを確認する。

10

【0551】

eVLPを用いたCNSにおけるin vivo塩基編集

ex vivoでのeVLPの口バストな活性は、それらがin vivoでBE RNPを送達するための有望なビヒクルであってもよいことを示唆した。それらのin vivo有効性を評価し始めるために、マウス中枢神経システム(CNS)内での塩基編集を可能にするeVLPの能力が調査された。v4 BE-eVLPは、in vivoでヌクレアーゼ媒介性インデル形成およびアデニン塩基編集に受け入れられることが知られているゲノム遺伝子座においてマウスDnmt1にサイレント突然変異を導入するものが生産された(Levy et al., 2020; Swiech et al., 2015)。CNSへBE-eVLPを送達するために、新生児脳室(P0 ICV)注射が実施されたが、これは、脊髄性筋萎縮症(Mercuri et al., 2018)の患者にヌシネルセンを送達するために現在使用されているくも膜下腔内注射と同様に、血液脳関門を迂回する脳脊髄液への直接注射である。v4 BE-eVLPは、核膜局在化Klarsicht/ANC-1/Syne-1相同(KASH)ドメイン(図5A)へ融合されたEGFPをコードするVSV-G-シュードタイプ化レンチウイルスと一緒に、各半球へと同時注射された。この戦略は、eVLPに曝露された細胞を豊富にする方法としてGFP陽性核の単離を可能にするものと推論された。このアプローチは、多くの細胞がアクセス不能であってもよい、脳への注射後の編集効率を決定するのに特に有用である。注射3週間後、皮質および中脳組織由来のバルク未選別およびGFP陽性核が分析され、塩基編集が、ハイスループット配列決定によって評価された(図5A)。

20

30

【0552】

皮質組織および中脳組織の両方におけるGFP陽性核の頻度は、低く(図12B)、マウス脳へと注射されたVSV-Gシュードタイプ化レンチウイルスによって形質導入された細胞が注射部位の近くに局在されるという、以前の報告と一致しており(Humbel et al., 2021; Parr-Brownlie et al., 2015)、これはおそらく、脳細胞外空間の幅(Thorne and Nicholson, 2006)よりも約3倍大きい平均直径を有するウイルス粒子のサイズが、バルク脳組織を通じた拡散を妨げてよいためである。有望なことに、GFP陽性皮質および中脳細胞における53%および55%の編集がそれぞれ観察され、これは、バルク皮質および中脳の6.1%および4.4%の編集に対応した(図5B)。これらのデータは、形質導入事象ごとに口バストなレベルの活性BE RNPを送達するCNS塩基編集用途のための新しい非ウイルス送達システムとして、BE-eVLPを確立するが、しかし、形質導入効率の改善が、バルク脳組織において高レベルの編集を達成するためには必要とされる。eVLPによるin vivo肝臓塩基編集は、Pcsk9の効率的なノックダウンをもたらす。

40

【0553】

in vivoでのBE-eVLPの有用性をさらに調べるために、成体動物において治療用塩基編集を媒介する能力が調査された。まず、コレステロール恒常性に関与する治療関連遺伝子である、プロタンパク質コンバーターゼサブチリシン/ケキシニン9型(Pcsk9)が標的化された(Abifadel et al., 2003; Fitzgerald et al., 2014)。機能喪失PCSK9突然変異は、明らかな健康上の悪影響なしに自然に起こる(Abifadel et al., 2003; Cohen et al., 2005; Cohen et al., 2006; Hooper et al., 2007; Rao et al., 2018)。これらの個

50

体は、血液中の低密度リポタンパク質(LDL)コレステロールのレベルが低く、アテローム性心血管疾患のリスクが低減されることから、これは、PCSK9遺伝子を妨害することが、家族性高コレステロール血症の処置のための有望な戦略となることができることを示唆する(Musunuru et al., 2021; Rothgangel et al., 2021)。

【0554】

v4 BE-eVLPは、マウス肝臓におけるPcsk9ノックダウンのための以前に確立された塩基編集戦略である、Pcsk9エクソン1とイントロン1との境界でスプライドナーを標的とし、妨害するように生産された(Musunuru et al., 2021; Rothgangel et al., 2021)。6~7週齢の成体C57BL/6マウスへのeVLPの全身(後眼窩)注射が実施され、肝臓における塩基編集が注射の1週間後に測定された(図6A)。63%の編集が、最適化された最新式のAAVベースの送達様式および脂質ナノ粒子(LNP)ベースのmRNA送達システムによりこの部位で典型的に達成される編集効率に匹敵する、最高用量(7×10^{11} eVLP)のv4 BE-eVLP(図6B)での処置後のバルク肝臓において、観察された(Musunuru et al., 2021; Rothgangel et al., 2021)。操作されたv4 BE-eVLPアーキテクチャは、同じ用量で以前に報告された設計(v1 BE-VLP)に基づくVLPアーキテクチャよりも、肝臓において26倍高い編集レベルを支持した(図6B)。これらの結果は、マウス肝臓における治療関連遺伝子座でのRNPによる効率的な塩基編集を確立する。

【0555】

最高用量のv4 BE-eVLPで処置したマウスでは、塩基編集効率はまた、心臓、骨格筋、肺、腎臓、および脾臓を包含する非肝臓組織において評価された。4.3%の塩基編集が脾臓では観察され、肺、腎臓、心臓、および筋肉ではバックグラウンドレベルを超える編集は観察されなかった(図6C)。組織にわたるこの編集パターンは、静脈内投与されたVS V-G-シュードタイプ化粒子の以前に特徴付けられた組織向性と一致する(Pan et al., 2002)。

【0556】

BE-eVLPによる処置が肝臓組織におけるCas依存性オフターゲット編集をもたらすかどうかを評価するために、CIRCLE-seqが実施されて(Tsai et al., 2017)、潜在的なオフターゲット遺伝子座が命名された。指定された遺伝子座から、14個の候補オフターゲット部位が、プロトスペースのPAM近位領域付近の相同性に基づく標的ハイスループット配列決定によって検査するために選択された。検出可能なオフターゲット編集は、 7×10^{11} v4 BE-eVLPで処置されたマウスの肝臓から単離されたゲノムDNAにおいて、これらの遺伝子座のいずれにおいてもバックグラウンドレベルを超える検出はされなかった(図6D)。対照的に、低いが検出可能な(0.1~0.3%)レベルのオフターゲット編集が、ABE8eおよび同じPcsk9標的化sgRNAをコードする二重AAV8ベクター(1×10^{11} ウイルスゲノム)で処置されたマウスの肝臓から単離されたゲノムDNA中のこれらの遺伝子座のうちの3つにおいて検出された(図6D)。これらの結果は、v4 BE-eVLPが同等のオンターゲット編集を提供することができるが、しかし、in vivoでのオフターゲット編集は最小限であり、既存のウイルス送達アプローチと比較して改善されることを実証している。注射1週間後に実施された表現型分析は、未処置マウスと比較して、 7×10^{11} v4 BE-eVLPで処置されたマウスにおいて血清Pcsk9タンパク質レベルの78%の低減を明らかにした(図6E)。全身投与されたeVLPの潜在的毒性を評価するために、 7×10^{11} v4のBE-eVLPの注射の1週間後に、肝細胞障害(Meunier and Larrey, 2019)の重要なバイオマーカーである、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)およびアスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)レベルが調べられた。全てのマウスが正常範囲内のASTおよびALTレベルを呈し、未処置マウスとeVLP処置マウスとの間に識別可能な差はなかった(図13A)。くわえて、肝臓の組織学的検査が、eVLP処置マウスおよび未処置マウスからの試料に対して実施され、eVLP処置に起因する明白な形態学的差異は見出されなかった(図13Bおよび図13C)。まとめると、これらの結果は、v4 BE-eVLPが、明らかな有害な結果も検出されず、かつオフターゲット編集も検出されずに、マウス肝臓において効率的な治療的に関連する塩基編集を媒介することができることを実証している。v4 BE-eVL

Pは、遺伝的失明のマウスモデルにおいて視覚機能を回復させる。

【0557】

最後に、BE-eVLPが、遺伝性網膜障害の成体マウスモデルにおける疾患を引き起こす点突然変異を修正するために適用された。複数の遺伝子における機能喪失突然変異は、様々な形態のレーバー先天性黒内障(LCA)、網膜変性、早発性視覚障害、および最終的な失明に関与する、一遺伝子性網膜障害のファミリーに関連している(Cideciyan, 2010; den Hollander et al., 2008)。遺伝子編集アプローチは、先天性失明を処置および治療の見込みがある; 進行中の臨床試験(NCT03872479)は、AAV送達Cas9ヌクレアーゼを使用して、稀なレーバー先天性黒内障10(LCA10)に関連するCEP290の異常なスプライス部位を妨害する。レチノイドイソメロヒドロラーゼ(isomerohydrolase)RPE65を包含する、他の遺伝子における機能喪失突然変異もまた、精密遺伝子編集剤を用いたin vivo補正の候補である(Sodi et al., 2021; Suh et al., 2021)。

10

【0558】

v4 BE-eVLPがLCAのマウスモデルにおいて視覚機能を回復させることができるかどうかを調査した。rd12マウスは、視覚機能のほぼ完全な喪失を引き起こす、Rpe65(c.130C>T;p.R44X)のエクソン3にナンセンス突然変異を保持する(Pang et al., 2005; Suh et al., 2021)。LCAの原因となる相同突然変異が、最近、人々において同定されており(Zhong et al., 2019)、rd12モデルの臨床的関連性を強調している。ABE8e-NG RNPと、Rpe65(R44X)突然変異を標的化するsgRNA(図7A)(以下、ABE8e-NG-eVLPと称される)とをカプセル化する、v4 BE-eVLPが設計および生産された。ABE8e-NG-eVLPは、VSV-Gでシュドタイプ化されて、網膜色素上皮(RPE)細胞に効率的に形質導入することが可能にされた(Puppo et al., 2014; Suh et al., 2021)。ABE8e-NG-eVLPは、4週齢のrd12マウスへと網膜下で注射された。別のコホートでは、同一のABE8e-NGおよびsgRNA構築物(ABE8e-NG-LV)をコードする複製不全レンチウイルスは、網膜下に注射された。ABEのレンチウイルス送達は、rd12マウスにおいて視覚機能を首尾よく回復させることができることが以前に報告されている(Suh et al., 2021)。

20

【0559】

注射の5週間後、RPE組織が採取され、RPEゲノムDNAのハイスループット配列決定が実施された(図7B)。有望なことに、配列決定分析は、ABE8e-NG-eVLPおよびABE8e-NG-LVが、プロトスペーサの位置A6におけるR44X突然変異の21%および11.5%の補正を、それぞれ、首尾よく媒介したことが明らかになった(図7C)。注目すべきことに、BE-eVLP送達が一過性であるにもかかわらず、ABE8e-NG-eVLPは、ABE8e-NG-LVと比較して標的塩基において1.8倍高い編集を達成した。これらの結果は、v4 BE-eVLPが、マウスRPEにおける病原性突然変異の非常に効率的な補正を可能にすることを実証している。

30

【0560】

標的突然変異の非常に効率的な修正が観察されたが、一方で、編集された対立遺伝子の大部分が、A6単独とは対照的に、A3、A6および/またはA8で変換を含有するように、ABE8e-NGの広い編集ウィンドウ(Richter et al., 2020)に起因して、ABE8e-NG-eVLPおよびABE8e-NG-LVの両方がかなりのレベルのバースタンダー編集(図7C)を誘導することもまた観察された(図7D)。位置A3および位置A8でのバースタンダー編集は、それぞれ、Rpe65ミスセンス突然変異C45RおよびL43Pをもたらす。L43P突然変異は、Rpe65酵素を不活性にすることが以前に示されている(Suh et al., 2021)。実際、網膜細胞応答を評価するために暗所網膜電図検査(ERG)を実施した後、ABE8e-NG-eVLP注射眼およびABE8e-NG-LV注射眼の両方で、視覚機能の最小限のレスキューが観察された(図7E)。これらの結果は、ABE8e-NGの広い塩基編集ウィンドウが、Rpe65(R44X)突然変異を正確に修正するのにあまり適していないことを示唆した。

40

【0561】

この制限に対処するために、ABE8e-NGと比較してより狭い編集ウィンドウを呈するABE7.10-NGをカプセル化する、v4 BE-eVLPが、設計および生産された(Huang et

50

al., 2019; Richter et al., 2020)。成体rd12マウスへのABE7.10-NG-eVLPの網膜下注射は、バイスタンダー編集を実質的に伴わずに、RPEゲノムDNA中のR44X突然変異の12%の補正をもたらした(図7F)。具体的には、ABE7.10-NG-eVLP処置は、バイスタンダー編集なしで11%の完全なR44X補正、ABE8e-NG-eVLP処置と比較して完全な補正の9倍の改善をもたらしたことが観察された(図7G)。さらに、ABE7.10-NG-eVLPによる処置は、同一のABE7.10-NGおよびsgRNA構築物をコードするレンチウイルスであるABE7.10-NG-LVによる処置と比較して、バイスタンダーフリー補正の1.4倍の改善をもたらし、v4 BE-eVLPの一過性送達がレンチウイルスBE送達と比較して同等またはより高い編集効率を達成できることを追加的に実証した(図7G)。ウエスタンブロットを介して、ABE7.10-NG-eVLP処置が、Rpe65タンパク質の発現を回復させることが確認された。特に、ABE7.10-NG-LV処置眼は注射5週間後でもBEタンパク質を発現したが、一方で、ABE7.10-NG-eVLP処置眼は発現せず(図7I)、これは、eVLPを用いて送達されたBEへの*in vivo*での細胞の一過性曝露を実証した。重要なことに、ABE7.10-NG-eVLPは、処置された眼のERGによって測定されるABE7.10-NG-LVと同様のレベルまで、視覚機能を成功裏にレスキューした(図7H、図7J)。

10

【0562】

このレベルのERGレスキューは、視覚発色団の回復および視覚皮質応答の回復を包含する、視覚機能の他の改善に対応することが以前に示されている(Suh et al., 2021)。これらの結果は、eVLPが、疾患表現型の寛解と共に、マウスRPEにおける病原性突然変異の効率的な修正を媒介することができることを実証している。

20

【0563】

編集成果をさらに分析するために、RNAは、処置した眼から抽出され、特異的cDNAの標的ハイスループット配列決定を実施した。予想通り、eVLPで処置した眼では、オンターゲットRpe65転写物において、標的アデニン(A6)の最大64%のA・T→G・C変換が観察された(図14A)。Rpe65ゲノム遺伝子座と比較して補正されたRpe65転写物の割合が高いことは、補正されていないmRNAのナンセンス変異依存分解機構を潜在的に反映している。BEは、低レベルのトランスクリプトームワイドCas非依存性オフターゲットRNA編集を呈することが知られている(Anzalone et al., 2020)。この可能性を調査するために、ABE-eVLPおよびABE-LVによるオフターゲットRNA編集は、処置された眼からのMcm3ap転写物およびPerp転写物、ネイティブTadAデアミナーゼ基質に対するこれらの配列類似性に基づいてオフターゲットRNA編集の潜在的な候補として以前に同定された2つの転写物を配列決定することによって評価された(Jo et al., 2021)。ABE8e-NG-LVによるRNAオフターゲット編集が、両方の転写物で観察され、低いが検出可能なRNAオフターゲット編集が、Perp中の1つのアデニンでABE7.10-NG-LVによって検出された(図14Bおよび図14C)。対照的に、バックグラウンドを超えるRNAオフターゲット編集のいずれも、ABE8e-NG-eVLPまたはABE7.10-NG-eVLPによってこれらの2つの転写物では検出されなかった(図14Bおよび図14C)。まとめると、これらの知見は、高いオンターゲット編集および最小限のオフターゲット編集で*in vivo*にてBE RNPを一過性に送達するためのDNAフリー方法としてのeVLPの治療有用性を強調している。

30

40

50

【表 3 - 1】

表3. 配列例

配列名	配列	配列 番号
v1 BE-VLP	MGQAVTTPLSLTLDHWKDVERTAHNLSVEVRKRRWVTFCSAEW PTFNVGWPRDGTFNPDIIITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEAI AVDPPPWVRPFVHPKPPLSLPPSAPSLPPEPPLSTPPQSSLYPALTSP LNTKPRPQVLPDSGGPLIDLTTEDPPPYRDPGPPSPDGNGDSGEVA PTEGAPDPSPMVSRRLRGRKEPPVADSTTSQAFPLRLGGNGQYQYW PFSSDLYNWKNNNPSFSEDPAKLTALIESVLLTHQPTWDDCQQL LGTLLTGEEKQRVLLEARKAVRGEDGRPTQLPNDINDAFPLERPD WDYNTQRGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVAMSFHWQSAPDIGR KLERLEDLKSKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEER RRAEDVQREKERDRRRHREMSKLLATVVSGQRQDRQGGERRRPQ LDHDQCA YCKEKGHWARDCPKKPRGPRGPRPQASLLTRSSLYPA LTPTGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRH ALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNRRVIGEGWNRAIGLHDPTAHA EIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRV VFGVRNSKRGAAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLC DFYRMPRQVFNAQKKAQSSINS GGSSGGSSGSETPGTSESATPESS GGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIF SNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEK YPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPD	53

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	NSDVKDLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL NLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAQLQSKD TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKA PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYA GYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFD NGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASQSFIERMTNFD KNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEER LKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI ANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQT TQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND KLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVVRKMIKSEQEI GKATAKYF FYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR KVLMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSE EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLELENGRKRMLASAGEL QKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKH YLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRRDKPIREQAENIHL FTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLHQSITGLYETR IDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKRKV	10
v2.1 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVRIAHNQSV DVKKRRWVTFCSAEW PTFNVGWPRDGTFRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEA LAFDPPPWWKPFVHPKPPPPLPPSAPSLPLEPPRSTPPRSSLYPALTP SLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLTTEDPPPYRDP PPPSDRDGNGGEA TPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQY WPFSSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQ LLGTLTGTGEEKQRVLLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFLERP DWDYTTQAGRNLHVHYRQLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSEFIWQSAPDIGR KLERLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEE RRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATVVSQGQKQDRQGGERRRS QLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRPQTSLLTLDDPRS SLYPALTPGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEY WMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVNLRVIGEGWNRAIGLHD PTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHS RIGRVVFGVRNSKRGAAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADEC AALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGSSGSSGSETPGTSESA TPESSGSSGSSGSKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFVVL GNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFHRLSESLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGD LNPDNSVDKDLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKS RRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAQLQ LSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNT EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK NGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIP YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASQSFIER	54
		30
		40

【表 3 - 3】

	MTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPA FLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE DRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRE MIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ SGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL HEHIANLAGSPAIIKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIEMAR ENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGELGSQILKEHPVENTQLQNEK LYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNK VLTRSDKNRGSNDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN LTKAERGGSELKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYD ENDKLIREVVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYL NAVVGTAIIKKYKPLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEIGKAT AKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF ATVRKVLSPQVNVIVKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD WDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIM ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLELENKRKMLA SAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVE QHKHYLDEIIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHDKPIREQA ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI GLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKRKY	
v2.2 BE-VLP	MGQTVTTPSLTLGHWKDVERIAHNSVDVKKRRWVTFCSAEW PTFNVGWPRDGTFRDLITQVKIKVSPGPHGHPDQVPYIVTWEA LAFDPPPWWKPFVHPKPPPLPPSAPSLPEPPRSTPPRSSLYPALTP SLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLTTEDPPPYRDRPPPSDRDNGGGEA TPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGNGQLQY WPFSSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQ LLGTLTGEEKQVRVLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFLERP DWDYTTQAGRNHLVHYRQLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVMSFIWQSA PDIGR KLERLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEE RRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATVVSQGQKDRQGGERRRS QLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRQTSLLTLDDVQA LVLTQGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKYSEVEFSHEYWMR HALTLAKRARDEREVPVGA VLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAH AEIMALRQGGVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGR VVFGRNSKRGAAGSLMNVNLNYPGMNHRVEITEGILADECAALL CDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPES SGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE KYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRILIYLA AHMIKFRGHFLIEGDLNP DNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSK DTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITK APLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGY AGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTF DNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVG PLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNF DKNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSG EQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIER LKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI ANLAGSPAIIKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIEMARENQT TQKGQKNSRERMKRIEELGELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY	55

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

	YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK AERGGSELDDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND KLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYF FYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR KVLSPQVNIIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSE EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLELENGRKRMLASAGEL QKGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKH YLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHL FTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETR IDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKRKV	10
v2.3 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNSVDVKKRRWVTFCSAEW PTFNVPWP RDGT FN RD LITQVKIKVFSPPHGHDPQVPYIVTWEA LAFDPGPWVKPFVHPKPPPLPPSAPSLPLEPPRSTPPRSSLYPALTP SLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLTTEDPPPYRDRPPPSDRDNGGGEA TPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQY WPFSSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQ LLGTLTTGEEKQVRVLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFLERP DWDTYTQAGRNHLVHYRQLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSPADIGR KLERLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEE RRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATVVSQGQKQDRQGGERRRS QLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRPQTSLLTLDDPLQ VLTNLNIERRGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEY WMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVNLRVIGEGWNRAIGLHD PTAHAEIMALRQGGVLMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHS RIGRVVFGVRNSKRGAAGSLMNVNLNYPGMNHRVEITEGILADECA ALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGSSSGSSGSETPGTSESA TPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVL GNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGD LNPDNSDVDLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKILSARLSKS RRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQ LSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK NGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIP YYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPA FLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE DRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRE MIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ SGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL HEHIANLAGSPAIIKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIMAR ENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEK LYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNK VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN LTKAERGGSELDDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYD ENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL NAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKAT AKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF ATVRKVLSPQVNIIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD	56 20 30 40

【表 3 - 5】

	WDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIM ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLA SAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVE QHKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQA ENIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SIT GLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV	
v2.4 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSV DVKKRRWVTFCSAEW PTFNVGWPRDGT FN RD LITQVKIKVFS PGPHGHPDQVPYIVTWEA LAFDPPPWWKPFVHPKPPPLPPSAPSLPLEPPRSTPPRSSLYPALTP SLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDPRPPPSDRDNGGGEA TPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQY WPFSSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQ LLGTLLTGEEKQRVLLLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFLERP DWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSM SFIWQSAPDIGR KLERLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEE RRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATV VSGQKQDRQGGERRRS QLDRDQCA YCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRPQTSLLTLDDTST LLMENSSGDYKDDDDK KRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYW MRHALTLAKRARDEREVPVGAVLV LNNRVIGEGWNR AIGLHDPT AHAEIMALRQGG LVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRI GRVVF GVRNSKRGAAAGSLMNV LNYPGMNHRVEITEGILADECAA LLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATP ESSGGSSGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLG NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYL QEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAY HEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSR RLENLIAQLPGEEKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQL SKD TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDNREKIEKILTFRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERM TNFDKNLPNEKVL PKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMI EERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPA I KKGILQTVKVVD ELVKVMGRHKPENIVIEMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMNYWRQLLN AKLITQRKFDNLT KAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA VVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAK YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT VRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAG ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHLYLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLY ETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV	57

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

v3.1 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSV DVKKRRWVTFCSAEW PTFNVGWPRDGT FNRLITQVKIKVFS PGPHGHPDQVPYIVTWEA LAFDPPPWWKPFVHPKPPPPLPPSAPSLPLEPPRSTPPRSSLYPALTP SLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLITEDPPPYRDP RPPPSDRDGNNGGEA TPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQY WPFSSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQ LLGTLTGEKQQRVLLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFLERP DWDYTTQAGRNHLVHYRQLLAGLQ NAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGR KLERLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEE RRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATV VSGQKQDRQGGERRRS QLDRDQCA YCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGP RQTSLLTLDDTST LLMENSSGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYW MRHALTLAKRARDEREVPVGAVLV LNNRVIGEGWNRAIGLHDPT AHAEMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVT FEPCVMCAGAMIHSRI GRVVFGRVNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAA LLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGSSGGSSGSETPGTSESATP ESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLG NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYL QEIFS NEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHERHPFGNIVDEVAY HEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLA LAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSR RLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQL SKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDNREKIEKILTFRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERM TNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMI EERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKS DGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPA IKKGILQTVKVDEL VKVMGRHKPENIVIAMAREN QTTNQKGNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT KAERGGSEL DKA GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNA VVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAK YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT VRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI IKLPKYSLFELENGRKRMLASAG ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKR VILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLY ETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPK KKKRKVSGGSM SKLLATV VSSGGS LQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTL	58
v3.2 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSV DVKKRRWVTFCSAEW PTFNVGWPRDGT FNRLITQVKIKVFS PGPHGHPDQVPYIVTWEA LAFDPPPWWKPFVHPKPPPPLPPSAPSLPLEPPRSTPPRSSLYPALTP SLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLITEDPPPYRDP RPPPSDRDGNNGGEA TPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQY WPFSSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQ	59

10

20

30

40

50

【表 3 - 7】

	LLGTLTGTGEEKQRVLLLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFLERP DWDYTTQAGRNLHVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGR KLERLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKKEE RRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRS QLDRDQCA YCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRTSLLTLDDTST LLMENSSGDYKDDDDKKRTADGSEFESPCKKRKVSEVEFSHEYW MRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVNLRVIGEGWNRAIGLHDPT AHAEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRI GRVVFGRVNSKRGAAAGSLMNVNLNYPGMNHRVEITEGILADECAA LLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATP ESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYL QEIFSNEMAKVDDSFHRLSESLVEEDKKHERHPFGNIVDEVAY HEKYPTIYHLRKKLVDSDDKADLRLLIYLAHAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVKLFQILVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSR RLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQL SKDYYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPY YVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERM TNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMI EERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQKSG KTILDFLKSDFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKQILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT KAERGGSELDDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYLNA VVGTAIIKKPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAK YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT VRKVLSPQVNVKKTQVQGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDW PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAG ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSTGLY ETRIDLSQLGGSSGSKRTADGSEFEPKKKRKVSGGSPLQVLTNIE RRSGGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTL	10
		20
		30
v3.3 BE-VLP	MGQTVTTPSLTLGHWKDVRIAHNQSV DVKKRRWVTFCSAEW PTFNVGWPRDGTFRDLITQVKIKVFSPPHGHDPQVPYIVTWEA LAFDPPPWWKPFVHPKPPPLPPSAPSLPLEPPRSTPPRSSLYPALTP SLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLTTEDPPPYRDP PPPPSDRDGNNGGEA TPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQY WPFSSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQ LLGTLTGTGEEKQRVLLLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFLERP DWDYTTQAGRNLHVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGR KLERLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKKEE RRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATVVSGQKQDRQGGERRRS QLDRDQCA YCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRTSLLTLDDTST	60
		40

【表 3 - 8】

	LLMENSSGDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYW MRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPT AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRI GRVVFGRVNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAA LLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGSGSSGSSGSETPGTSESATP ESSGSGSSGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLG NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYL QEIFSNEMAKVDDSFHRLSESLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAY HEKYPTIYHLRKKLVDDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSR RLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQL SKD TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ RTFNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERM TNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMI EERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQKSG KTILDFLKSDFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSHE HIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT KAERGGSELSDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAK YFYNSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT VRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAG ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLHQSTITGLY ETRIDLSQLGGDSGSKRTADGSEFEPKKRKVSGGSIRKIFLDGS GGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTL	10
v3.4/v4 BE-VLP	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSV DVKKRRWVTFCSAEW PTFNVGWPRDGTENRDLITQVKIKVFSPGPHGHPDQVPYIVTWEA LAFDPPPWWKPFVHPKPPPPLPPSAPSLPLEPPRSTPPRSSLYPALTP SLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLTTEDPPPYRDRPPPSDRDNGGGEA TPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGNGQLQY WPFSSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQ LLGTLLTGEEKQRVLLLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFLERP DWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVMSFSIWQSPDIGR KLERLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEK RRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATVSGQKQDRQGGERRRS QLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRPQTSLLTLDDSGG SLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLTSTLLMENSS GDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTL AKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMA LRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGV RNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYR MPRQVFNAQKKAQSSINSGSGSSGSSGSETPGTSESATPESSGSS	61

10

20

30

40

50

【表 3 - 9】

	GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNE MAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTI YHLRKKLVDSSTKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSD VDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIA QLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYD DDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYI DGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKN LPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQK KAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASL GTYHDLKKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQSGKTILDFL KSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA GSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKG QKNSRERMKRIEIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN RGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG GLSELDKAGFIKQRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIRE VKVITLKSRLVSDFRKDFQFYKVRINNYYHHAHDAYLNAVVGTA LIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNI MNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGG FDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPI DFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN ELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHARDKPIREQAENIHLFTLTN LGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSTGLYETRIDL SQ LGGDSGGSKRTADGSEFEPKKRKRK	10
v4 BE-VLP (ABE8e-NG)	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSV DVKKRRWVTFCSAEW PTFNVGWPRDGTFRNRLITQVKIKVFSPPGPHGHPDQVPYIVTWEA LAFDPPPWWKPFVHPKPPPLPPSAPSLPLEPPRSTPPRSSLYPALTP SLGAKPKPQVLSDSGGPLIDLLEDPPPYRDRPPPSDRDGNNGGEA TPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQY WPFSSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQ LLGTLTGEQKQVLLLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFLERP DWDYTTQAGRNLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMFSIWQSAPDIGR KLERLEDLKNKTGLDLVREAEKIFNKRETPPEEREERIRRETEEKEE RRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATVVSQKQDRQGGERRRS QLDRDQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRPQTSLLTLDDSGG SLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLTSTLLMENSS GDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRKRKSEVEFSHEYWMRHALTL AKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAHAEIMA LRQGGVLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGV RNSKRGAAGSLMNVNLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYR MPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSS GGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNE MAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTI YHLRKKLVDSSTKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSD VDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIA QLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYD	62

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 0】

	DDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYI DGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKN LPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQK KAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASL GTYHDLKKIHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQSGKTILDFL KSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA GSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKG QKNSRERMKRIEIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVHIVPQSFLKDDSIDNKVLTNRSDKN RGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIRE VKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA LIKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNI MNFVKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGG FVSPTVAYSVLVVAKEVEGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPI DFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASARFLQKGN ELALPSKYVNFYLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRRDKPIREQAENIHLFTLTN LGAPRAFKYFDTTIDRKVYRSTKEVL DATLIHQSTGLYETRIDL SQ LGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRV		10
v4 BE-VLP (ABE7.10-NG)	MGQTVTTPSLTLGHWKDVRIAHNQSV DVKKRRWVTFCSAEW PTFNVGWPRDGTNRDLITQVKIKVSPGPHGHPDQVPYIVTWEA LAFDPPPWWKPFVHPKPPPLPPSAPSLPLEPPRSTPPRSSLYPALTP SLGAKPKQVLSDSGGPLIDLLTEDPPPYRDP RPPPSDRDGNNGEA TPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQY WPFSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQ LLGTLTGTGEEKQRVLLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFLERP DWDYTTQAGRNLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMFSIWQSAPDIGR KLERLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKKEE RRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATVVSQKQDRQGGERRRS QLDRDQCA YCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRPQTSLLTLDDSGG SLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLGSLQLPPLERLTLTSTLLMENSS GDYKDDDDKKRTADGSEFESPKKKRVSEVEFSHEYWMRHALTL AKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTAHAEIMA LRQGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGA RDAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFR MRRQEIKAKKAQSSTDSSGGSSGGSSGSETPGTSESATPSSGGSS GGSSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVHNNRVIG EGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGLVMQNYRLIDATLYVTFEP CVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHYPGMNHR VEITEGILADECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTDSSGGSSGGS SGSETPGTSESATPSSGGSSGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDE YKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHER HPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGV DAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFK SNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL	63	20
			30
			40

【表 3 - 1 1】

	PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEEL LVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPLKD NREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEV VDKGASASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTK VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIDKDFLDNEENEDILE DIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGR LSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDI QKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMG RHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKE HPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIV PQSFLKDDSIDNKVLTNRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQL LNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSLLVSDFRKDFQFYKVR EINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNG ETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRP KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKEVGKSK KLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYS LFELENGRKRMLASARFLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK GSPEDNEQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLS AYNKHARDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPRAFKYFDTTIDRKVYRS TKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPK KKRKV	
MMLV gag	MGQTVTTPLSLTLGHWKDVERIAHNQSV DVKKRRWVTFCSAEW PTFNVGWPRDGTFRNRLITQVKIKVSPGPHGHPDQVPYIVTWEA LAFDPPPWWKPFVHPKPPPLPPSAPSLPLEPPRSTPPRSSLYPALTP SLGAKPKQVLSDSGGPLIDLTTEDPPPYRDRPPPSDRDGNNGEA TPAGEAPDPSPMASRLRGRREPPVADSTTSQAFPLRAGGNGQLQY WPFSSDLYNWKNNNPSFSEDPGKLTALIESVLITHQPTWDDCQQ LLGTLTGTGEEKQRVLLLEARKAVRGDDGRPTQLPNEVDAAFPLERP DWDYTTQAGR NHLVHYRQLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGITQGP NESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDIGR KLERLEDLKNKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEE RRRTEDEQKEKERDRRRHREMSKLLATVVSQKQDRQGGERRRS QLDRDQCA YCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRPQTSLLTLDD	64
NES	LQLPPLERLTL	43
切断部位A(切断可能 リンカー配列)	TSTLLMENSS	1
NLS	PKKKRKV	19
TadA8e	SEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNRRVIGEGW NRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVM CAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAAGSLMNVLNYPGMNHRVEIT EGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSIN	65
Cas9	DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKN LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK VDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL RKKLV DSTDKADLRLLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVK LFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLP GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDL DNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMI KRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGG ASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPH QIHLGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGN	66

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 2】

	SRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPN EKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIV DLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAH LFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSHEHIANLAGSP AIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQK NSRERMKRIEIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGR DMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRG KSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS ELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVK VITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYLNAVVGTA LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMN FFKTEITLANGEIRKPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMP QVNIVKKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFD SPTVAYSVLVVAKEKKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFENGRKRMLASAGELQKGNEL ALPSKYVNFLYLASHYEKLKGPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIE QISEFSKRILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNL GAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQL GGD	
HEK2プロトスペーサ	GAACACAAAGCATAGACTGC	67
HEK2 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCCAGCCC CATCTGTCAAAC	68
HEK2 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGAATGGATTCCCTTG GAAACAATGA	69
HEK2アンプリコン	TGAATGGATTCTTGGAACAATGATAACAAGACCTGGCTGAG CTAACTGTGACAGCATGTGGTAATTTTCCAGCCCGTGGCCCTG TAAAGGAAACTGGAACACAAAGCATAGACTGCGGGGCGGGCC AGCCTGAATAGCTGCAAACAAGTGCAGAATATCTGATGATGTC ATACGCACAGTTTGACAGATGGGGCTGG	70
HEK3プロトスペーサ	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	71
HEK3 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNATGTGGG CTGCCTAGAAAGG	72
HEK3 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCAGCCAACTTGT CAACC	73
HEK3アンプリコン	ATGTGGGCTGCCTAGAAAGGCATGGATGAGAGAAGCCTGGAG ACAGGGATCCCAGGGAAACGCCCATGCAATTAGTCTATTTCTG CTGCAAGTAAGCATGCATTTGTAGGCTTGATGCTTTTTTCTGC TTCTCCAGCCCTGGCCTGGGTCAATCCTTGGGGCCCAGACTGAG CACGTGATGGCAGAGGAAAGGAAGCCCTGCTTCCTCCAGAGGG CGTCGCAGGACAGCTTTTCTAGACAGGGGCTAGTATGTGCAG CTCCTGCACCGGGATACTGGTTGACAAGTTTGGCTGGG	74
BCL11Aエンハンサ プロトスペーサ	TTTATCACAGGCTCCAGGAA	75
BCL11A HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGCCAGAA AAGAGATATGGCATC	76
BCL11A HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGAGAGCCTTCCGAA AGAGG	77
BCL11Aアンプリコン	GCCAGAAAAGAGATATGGCATCTACTCTTAGACATAACACACC AGGGTCAATACAACCTTTGAAGCTAGTCTAGTGCAAGCTAACAG TTGCTTTTATCACAGGCTCCAGGAAGGGTTTGGCCTCTGATTAG GGTGGGGGCGTGGGTGGGGTAGAAGAGGACTGGCAGACCTCT CCATCGGTGGCCGTTTGGCCAGGGGGCCTCTTTCGGAAGGCT CTCT	78

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 3】

mDnm1プロトスペース	AACAGCTCTGAACGAGACCC	79
mDnm1 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCCTTCGG GCATAGCATGGTC	80
mDnm1 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTATATGCCTCGGCAT CGGTCC	81
mDnm1アンプリコン	TATATGCCTCGGCATCGGTCCCCGCCCTCACCCCCACCCTGCGT GGCACCTACCGCTGCGGACATGGTCCGGGAGCGAGCCTGCCG GGGAGGCAAGCGCAGGCACTCGGGCTGGAGCTGTTCCGCGCTGG CATCTTGCAGGTTGCAGACGACAGAACAGCTCTGAACGAGACC CCGGCTTTTTTCGCGCGCGCGAAACCAATTGGGAGGGGGCGGC GCAAGCGGAAGCAGCATGTACCACACAGGGCAAGAGAGTGGG GGAAGACCATGCTATGCCCCAAGG	82
BCL11Aオフターゲット1プロトスペース	CCTATCACTGGCTCCAGGAA	83
BCL11Aオフターゲット1 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNACCTGTG GGCATCCTGAGTTGC	84
BCL11Aオフターゲット1 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACGGCCCCACTCC TCTCA	85
BCL11Aオフターゲット1アンプリコン	ACCTGTGGGCATCCTGAGTTGCTTCTGATGTCCACCCATCACC TTGACCTGCTCAGAGCAGAGCATTGTTCTGAAATCTGAGGCATT GTCTGTCCCCTGGCCTATCACTGGCTCCAGGAAGGGCCTAGT GTCTCTGACCAGCTCTAGATCACCTCCTCCTCCTGAGCCCT GTACGTTGCCAGGCTGATGAGAGGAGTGGGGCCGTGA	86
BCL11Aオフターゲット2プロトスペース	CTTATCATAGCCCCAGGAA	87
BCL11Aオフターゲット2 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCTTGGCG CAGTTCTGTGTATG	88
BCL11Aオフターゲット2 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACATGCTGTGAGAA AATGAAGTGT	89
BCL11Aオフターゲット2アンプリコン	CTTGGCGCAGTTCCTGTGTATGGATATTCTTACAGAATCGCTAC TCTCCCTCTCCTTTGAGCTGGCCTAGCTTTGGCTTATCATAGGC CCAGGAAAGGCCAGGGGACTGGGGTACCGGTTAGAGGGATA TAAAAGTTCATTCTGCCTTGTACGTATGTTAATTGATTAGAAC ACTTCATTTTCTCACAGCATGTA	90
HEK2オフターゲット1プロトスペース	GAACACAATGCATAGATTGC	91
HEK2オフターゲット1 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGTGTGGA GAGTGAGTAAGCCA	92
HEK2オフターゲット1 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGGTAGGATGATT CAGGCA	93
HEK2オフターゲット1アンプリコン	GTGTGGAGAGTGAGTAAGCCAGAACACAATGCATAGATTGCCG GTAAATAGGTTTAGATTTCATCCATTTTTAAAAAATGGTGTGGGA GCATTAAATATGTATATAGTAGATATGGAAAAATGATTCTCAT AATAACTGACATTTCTGTTTCACAAGAAAATTATTTTACATTAT ATGTATATTTTACATAAATTATACATAGTCATTTAAAAAGCTCA AATAGTGCAAAAACAATATGGAGAATTGCCTGAAATCATCCTA CCGT	94
HEK3オフターゲット1プロトスペース	CACCCAGACTGAGCACGTGC	95
HEK3オフターゲット1 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTCCCTG TTGACCTGGAGAA	96
HEK3オフターゲット1 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACTGTACTTGGCCT GACCA	97
HEK3オフターゲット1アンプリコン	TCCCCTGTTGACCTGGAGAAGCATGAACCAGTCAAAAAGTTTA AAGACAAGAGCATTAACTGCACCAGTGGGCAGCTCAGCTCAGA	98

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 4】

	CACCAGTAGCGTGGGCACCCAGACTGAGCACGTGCTGGAGCCC AAGAAATGCAGAGACCTGTGCACCTCTGGTCAGGGCAAGTACA GTG	
HEK3オフターゲット 2プロトスペーサ	GACACAGACTGGGCACGTGA	99
HEK3オフターゲット 2 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTTGGTGT TGACAGGGAGCAA	100
HEK3オフターゲット 2 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGAGATGTGGGCAG AAGGG	101
HEK3オフターゲット 2アンプリコン	TTGGTGTGACAGGGAGCAACTTCACAGTCCCAGGCATCAGGA CACAGACTGGGCACGTGAGGGAAGCCCAAGGGAGAGGACTGG TGTAATCGAGGCTGACTCCACTTTTAATGTTTGACTGATGATAG GTTTCAAGTCTCACTAAGTCTCCTTCCCCTTCTGCCACATCTCA G	102
HEK3オフターゲット 3プロトスペーサ	AGCTCAGACTGAGCAAGTGA	103
HEK3オフターゲット 3 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTGAGAGG GAACAGAAGGGCT	104
HEK3オフターゲット 3 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCCAAAGGCCCAA GAACCT	105
HEK3オフターゲット 3アンプリコン	TGAGAGGGAACAGAAGGGCTAAGACTAAAAGGAACAGAGGAG TTCATAGTGAGCGGTAAAGAGCTCAGACTGAGCAAGTGAGGGG CTCAGCCTCCCATGGAGGACAGGGGGCTGGGGCCCCTGGCTGA TGTCTGGACTGAAGCCCCACGCCCAGAGGTTCTTGGGCCTTG GAC	106
dSaCas9 R-ループ1 プロトスペーサ	GTGGTAGACAGCATGTGTCCTA	107
dSaCas9 R-ループ1 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTGCAGTC TCCTGCTTCTCTG	108
dSaCas9 R-ループ1 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATTGGTGGAGTGCTCTGTG TTTG	109
dSaCas9 R-ループ1 アンプリコン	TGGTGGAGTGCTCTGTGTTTGTCTTTATAAACCCAGATGAGAGG ATGAAGGCAACAAGCTTCTGTACCAACATACATGCCCCTTTGC CTCAAGTCTGGTTATTTTAGGGGGATGCTAGGTTGCTTTGGGTC TACCTTACTGAGAAAATGGCCCCAGGTCATTGTCATGTCCAGTT GTGGTAGACAGCATGTGTCCTAAAGGGTATATTCACATGCATG TGCAAAAATACAGGGGTCCTTCTAACCCCTATCACAGAGAAGCA GGAGACTGC	110
dSaCas9 R-ループ2 プロトスペーサ	ATTTACAGCCTGGCCTTTGGGG	111
dSaCas9 R-ループ2 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGGACATT TCCACCGCAAAATG	112
dSaCas9 R-ループ2 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATGCTACAGAAAGGTCAG CAGC	113
dSaCas9 R-ループ2 アンプリコン	GCTACAGAAAGGTCAGCAGCTATATTTAACCTCAGACCAGGGT GCGGTGGGAGATCTGGTTTCCGGAAGACGGAATGGGGAGAAG GGCAGGTTCCCGAGGCGCCAGACACCCAATCCTCCCGGTGA CATTTACAGCCTGGCCTTTGGGGTCGGGTCAACGCTAGGCTGG CAGGGGAAGGGCGGGGCCGTGAGGTGAGCCGGCGCTGCAGGA AGGGGCCACCACCAGAGGGGCCATTTGCGGTGGAAATGTCC	114
dSaCas9 R-ループ3 プロトスペーサ	GTGTCAGGTAATGTGCTAAACA	115
dSaCas9 R-ループ3 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTGCACC TAGCCTCCATGTC	116

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 5】

dSaCas9 R-ループ3 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGTGGCATCCAGAGACAT	117
dSaCas9 R-ループ3 アンプリコン	AAGTGTTCAGCTGCTTTTCTTTTCAATTTATCCACATATAATTACTATAATTGCTAAACATTTATTTAGTGTCAGGTAATGTGCTAAACAGAGAGTTACTGCTCAGACATGTAATAATAATAAATAACACATCAAATAACCATAACCATTTTAAGCTGTAGTATTATGAAGGGAAATCTGGAGCAAAGAGAATAGACTGTAGGGAAACCAGTTAAGAAATAGGACATGGAGGCTAGGTGCAG	118
dSaCas9 R-ループ4 プロトスペーサ	GGTGGAGGAGGGTGCATGGGGT	119
dSaCas9 R-ループ4 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNGGAGGTGGAGAGAGGATGT	120
dSaCas9 R-ループ4 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTGAGGTCTAGGAACCCG	121
dSaCas9 R-ループ4 アンプリコン	TTTGCTTATCCAGAAAAGGGAGTGATTGCTTCCAGGGGCCTCAGGGGAATAAATCATAGAATCCTGGACAAGGTTTGAAGGACAGGTAGGATTTGGGTGGGTGGAGGAGGGTGCATGGGGTCAGAAATTGTAACCGAAAACCTCATTCCAGGTGGATAGAGAAAATTTCTAGTGTGTTGTTTTTAAACTATTTGGGGGACTGGCACAGACCCTTTTTGAATACCTGATGGGCTCACATTTCTGTCTGAATCCCAG	122
dSaCas9 R-ループ5 プロトスペーサ	TCTGCTTCTCCAGCCCTGGC	123
dSaCas9 R-ループ5 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNATGTGGGCTGCCTAGAAAGG	72
dSaCas9 R-ループ5 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAGCCAAACTTGTCAACC	73
dSaCas9 R-ループ5 アンプリコン	ATGTGGGCTGCCTAGAAAGGCATGGATGAGAGAAGCCTGGAGACAGGGATCCCAGGGAAACGCCCATGCAATTAGTCTATTTCTGCTGCAAGTAAGCATGCATTTGTAGGCTTGATGCTTTTTTTCTGCTTCTCCAGCCCTGGCCTGGGTCAATCCTTGGGGCCCAGACTGAGCACGTGATGGCAGAGGAAAGGAAGCCCTGCTTCTCCAGAGGGCGTCGCAGGACAGCTTTTCCTAGACAGGGGCTAGTATGTGCAGCTCCTGCACCGGGATACTGGTTGACAAGTTTGGCTGGG	74
dSaCas9 R-ループ6 プロトスペーサ	GATGTTCCAATCAGTACGCA	124
dSaCas9 R-ループ6 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCATTGCGAGAGGCGTATC	125
dSaCas9 R-ループ6 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGGTCCCAGGTGCTGAC	126
dSaCas9 R-ループ6 アンプリコン	CATTGCAGAGAGGCGTATCATTTTCGCGGATGTTCCAATCAGTACGCAGAGAGTCGCCGTCTCCAAGGTGAAAGCGGAAGTAGGGCTTCGCGCACCTCATGGAATCCCTTCTGCAGCACCTGGATCGCTTTTCCGAGCTTCTGGCGGTCTCAAGCACTACCTACGTCAGCACCTGGGACCCC	127
COL7A1 (R185X) プロトスペーサ	CAACTCACTTCAGTCTCTCA	128
COL7A1 (R185X) HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCTGGTGGACACAGCTG	129
COL7A1 (R185X) HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGCAGTCGTGCACAC	130
COL7A1 (R185X) アンプリコン	CTCTCCGGGAAACGAGGGGCGAGTAGTGCTCTCAAGATGCTGAAATTCATTGACGAAGAAGAAGAAGTCACTGGTGGGCTGTGAGGCACTCACTTCAGTCTCTCAGGGTCAGCATTCTTGATCCCTGAAAGTGACGACCCATCAGGACTCAGTCACCCACATGCTCTCTGACTGCCCCACCCCCCAGCTGACCTGTCACTCCTGCTCGGTCTTACCC	131

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 6】

	ACAGCAAATAGCTTGACCCCTGCCCTTCAGCCTTTGGGCAGC TGTGTCCACCAG	
Idua (W392X) プロト スペーサ	ACTCTAGGCAGAGGTCTCAA	132
Idua (W392X) HTS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTTAGGGT AGGAAGCCAGATGCTA	133
Idua (W392X) HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGTGCGTGGGTGTC ATC	134
Idua (W392X) アンブ リコン	TTAGGGTAGGAAGCCAGATGCTAGGTATGAGAGAGCCAACAG CCTCAGCCCTCTGCTTGGCTTATAGATGGAGAACAACCTCTAGGC AGAGGTCTCAAAGGCTGGGGCTGTGTTGGACAGCAATCATACA GTGGGTGTCTTGGCCAGCACCCATCACCCTGAAGGCTCCGCAG CGGCCTGGAGTACCACAGTCTCATCTACACTAGTGATGACAC CCACGCACAC	135
B2M プロトスペーサ	CTTACCCCACTTAACTATCT	136
B2M HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTGTCTTT CAGCAAGGACTGGTCT	137
B2M HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGACTCATTACAGGG TAGTATGGC	138
B2M アンブリコン	GGGACTCATTACAGGGTAGTATGGCCATAGACCTTTTTTATATCA AAGCAGCTTTATGATATGACTACTCATACACAACCTTTCAGCAGC TTACAAAAGAATGTAAGACTTACCCCACTTAACTATCTTGGGCT GTGACAAAGTCACATGGTTCACACGGCAGGCATACTCATCTTT TCAGTGGGGGTGAATTCACTGTAGTACAAGAGATAGAAAGACC AGTCTTGCTGAAAGACA	139
C11TA プロトスペーサ	CACTCACCTTAGCCTGAGCA	140
C11TA HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNAGGCATG CAAGTTTGGTCTCTGA	141
C11TA HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCTGCAGCCAGCAC GATGT	142
C11TA アンブリコン	CCCTGCAGCCAGCACGATGTGGGTTCCTGCGCTCTGCAGCCCC CCAGCTCAGCACCTGACCGGTATCCGGGGCCCCACTCACCTTA GCCTGAGCAGGGATGCAGCGAGCGAAGGCAGGGCCTCGGCGA GTTTGTAGGCACCCAGGTCAGTGATGTTGTTCTGGGACAGACT GCGGGGACACAGTGAGGGGGAGGGCTCAGGACCAAACCTTGCA TGCCT	143
mPesk9 プロトスペーサ	CCCATACCTTGGAGCAACGG	144
mPesk9 HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNGGCTGCA CTTAGAGACCACC	145
mPesk9 HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGAAGAGCTGATGC TCGCC	146
mPesk9 アンブリコン	GGCTGCACCTTAGAGACCACCAGACGGCTAGATGAGCAGAGAA GACCCCCGAAGAGCATCACCCCAACCCCAAAGCAACGCCGTTG CCTGGCACCCATACCTTGGAGCAACGGCGGAAGGTGGCGGTGG CCACATGTGCGGCCTCATCAGCCAGGCCATCTCCTGGGACGG GAGGGCGAGCATCAGCTCTTCAT	147
mPesk9 OT1 プロトス ペーサ	CCCCTACCTTGGGGCAACAG	148
mPesk9 OT1 HTS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNAAGTATG TTGGGACCCCTTGGCTGG	149
mPesk9 OT1 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGCCTGTTCTACTG ACTATGGGG	150
mPesk9 OT1 アンブリ コン	AAGTATGTTGGGACCCCTTGGCTGGGCTTCTTGGCCTCTCTAGAA CCAAGATGTCACTTCTGCACACCAAGAGCTACCCCTACCTTGG GGCAACAGTGGAAGCCATGGCTGGAGAAAGCAAACAATTCTT	151

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 7】

	GAAGGTGACAGATTCTCCTGGGAAGGGACTTAGCCCCATAGTC AGTAGAACAGGCCA	
mPesk9 OT2プロトス ペーサ	ACCATACCTAAGAGCAAACCT	152
mPesk9 OT2 IITS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGACAGAC ACAGGGAAGCCTTGGG	153
mPesk9 OT2 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAACCTTCCAGGAGAG AGAAACCTGT	154
mPesk9 OT2アンブリ コン	GACAGACACAGGGAAGCCTTGGGGAGCCGGAGGCTTGGCCAG GAGCTCAGGGGTCCCTGGGCAGATGCTCACACTGGGCAGAAGG TCACACCATACTAAGAGCAAACCTGGGGCCCCAACGACTGAGT GTGCTGAGAGCCATCCTTGGCTCATTCTCAAAAAACAGGTTTC TCTCTCCTGGAAGGTT	155
mPesk9 OT3プロトス ペーサ	CCCACCCTTTGGAGAACGG	156
mPesk9 OT3 IITS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTGGCAAG GGACAGGGTCAGC	157
mPesk9 OT3 IITS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGCTGGTGGCAGAG GTGTGG	158
mPesk9 OT3アンブリ コン	TGGCAAGGGACAGGGTCAGCTCTTCACTCCCATTCCATCTGGG GCAGCTCACCTGCATCCAAGCCAATAGAGACAGCCCTACTGTG TTGCTCAGTTGAGGTACGGGGCCCCACCCTTTGGAGAACGGTGG GGGTGGGAGCTATGCCAACACTTCTGCTCTAACACCCTCACAG CTAGCTCACCCACACCTCTGCCACCAGCT	159
mPesk9 OT4プロトス ペーサ	CCCAGCCTTGGGGCAACGG	160
mPesk9 OT4 IITS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTTCAAGC AATCACGAGACACTCAG	161
mPesk9 OT4 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCACCACCCAGCAG CTTTATTG	162
mPesk9 OT4アンブリ コン	TTCAAGCAATCACGAGACACTCAGTTTGGATCCCCAGAGCCCA CATAAAAGATCAGACACAGAGTGCATGCCTGTAACCCAGCCT TGGGGCAACGGAGGCTCTGAAGCTCGTCGGTTAGCCAGCTGAA GCATATCCATGAGGTTTAGTGTTGGAGCCTGTCTCAATAAAGCT GCTGGGTGGTGGG	163
mPesk9 OT5プロトス ペーサ	CACATATCTAGGAGCAACGG	164
mPesk9 OT5 IITS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTCTCAGG CGACCTGGTTTCTGC	165
mPesk9 OT5 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTGCCAGATGCGTC CGATCA	166
mPesk9 OT5アンブリ コン	TCTCAGGCGACCTGGTTTCTGCAAAGGGCAGGGTTGGCTTTATG CTGAGTCCTACAGATCTTAGACCCCCCCCCCAAACTTAAACAC ATATCTAGGAGCAAGGAGGGGTCATGAAAAGATAGAGCCTGCT TTGGCAGACTATAGAACAGAACACTAAGGATTTAACTTACTAG TGAAATGATCGGACGCATCTGGCAGA	167
mPesk9 OT6プロトス ペーサ	CCCACACCCGGAGCAACGG	168
mPesk9 OT6 IITS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGCCAGCC CTGCCTGGAAGTTAG	169
mPesk9 OT6 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGACCTCCGGGATTC TCAGCCC	170
mPesk9 OT6アンブリ コン	GCCAGCCCTGCCTGGAAGTTAGCCATGGAGGATGGAGCTGAAC TTGACCTTTGCGGTTACAGCCCACACCCGGAGCAACGGGGAG GTCGTCGTGAGCCCAGTCAGTCGTTTGGTTGCAAAGAACTTTT	171

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 8】

	AATAAGGGAAGTTTTTCAGTCATGGAATGAGAGGTGAGGTGAAG TGGGCTGAGAATCCCGGAGGTCA	
mPesk9 OT7プロトス ペーサ	TCCATACCCGGAGCAACGA	172
mPesk9 OT7 HTS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGCTTCCT GTCTGCAATTGGGGTCT	173
mPesk9 OT7 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTAGGTTGCGGGGC TCAGGA	174
mPesk9 OT7アンブリ コン	GCTTCCTGTCTGCAATTGGGGTCTTTGTTGTCCTTCTGGCTGTCC TTCTCCTCTTCATCAACAAGAAGCTATGCTCTGAAAACCTAAGA GGGCATCCATACCCGGAGCAACGAGGGAAGAGAAAGCACTCG AGAGACAAGACTGGAGGCCACACAGGAAGTGGTAAGCACCAT GCTTTATGTTTCTGAGCCCCGCAACCTACT	175
mPesk9 OT8プロトス ペーサ	TTCATCCTTGGAGCAACGG	176
mPesk9 OT8 HTS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCCAGCAG GTCCCCAGTGACG	177
mPesk9 OT8 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCCACCTGGGTGT GTCCA	178
mPesk9 OT8アンブリ コン	CCAGCAGGTCCCCAGTGACGCAAGCCAGCAGGGGGTGGGAAG CTTCAGGAGAAAAAGGACATGGAGCAGTAGGGTATGACATTCAA AGCCTGACAGCGTCTCTACCAGCCCTTCATCCTTGGAGCAACG GTGAGATGAACATTTATGTTCACTGCAGAGTTGAACAGAAT CCAGAACAGCCAGCCTTTTGAGCTACATAACAAAAGTATCATG TGCACATGTGGACACACCCAGGTGGGTA	179
mPesk9 OT9プロトス ペーサ	TCTGTACCATGGAGCAAAGG	180
mPesk9 OT9 HTS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNAACCTCC ACGGGGGTATCTGAGG	181
mPesk9 OT9 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCTGGCAAGTGGG GTACTGG	182
mPesk9 OT9アンブリ コン	AACCTCCACGGGGGTATCTGAGGTCTTCTGCTGTAGTGTGCCT TTCAGTCATCAATAACATGGGCAGGTACCATCCCCCTCCGATGTG GGCGAGTACCACAAGTTTGCAAGGTCACAGGGCTGCTCTGTAC CATGGAGCAAAGGCGGAAAGGAAACCTTGGGTGTCTGATGCAT TGGAACCCAGTACCCCACTTGCCAGGT	183
mPesk9 OT10プロト スペーサ	ACCATAACCAAGAGCAACAG	184
mPesk9 OT10 HTS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGTCTAAA TGGGCAAGCAATCCCCT	185
mPesk9 OT10 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAGGATCCCACAGG GTCCCTCT	186
mPesk9 OT10アンブリ コン	GTCTAAATGGGCAAGCAATCCCCTGTCCAGGGTCGATTACAGGG CTGTCTGTGAGAAGTCTCGGTGTCTTATGGAGGATTTCTACTGA TGAGTAAAACACCATAACCAAGAGCAACAGGGGAGGGAAGGG TCTCCTGCAGCTTACATCTGACAGTCATCCAGGGTAGTCAGTGA AGGGACTCTCTCAGAAGGACCCTGTGGGATCCTGG	187
mPesk9 OT11プロト スペーサ	TCCATAACTCAGAGCAACAG	188
mPesk9 OT11 HTS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTCCCCAG AGCCAGGGAATATCA	189
mPesk9 OT11 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGCTCCGATGGA AGGATGGG	190
mPesk9 OT11アンブリ コン	TCCCCAGAGCCCAGGGAATATCATGGGGGAATATAAGAGCTAT AGGATGAGAATTGGTGCTACAGAATGCTGTTTGTGGATAAGAC	191

10

20

30

40

50

【表 3 - 1 9】

	ATGGCTGATGCATCCATAA C T C A G A G C A A C A G T G G T G A C T T G C T C A A G A C C T T C A C A A G A C T G A G C T G T C A A C C T T C T A C C C T G G A T G G A A G A C G G G A T G G T A A G A T C C C A T C C T T C C A T C G G A G C A A C A	
mPesk9 OT12プロト スペーサ	GCCATACCCTGGGGCAGCAG	192
mPesk9 OT12 HTS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTGTGGAA CCCACCCCCGATACA	193
mPesk9 OT12 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTGCTGATGGGCAA GGCATTG	194
mPesk9 OT12アンプ リコン	TGTGGAACCCACCCCCGATACACACACACCTTAAGTCGTACCT CTCTCAACATGTCTGCTGAAGCCACCTGCCCCGCGAGAGTAAG CAGGCGCCATACCCTGGGGCAGCAGTGGAGGCTATGATTTAGA ATAACTGTGGTCCGGTCTCTTAACATTTGCCGCTGTATTCACT CTAAGTTTAATGAGGGACAAATGCCTTGCCCATCAGCACT	195
mPesk9 OT13プロト スペーサ	GCAACACCTTGAGCAACTG	196
mPesk9 OT13 HTS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCCACCAG AAGCGCCCCAGAA	197
mPesk9 OT13 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGGAATCGCCTCCA CTGCC	198
mPesk9 OT13アンプ リコン	CCACCAGAAGCGCCCCAGAACTCCTTGCTGGCTAGTTGGCCTCT CATCAGCTCAGCCTGCCCACTCAGCGTGGGGCTGTAGGTGCA ACACCTTGGAGCAACTGAGGTATCAACAGCAGAGATAGAGATG GAGGAAGCTGCAGCAACAGAGGCAGTGGAGGCGATTCCCC	199
mPesk9 OT14プロト スペーサ	GACATCCTTGAGCAACTG	200
mPesk9 OT14 HTS_順 方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGTTCTTA TTGGCCAGGGAGCCTT	201
mPesk9 OT14 HTS_逆 方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCCCCAAGTGACAG GAACCACG	202
mPesk9 OT14アンプ リコン	GTTCTTATTGGCCAGGGAGCCTTTCTGCAGTTCTTTGTAAATCC AGCTAAAATGCAAACACTGACATCAATCATTTGAAATGAGGTG GCTGTGAGGTCCTCAGACATCCTTGAGCAACTGTGGGTGAGT ATTCTGATGGGAATTTTCTCTCTTCATCCAGGAGTGAGGGCTC ACTTGGTGCCCCAACCTACAGGCTGGGTGGAGGGCTGGGCACCA CGTGGTTCTGTCACTTGGGGAG	203
Rpe65 (r44X) gDNAプ ロトスペーサ	ACATCAGAGGAGACTGCCAG	204
Rpe65 (r44X) gDNA HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNAGCTGAC AAATAACAAATAGGCACA	205
Rpe65 (r44X) gDNA HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCTCTACTCTGGTG AGGTCAG	206
Rpe65 (r44X) gDNAア ンプリコン	GGCTCTACTCTGGTGAGGTCAGTCATGGACTTACCTTCTGTGGT ATGTGACATGGCCCTCCTTGAAGTCAAACCTTGTGCAAAAGGGC TTGTCCATCAAACAGGTGATAGAAAGGCTCAGATCCAACCTTCA AAGAGCCCTGGCCACATCAGAGGAGACTGCCAGTGAGCCAG AGGGGAATCCTGCCTGCAGCAAAGTGAGATATCAGGTGGTACT ACTTACTAGATTTTCTATGTGCCTATTTGTTATTTGTCAGCT	207
Rpe65 (r44X) cDNAプ ロトスペーサ	ACATCAGAGGAGACTGCCAG	204
Rpe65 (r44X) cDNA HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTGTCCTC ACCACTAACAGCT	208
Rpe65 (r44X) cDNA HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTCTCAGTCATTGC TCGAACA	209

10

20

30

40

50

【表 3 - 20】

Rpe65 (r44X) cDNA アンプリコン	CTTCTCAGTCATTGCTCGAACATAAGCATCAGTGCGGATGAATC TTCTGTGGTATGTGACATGGCCCTCCTTGAAGTCAAACCTTGTGC AAAAGGGCTTGTCCATCAAACAGGTGATAGAAAGGCTCAGATC CAACTTCAAAGAGCCCTGGCCACATCAGAGGAGACTGCCAGT GAGCCAGAGGGGAATCCTGCCTGTGACATGAGCTGTTAGTGGT GAGGACA	210
Mcm3ap cDNA HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNGCTTCCA AAGCCTGCGCCTG	211
Mcm3ap cDNA HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCATGGAACTTCCT CAGCGGC	212
Mcm3ap cDNA アンプリコン	GCTTCCAAAGCCTGCGCCTGTGTA CTCTGACTCGGACCTGGTAC AGGTGGTGGACGAGCTCATCCAGGAGGCTCTGCAAGTGGACTG TGAGGAAGTCAGCTCCGCTGGGGCAGCCTACGTAGCCGCAGCT CTGGGCGTTTCCAATGCTGCTGTGGAGGATCTGATTACTGCTGC GACCACGGGCATTCTGAGGCACGTTGCCGCTGAGGAAGTTTCC ATGG	213
Perp cDNA HTS_順方向	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNGCCATCG CCTTCGACATCAT	214
Perp cDNA HTS_逆方向	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAACAAGCATCTGGG GTCCAC	215
Perp cDNA アンプリコン	GCCATCGCCTTCGACATCATCGCGCTGGCCGGCCGCGGCTGGC TGCAGTCTAGCAACCACATCCAGACATCGTCGCTTTGGTGGAG GTGTTTCGACGAGGGCGGGCAGCGGCTCCTACGACGATGGC TGCCAGAGCCTCATGGAGTACGCATGGGGACGAGCAGCTGCAG CCACGCTTTTCTGTGGCTTTATCATCCTGTGCATCTGCTTCATTC TCTCGTTCTTCGCCCTGTGTGGACCCAGATGCTTGTT	216
sgRNA 順方向プライマーのqPCR検出	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNGTTTTATC ACAGGCTCCAGGAAG	217
sgDNA 逆方向プライマーのqPCR検出	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGCCACTTTTTCA AGTTGATAAC	218
BEエンコードDNA 順方向プライマーのqPCR検出	ACGAGCACATTGCCAATCTG	219
BEエンコードDNA 逆方向プライマーのqPCR検出	GCCATTTTCGATCACGATGTTC	220
オンターゲット (Pesk9) スペーサ	CCCATACCTTGGAGCAACGG CGG	221
OT1 (ELP3イントロン) スペーサ	GACATACCTTAAAGCAAAGG AGG	222
OT2 (遺伝子間) スペーサ	CCCCTACCTTGGGGCAACAG TGG	223
OT3 (LINC02006 lncRNA) スペーサ	CCCACCCTTTGGAGAACGG TGG	224
OT4 (遺伝子間) スペーサ	CCCAG-CCTTGGGGCAACGG AGG	225
OT5 (遺伝子間) スペーサ	CACATATCTAGGAGCAAGG AGG	226
OT6 (DDX6イントロン) スペーサ	CCCACACCCGGAGCAACGG GGA	227
OT7 (RP11-314D7.4 lncRNA) スペーサ	TCCATACCC-GGAGCAACGA GGG	228
OT8 (FAM66D lncRNA) スペーサ	TTCATCCTTGGAGCAACGG TGA	229

10

20

30

40

50

【表 3 - 2 1】

OT9(RIKEN cDNA 4933424G05遺伝子 lncRNA) スペーサ	TCTGTACCATGGAGCAAAGG CGG	230
OT10(K1h13イントロ ン) スペーサ	ACCATAACCAAGAGCAACAG GGG	231
OT11(遺伝子間) スペ ーサ	TCCATAACTCAGAGCAACAG TGG	232
OT12(NCAM1イントロ ン) スペーサ	GCCATACCCTGGGGCAGCAG TGG	233
OT13(SNRNP40イント ロン) スペーサ	GCAACACCTTGGAGCAACTG AGG	234
OT14(Fryイントロン) スペーサ	GACATCCTTGGAGCAACTG TGG	235

10

【 0 5 6 4】

参考文献

Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., et al. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 34, 154-156.

20

【 0 5 6 5】

Akcakaya, P., Bobbin, M. L., Guo, J. A., Malagon-Lopez, J., Clement, K., Garcia, S. P., Fellows, M. D., Porritt, M. J., Firth, M. A., Carreras, A., et al. (2018). In vivo CRISPR editing with no detectable genome-wide off-target mutations. *Nature* 561, 416-419.

【 0 5 6 6】

Alanis-Lobato, G., Zohren, J., McCarthy, A., Fogarty, N. M. E., Kubikova, N., Hardman, E., Greco, M., Wells, D., Turner, J. M. A., and Niakan, K. K. (2021). Frequent loss of heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118.

【 0 5 6 7】

Anzalone, A. V., Koblan, L. W., and Liu, D. R. (2020). Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol* 38, 824-844.

30

【 0 5 6 8】

Campbell, L. A., Coke, L. M., Richie, C. T., Fortuno, L. V., Park, A. Y., and Harvey, B. K. (2019). Gelsicle-Mediated Delivery of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complex for Inactivating the HIV Provirus. *Mol Ther* 27, 151-163.

【 0 5 6 9】

Chandler, R. J., Sands, M. S., and Venditti, C. P. (2017). Recombinant Adeno-Associated Viral Integration and Genotoxicity: Insights from Animal Models. *Hum Gene Ther* 28, 314-322.

40

【 0 5 7 0】

Chen, P. J., Hussmann, J. A., Yan, J., Knipping, F., Ravisankar, P., Chen, P. F., Chen, C., Nelson, J. W., Newby, G. A., Sahin, M., et al. (2021). Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell* 184, 5635-5652 e5629.

【 0 5 7 1】

Choi, J. G., Dang, Y., Abraham, S., Ma, H., Zhang, J., Guo, H., Cai, Y., Mikkelsen, J. G., Wu, H., Shankar, P., et al. (2016). Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing. *Gene Ther* 23, 627-633.

50

[0 5 7 2]

Cideciyan, A.V. (2010). Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog Retin Eye Res* 29, 398-427.

[0 5 7 3]

Clement, K., Rees, H., Canver, M.C., Gehrke, J.M., Farouni, R., Hsu, J.Y., Cole, M.A., Liu, D.R., Joung, J.K., Bauer, D.E., et al. (2019). CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. *Nat Biotechnol* 37, 224-226.

[0 5 7 4]

Cohen, J., Pertsemlidis, A., Kotowski, I.K., Graham, R., Garcia, C.K., and Hobbs, H.H. (2005). Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 37, 161-165.

[0 5 7 5]

Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley, T.H., Jr., and Hobbs, H.H. (2006). Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 354, 1264-1272.

[0 5 7 6]

Cronin, J., Zhang, X.Y., and Reiser, J. (2005). Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* 5, 387-398.

[0 5 7 7]

David, R.M., and Doherty, A.T. (2017). Viral Vectors: The Road to Reducing Genotoxicity. *Toxicol Sci* 155, 315-325.

[0 5 7 8]

Davis, K.M., Pattanayak, V., Thompson, D.B., Zuris, J.A., and Liu, D.R. (2015). Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat Chem Biol* 11, 316-318.

[0 5 7 9]

den Hollander, A.I., Roepman, R., Koenekoop, R.K., and Cremers, F.P. (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27, 391-419.

[0 5 8 0]

Deverman, B.E., Pravdo, P.L., Simpson, B.P., Kumar, S.R., Chan, K.Y., Banerjee, A., Wu, W.L., Yang, B., Huber, N., Pasca, S.P., et al. (2016). Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol* 34, 204-209.

[0 5 8 1]

Doman, J.L., Raguram, A., Newby, G.A., and Liu, D.R. (2020). Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors. *Nat Biotechnol* 38, 620-628.

[0 5 8 2]

Doudna, J.A. (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* 578, 229-236.

[0 5 8 3]

Feher, A., Boross, P., Sperka, T., Miklossy, G., Kadas, J., Bagossi, P., Oroszlan, S., Weber, I.T., and Tozser, J. (2006). Characterization of the murine leukemia virus protease and its comparison with the human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Gen Virol* 87, 1321-1330.

[0 5 8 4]

Fitzgerald, K., Frank-Kamenetsky, M., Shulga-Morskaya, S., Liebow, A., Bettencourt, B.R., Sutherland, J.E., Hutabarat, R.M., Clausen, V.A., Karsten, V., Cehelsky, J., et al. (2014). Effect of an RNA interference drug on the synthesis of

10

20

30

40

50

f proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet* 383, 60-68.

[0 5 8 5]

Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., and Liu, D. R. (2017). Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464-471.

[0 5 8 6]

Gaudelli, N. M., Lam, D. K., Rees, H. A., Sola-Esteves, N. M., Barrera, L. A., Born, D. A., Edwards, A., Gehrke, J. M., Lee, S. J., Liquori, A. J., et al. (2020). Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. *Nat Biotechnol* 38, 892-900.

[0 5 8 7]

Gee, P., Lung, M. S. Y., Okuzaki, Y., Sasakawa, N., Iguchi, T., Makita, Y., Hozumi, H., Miura, Y., Yang, L. F., Iwasaki, M., et al. (2020). Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nat Commun* 11, 1334.

[0 5 8 8]

Giannoukos, G., Ciulla, D. M., Marco, E., Abdulkerim, H. S., Barrera, L. A., Bothmer, A., Dhanapal, V., Gloskowski, S. W., Jayaram, H., Maeder, M. L., et al. (2018). UDiTaS, a genome editing detection method for indels and genome rearrangements. *BMC Genomics* 19, 212.

[0 5 8 9]

Golczak, M., Kiser, P. D., Lodowski, D. T., Maeda, A., and Palczewski, K. (2010). Importance of Membrane Structural Integrity for RPE65 Retinoid Isomerization Activity. *Journal of Biological Chemistry* 285, 9667-9682.

[0 5 9 0]

Hamilton, J. R., Tsuchida, C. A., Nguyen, D. N., Shy, B. R., McGarrigle, E. R., Sandoval Espinoza, C. R., Carr, D., Blaesche, F., Marson, A., and Doudna, J. A. (2021). Targeted delivery of CRISPR-Cas9 and transgenes enables complex immune cell engineering. *Cell Rep* 35, 109207.

[0 5 9 1]

Hooper, A. J., Marais, A. D., Tanyanyiwa, D. M., and Burnett, J. R. (2007). The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis* 193, 445-448.

[0 5 9 2]

Huang, T. P., Zhao, K. T., Miller, S. M., Gaudelli, N. M., Oakes, B. L., Fellmann, C., Savage, D. F., and Liu, D. R. (2019). Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. *Nat Biotechnol* 37, 626-631.

[0 5 9 3]

Humbel, M., Ramosaj, M., Zimmer, V., Regio, S., Aeby, L., Moser, S., Boizot, A., Sipion, M., Rey, M., and Deglon, N. (2021). Maximizing lentiviral vector gene transfer in the CNS. *Gene Ther* 28, 75-88.

[0 5 9 4]

Indikova, I., and Indik, S. (2020). Highly efficient 'hit-and-run' genome editing with unconcentrated lentivectors carrying Vpr. Prot. Cas9 protein produced from RRE-containing transcripts. *Nucleic Acids Res* 48, 8178-8187.

[0 5 9 5]

Jang, H. K., Jo, D. H., Lee, S. N., Cho, C. S., Jeong, Y. K., Jung, Y., Yu, J., Kim, J. H., Wo

10

20

30

40

50

o, J.S., and Bae, S. (2021). High-purity production and precise editing of DNA base editing ribonucleoproteins. *Sci Adv* 7.

[0596]

Jo, D.H., Jang, H.-K., Cho, C.S., Han, J.H., Ryu, G., Jung, Y., Bae, S., and Kim, J.H. (2021). Therapeutic adenine base editing corrects nonsense mutation and improves visual function in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *bioRxiv*.

[0597]

Johnson, S., Wheeler, J.X., Thorpe, R., Collins, M., Takeuchi, Y., and Zhao, Y. (2018). Mass spectrometry analysis reveals differences in the host cell protein species found in pseudotyped lentiviral vectors. *Biologicals* 52, 59-66.

[0598]

Kaczmarczyk, S.J., Sitaraman, K., Young, H.A., Hughes, S.H., and Chatterjee, D. K. (2011). Protein delivery using engineered virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16998-17003.

[0599]

Kato, S., Kuramochi, M., Kobayashi, K., Fukabori, R., Okada, K., Uchigashima, M., Watanabe, M., Tsutsui, Y., and Kobayashi, K. (2011). Selective neural pathway targeting reveals key roles of thalamostriatal projection in the control of visual discrimination. *J Neurosci* 31, 17169-17179.

[0600]

Koblan, L.W., Doman, J.L., Wilson, C., Levy, J.M., Tay, T., Newby, G.A., Maianti, J. P., Raguram, A., and Liu, D.R. (2018). Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol* 36, 843-846.

[0601]

Koblan, L.W., Erdos, M.R., Wilson, C., Cabral, W.A., Levy, J.M., Xiong, Z.M., Tavares, U.L., Davison, L.M., Gete, Y.G., Mao, X., et al. (2021). In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *Nature* 589, 608-614.

[0602]

Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., and Liu, D.R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420-424.

[0603]

Kosicki, M., Tomberg, K., and Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol* 36, 765-771.

[0604]

Lazzarotto, C.R., Malinin, N.L., Li, Y., Zhang, R., Yang, Y., Lee, G., Cowley, E., He, Y., Lan, X., Jividen, K., et al. (2020). CHANGE-seq reveals genetic and epigenetic effects on CRISPR-Cas9 genome-wide activity. *Nature Biotechnology* 38, 1317-1327.

[0605]

Leibowitz, M.L., Papathanasiou, S., Doerfler, P.A., Blaine, L.J., Sun, L., Yao, Y., Zhang, C.Z., Weiss, M.J., and Pellman, D. (2021). Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Genet* 53, 895-905.

[0606]

LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.M., Krawczyk, M., Otten, L.A., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., and Reith, W. (2004). Mini-review: Specificity

10

20

30

40

50

and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol* 34,1513-1525.

【0607】

Levy, J.M., Yeh, W.H., Pendse, N., Davis, J.R., Hennessey, E., Butcher, R., Koblan, L.W., Comander, J., Liu, Q., and Liu, D.R. (2020). Cytosine and adenine base editing of the brain, liver, retina, heart and skeletal muscle of mice via adeno-associated viruses. *Nat Biomed Eng* 4,97-110.

【0608】

Lyu, P., Javidi-Parsijani, P., Atala, A., and Lu, B. (2019). Delivering Cas9/sgRNA ribonucleoprotein (RNP) by lentiviral capsid-based bionanoparticles for efficient 'hit-and-run' genome editing. *Nucleic Acids Res* 47,e99.

【0609】

Lyu, P., Lu, Z., Cho, S.I., Yadav, M., Yoo, K.W., Atala, A., Kim, J.S., and Lu, B. (2021). Adenine Base Editor Ribonucleoproteins Delivered by Lentivirus-Like Particles Show High On-Target Base Editing and Undetectable RNA Off-Target Activities. *CRISPR J* 4,69-81.

【0610】

Mangeot, P.E., Dollet, S., Girard, M., Ciancia, C., Joly, S., Peschanski, M., and Lottreau, V. (2011). Protein transfer into human cells by VSV-G-induced nanovesicles. *Mol Ther* 19,1656-1666.

【0611】

Mangeot, P.E., Risson, V., Fusil, F., Marnef, A., Laurent, E., Blin, J., Mournetas, V., Massourides, E., Sohier, T.J.M., Corbin, A., et al. (2019). Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nat Commun* 10,45.

【0612】

Mercuri, E., Darras, B.T., Chiriboga, C.A., Day, J.W., Campbell, C., Connolly, A.M., Iannaccone, S.T., Kirschner, J., Kuntz, N.L., Saito, K., et al. (2018). Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 378,625-635.

【0613】

Meunier, L., and Larrey, D. (2019). Drug-Induced Liver Injury: Biomarkers, Requirements, Candidates, and Validation. *Front Pharmacol* 10,1482.

【0614】

Milone, M.C., and O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 32,1529-1541.

【0615】

Musunuru, K., Chadwick, A.C., Mizoguchi, T., Garcia, S.P., DeNizio, J.E., Reiss, C.W., Wang, K., Iyer, S., Dutta, C., Clendaniel, V., et al. (2021). In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. *Nature* 593,429-434.

【0616】

Newby, G.A., and Liu, D.R. (2021). In vivo somatic cell base editing and prime editing. *Mol Ther* 29(11),3107-3124.

【0617】

Newby, G.A., Yen, J.S., Woodard, K.J., Mayuranathan, T., Lazzarotto, C.R., Li, Y., Sheppard-Tillman, H., Porter, S.N., Yao, Y., Mayberry, K., et al. (2021). Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice. *Nature* 595,295-302.

【0618】

Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K.Y., et al. (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 353.

[0619]

Osborn, M.J., Newby, G.A., McElroy, A.N., Knipping, F., Nielsen, S.C., Riddle, M.J., Xia, L., Chen, W., Eide, C.R., Webber, B.R., et al. (2020). Base Editor Correction of COL7A1 in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Patient-Derived Fibroblasts and iPSCs. *J Invest Dermatol* 140, 338-347 e335.

[0620]

Pan, D., Gunther, R., Duan, W., Wendell, S., Kaemmerer, W., Kafri, T., Verma, I.M., and Whitley, C.B. (2002). Biodistribution and toxicity studies of VSVG-pseudotyped lentiviral vector after intravenous administration in mice with the observation of in vivo transduction of bone marrow. *Mol Ther* 6, 19-29.

[0621]

Pang, J.J., Chang, B., Hawes, N.L., Hurd, R.E., Davisson, M.T., Li, J., Noorwez, S.M., Malhotra, R., McDowell, J.H., Kaushal, S., et al. (2005). Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Mol Vis* 11, 152-162.

[0622]

Parr-Brownlie, L.C., Bosch-Bouju, C., Schoderboeck, L., Sizemore, R.J., Abraham, W.C., and Hughes, S.M. (2015). Lentiviral vectors as tools to understand central nervous system biology in mammalian model organisms. *Front Mol Neurosci* 8, 14.

[0623]

Puppo, A., Cesi, G., Marrocco, E., Piccolo, P., Jacca, S., Shayakhmetov, D.M., Parks, R.J., Davidson, B.L., Colloca, S., Brunetti-Pierri, N., et al. (2014). Retinal transduction profiles by high-capacity viral vectors. *Gene Ther* 21, 855-865.

[0624]

Rao, A.S., Lindholm, D., Rivas, M.A., Knowles, J.W., Montgomery, S.B., and Ingelsson, E. (2018). Large-Scale Phenome-Wide Association Study of PCSK9 Variants Demonstrates Protection Against Ischemic Stroke. *Circ Genom Precis Med* 11, e002162.

[0625]

Rees, H.A., Komor, A.C., Yeh, W.H., Caetano-Lopes, J., Warman, M., Edge, A.S.B., and Liu, D.R. (2017). Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat Commun* 8, 15790.

[0626]

Rees, H.A., and Liu, D.R. (2018). Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet* 19, 770-788.

[0627]

Renner, T.M., Tang, V.A., Burger, D., and Langlois, M.A. (2020). Intact Viral Particle Counts Measured by Flow Virometry Provide Insight into the Infectivity and Genome Packaging Efficiency of Moloney Murine Leukemia Virus. *J Virol* 94.

[0628]

Richter, M.F., Zhao, K.T., Eton, E., Lapinaite, A., Newby, G.A., Thuronyi, B.W., Wilson, C., Koblan, L.W., Zeng, J., Bauer, D.E., et al. (2020). Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility

10

20

30

40

50

and activity. *Nat Biotechnol* 38,883-891.

【0629】

Rothgangl, T., Dennis, M. K., Lin, P. J. C., Oka, R., Witzigmann, D., Villiger, L., Qi, W., Hruzova, M., Kissling, L., Lenggenhager, D., et al. (2021). In vivo adenine base editing of PCSK9 in macaques reduces LDL cholesterol levels. *Nat Biotechnol* 39,949-957.

【0630】

Serreze, D. V., Leiter, E. H., Christianson, G. J., Greiner, D., and Roopenian, D. C. (1994). Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2m null mice are diabetes and insulinitis resistant. *Diabetes* 43,505-509.

10

【0631】

Sodi, A., Banfi, S., Testa, F., Della Corte, M., Passerini, I., Pelo, E., Rossi, S., Simonelli, F., and Italian, I. R. D. W. G. (2021). RPE65-associated inherited retinal diseases: consensus recommendations for eligibility to gene therapy. *Orphanet J Rare Dis* 16,257.

【0632】

Song, Y., Liu, Z., Zhang, Y., Chen, M., Sui, T., Lai, L., and Li, Z. (2020). Large-Fragment Deletions Induced by Cas9 Cleavage while Not in the BEs System. *Mol Ther Nucleic Acids* 21,523-526.

【0633】

Stadtmauer, E. A., Fraietta, J. A., Davis, M. M., Cohen, A. D., Weber, K. L., Lancaster, E., Mangan, P. A., Kulikovskaya, I., Gupta, M., Chen, F., et al. (2020). CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* 367.

20

【0634】

Suh, S., Choi, E. H., Leinonen, H., Foik, A. T., Newby, G. A., Yeh, W. H., Dong, Z., Kiser, P. D., Lyon, D. C., Liu, D. R., et al. (2021). Restoration of visual function in adult mice with an inherited retinal disease via adenine base editing. *Nat Biomed Eng* 5,169-178.

【0635】

Swiech, L., Heidenreich, M., Banerjee, A., Habib, N., Li, Y., Trombetta, J., Sur, M., and Zhang, F. (2015). In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 33,102-106.

30

【0636】

Taylor, A. W. (2009). Ocular immune privilege. *Eye (Lond)* 23,1885-1889. Thorne, R. G., and Nicholson, C. (2006). In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103,5567-5572.

【0637】

Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Malagon-Lopez, J., Topkar, V. V., Aryee, M. J., and Jung, J. K. (2017). CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nat Methods* 14,607-614.

40

【0638】

Turchiano, G., Andrieux, G., Klermund, J., Blattner, G., Pennucci, V., El Gaz, M., Monaco, G., Poddar, S., Mussolino, C., Cornu, T. I., et al. (2021). Quantitative evaluation of chromosomal rearrangements in gene-edited human stem cells by CAST-Seq. *Cell Stem Cell* 28,1136-1147 e1135.

【0639】

Voelkel, C., Galla, M., Maetzig, T., Warlich, E., Kuehle, J., Zychlinski, D., Bode, J., Cantz, T., Schambach, A., and Baum, C. (2010). Protein transduction from retroviral Gag precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107,7805-7810.

50

[0 6 4 0]

Wang,D.,Shukla,C.,Liu,X.,Schoeb,T.R.,Clarke,L.A.,Bedwell,D.M.,and Keeling,K.M.(2010).Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. *Mol Genet Metab* 99,62-71.

[0 6 4 1]

Wang,D.,Zhang,F.,and Gao,G.(2020).CRISPR-Based Therapeutic Genome Editing:Strategies and In Vivo Delivery by AAV Vectors.*Cell* 181,136-150.

[0 6 4 2]

Webber,B.R.,Lonetree,C.L.,Kluesner,M.G.,Johnson,M.J.,Pomeroy,E.J.,Diers,M.D.,Lahr,W.S.,Draper,G.M.,Slipek,N.J.,Smeester,B.A.,et al.(2019).Highly efficient multiplex human T cell engineering without double-strand breaks using Cas9 base editors.*Nat Commun* 10,5222.

[0 6 4 3]

Wei,T.,Cheng,Q.,Min,Y.L.,Olson,E.N.,and Siegwart,D.J.(2020).Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing.*Nat Commun* 11,3232.

[0 6 4 4]

Wheeler,J.X.,Jones,C.,Thorpe,R.,and Zhao,Y.(2007).Proteomics analysis of cellular components in lentiviral vector production using Gel-LC-MS/MS.*Proteomics Clin Appl* 1,224-230.

[0 6 4 5]

Wu,D.T.,and Roth,M.J.(2014).MLV based viral-like-particles for delivery of toxic proteins and nuclear transcription factors.*Biomaterials* 35,8416-8426.

[0 6 4 6]

Yao,X.,Lyu,P.,Yoo,K.,Yadav,M.K.,Singh,R.,Atala,A.,and Lu,B.(2021).Engineered extracellular vesicles as versatile ribonucleoprotein delivery vehicles for efficient and safe CRISPR genome editing.*J Extracell Vesicles* 10,e12076.

[0 6 4 7]

Yeh,W.H.,Chiang,H.,Rees,H.A.,Edge,A.S.B.,and Liu,D.R.(2018).In vivo base editing of post-mitotic sensory cells.*Nat Commun* 9,2184.

[0 6 4 8]

Yeh,W.H.,Shubina-Oleinik,O.,Levy,J.M.,Pan,B.,Newby,G.A.,Wornow,M.,Burt,R.,Chen,J.C.,Holt,J.R.,and Liu,D.R.(2020).In vivo base editing restores sensory transduction and transiently improves auditory function in a mouse model of recessive deafness.*Sci Transl Med* 12.

[0 6 4 9]

Yu,Y.,Leete,T.C.,Born,D.A.,Young,L.,Barrera,L.A.,Lee,S.J.,Rees,H.A.,Ciaramella,G.,and Gaudelli,N.M.(2020).Cytosine base editors with minimized unguided DNA and RNA off-target events and high on-target activity.*Nat Commun* 11,2052.

[0 6 5 0]

Zeng,J.,Wu,Y.,Ren,C.,Bonanno,J.,Shen,A.H.,Shea,D.,Gehrke,J.M.,Clement,K.,Luk,K.,Yao,Q.,et al.(2020).Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells.*Nat Med* 26,535-541.

[0 6 5 1]

Zhang,W.,Cao,S.,Martin,J.L.,Mueller,J.D.,and Mansky,L.M.(2015).Morphology and ultrastructure of retrovirus particles.*AIMS Biophys* 2,343-369.

10

20

30

40

50

【0652】

Zhong, Z., Rong, F., Dai, Y., Yibulayin, A., Zeng, L., Liao, J., Wang, L., Huang, Z., Zhou, Z., and Chen, J. (2019). Seven novel variants expand the spectrum of RPE65-related Leber congenital amaurosis in the Chinese population. *Mol Vis* 25, 204-214.

【0653】

この出願は、様々な発行済み特許、公開特許出願、雑誌論文、および他の公刊物を参照し、これらの全ては参照により本明細書に組み込まれる。組み込まれる参照のいずれかと本明細書との間に矛盾がある場合、本明細書がコントロールする(control)ものとする。くわえて、先行技術に属する本発明のいずれか特定の態様は、特許請求の範囲のいずれかの1つ以上からはっきりと除外される場合がある。かかる態様は当業者には知られていると思われるので、それらは、除外が本明細書においてはっきりと表明されていない場合であっても、除外される場合がある。本発明のいずれか特定の態様は、先行技術の存在に関するか否かにかかわらず、いずれかの特許請求の範囲から、いずれかの理由で除外され得る。

【0654】

本開示の好ましい態様が本明細書に示され記載されてきたが、一方で、そのような態様が例としてのみ提供されることは、当業者には明らかであろう。本開示から逸脱することなく、当業者には多数の変形、変更、および置換が思い浮かぶであろう。本開示を実施する際に、本開示の態様に対する様々な代替形態が採用されてもよいことを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本開示の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法および構造、ならびにそれらの等価物が、それによって包含されることが意図される。

【図面】

【図1】

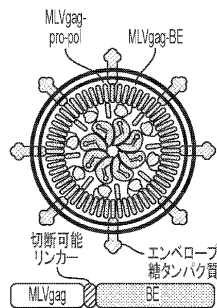


図1A

【図2A-B】

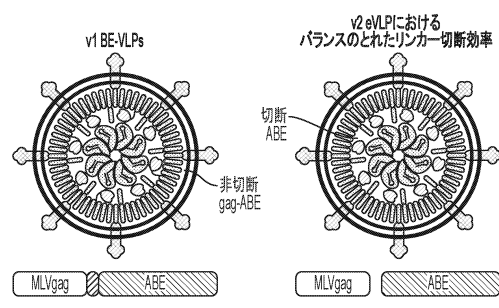


図2A

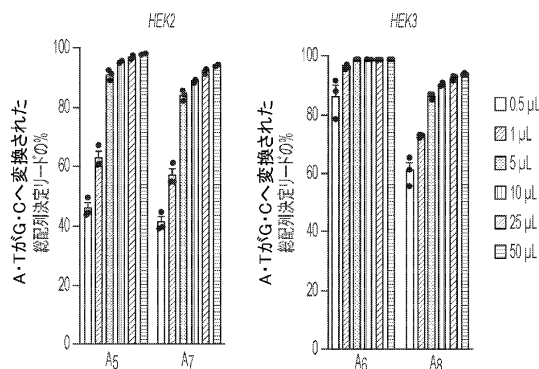


図1B

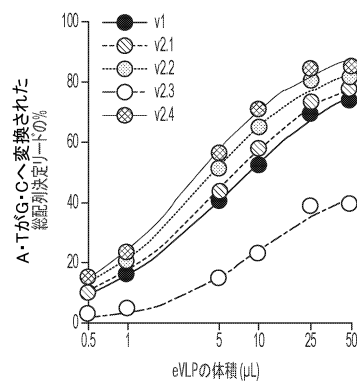


図2B

10

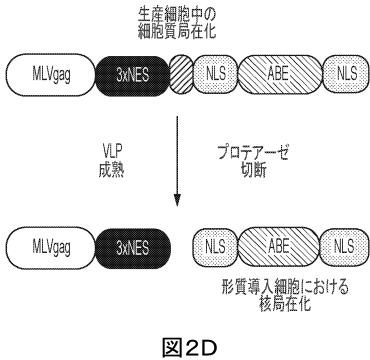
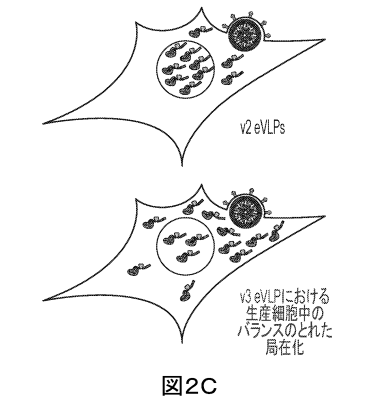
20

30

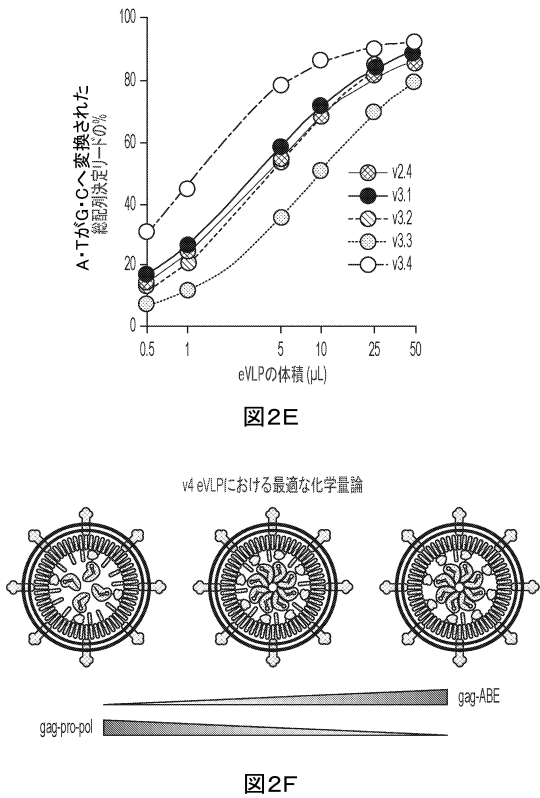
40

50

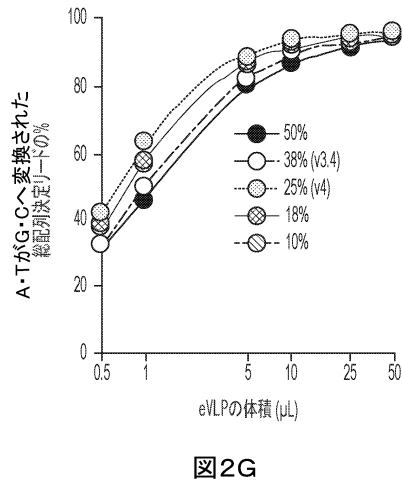
【図 2 C - D】



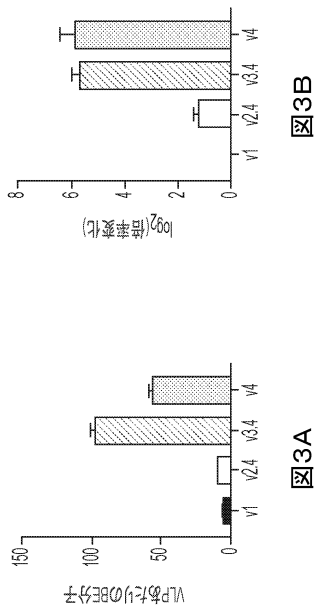
【図 2 E - F】



【図 2 G】



【図 3 A - B】



10

20

30

40

50

【図 3 C - D】

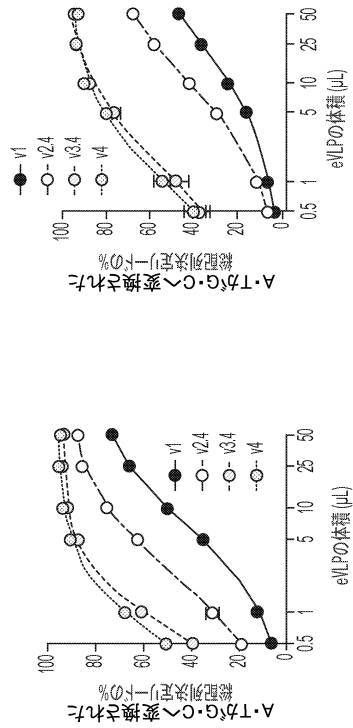


図 3D

図 3C

【図 3 E - F】

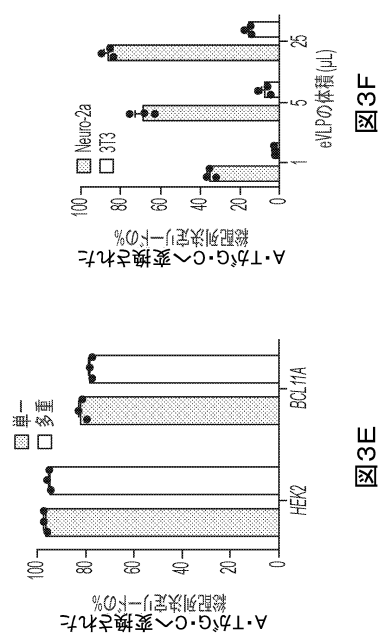


図 3F

図 3E

【図 3 G】

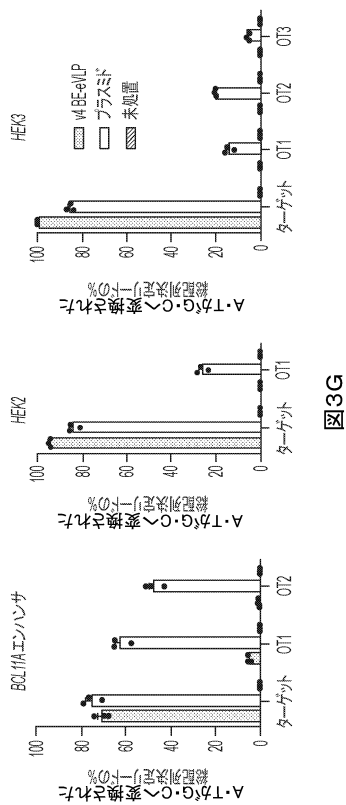


図 3G

【図 3 H】

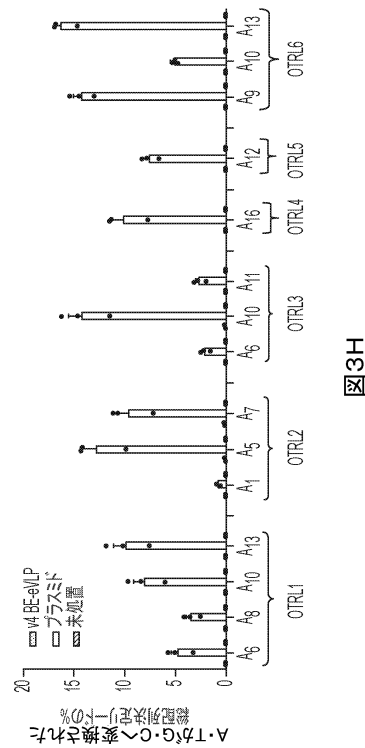


図 3H

10

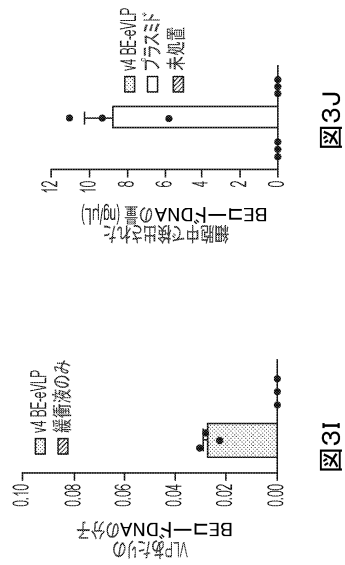
20

30

40

50

【図 3 I - J】



【図 4 A - B】

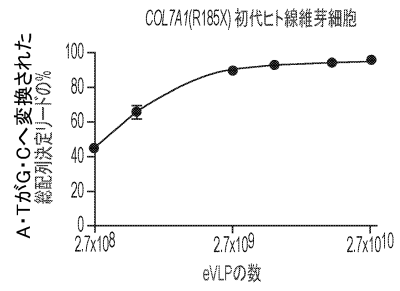


図4A

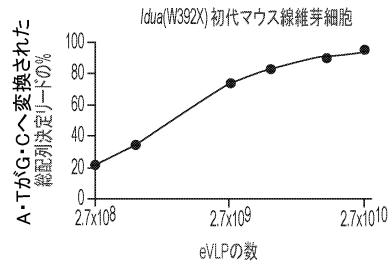


図4B

【図 4 C】

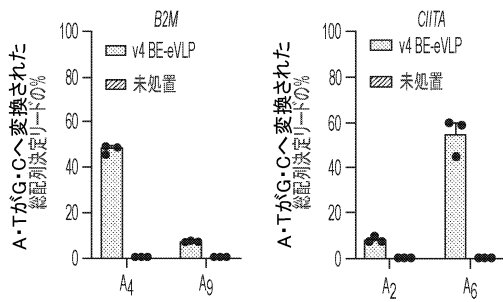


図4C

【図 5 A】

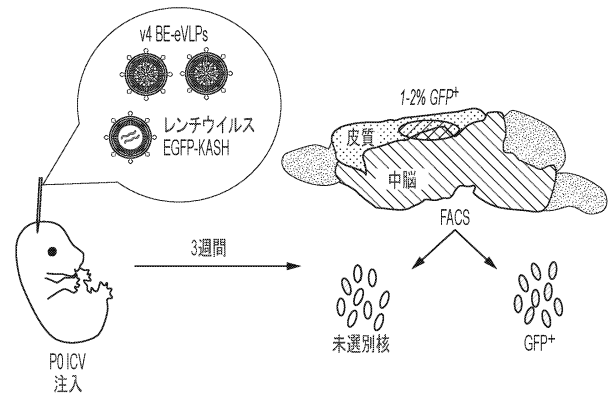


図5A

10

20

30

40

50

【図 5 B】

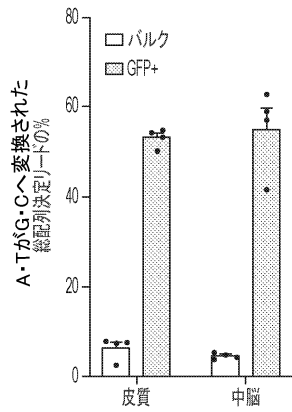


図5B

【図 6 A】

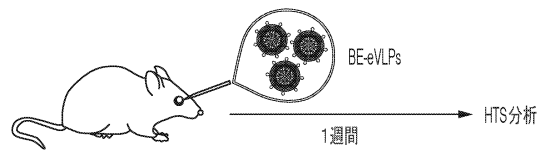


図6A

10

【図 6 B - C】

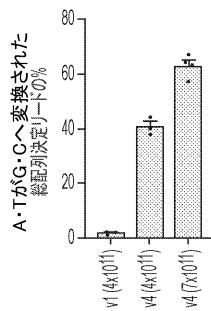


図6B

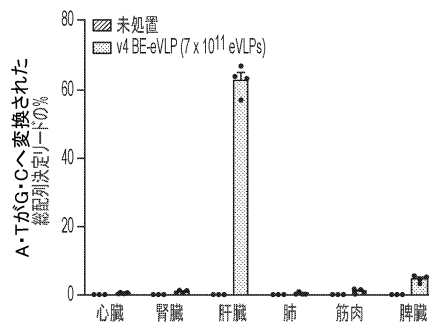


図6C

【図 6 D】

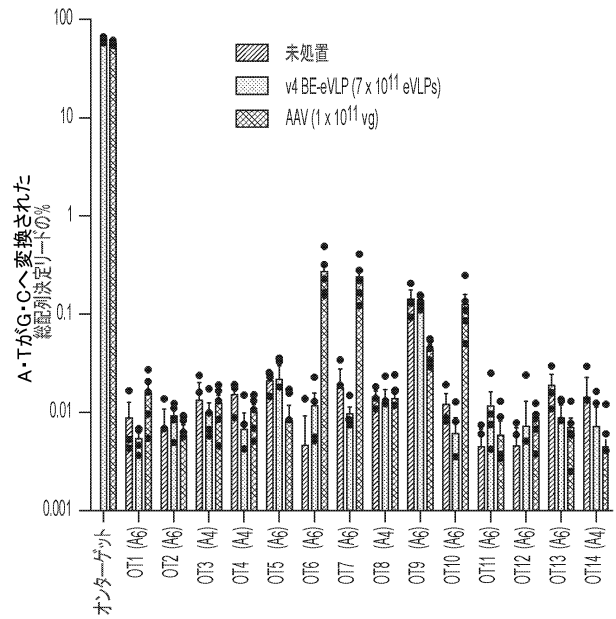


図6D

20

30

40

50

【図 6 E】

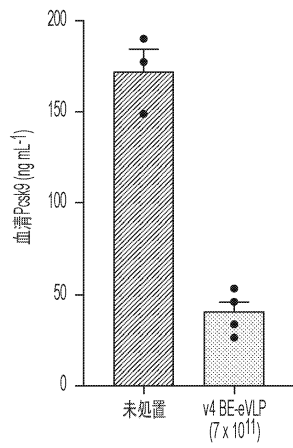


図6E

【図 7 A】

W37 L38 T39 G40 S41 L42 L43 R44X C45 G46 P47
TGGCTCACTGGCAGTCTCCTCTGATGTGGGCCA
ACCGAGTGACCGTCAGAGGAGACTACACCCGGT

図7A

【図 7 B - C】

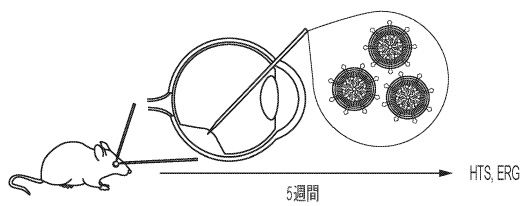


図7B

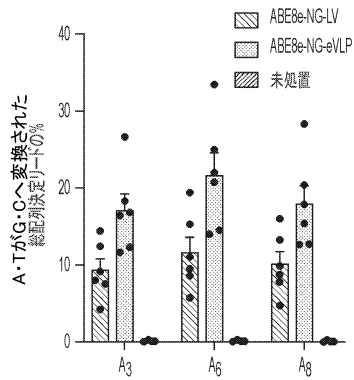


図7C

【図 7 D - E】

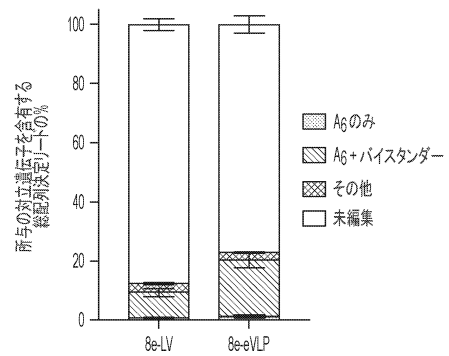


図7D

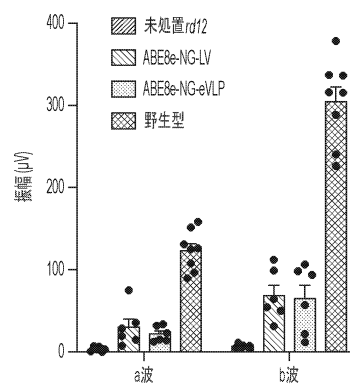


図7E

10

20

30

40

50

【図 7 F - G】

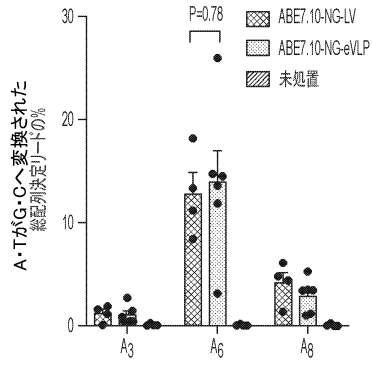


図 7F

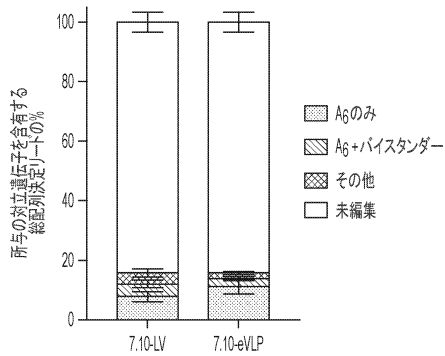


図 7G

【図 7 H - I】

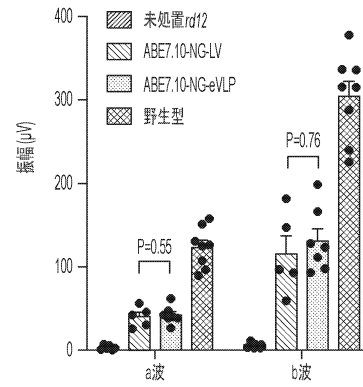


図 7H

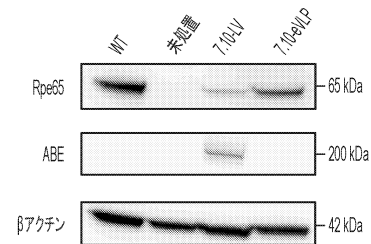


図 7I

【図 7 J】

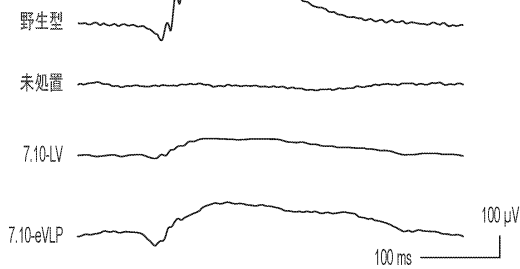


図 7J

【図 8 A - B】

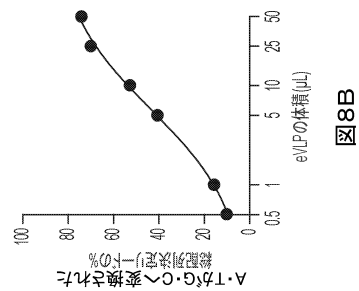


図 8B

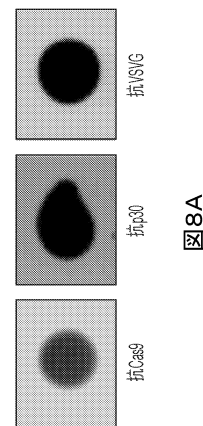


図 8A

10

20

30

40

50

【図 10 A - C】

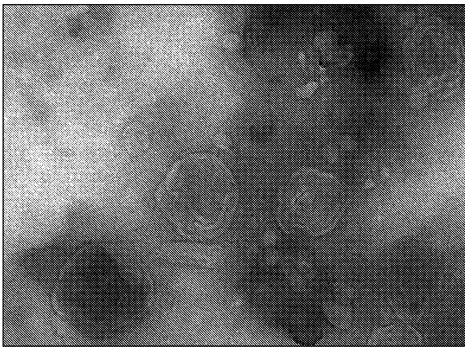


図 10A

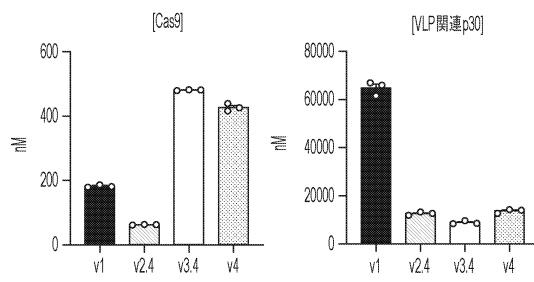


図 10B

図 10C

【図 10 D - G】

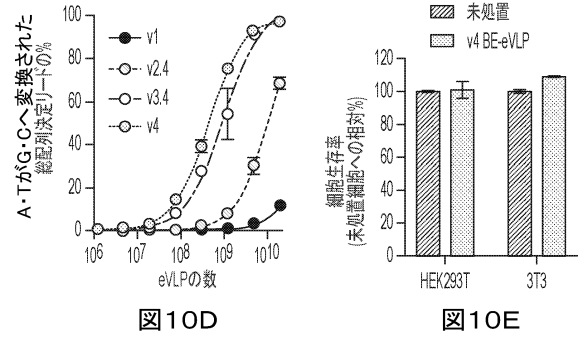


図 10D

図 10E

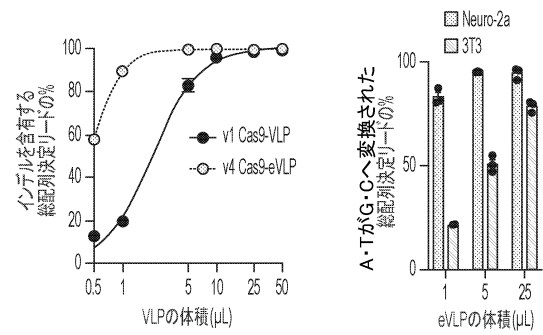


図 10F

図 10G

【図 11 A】

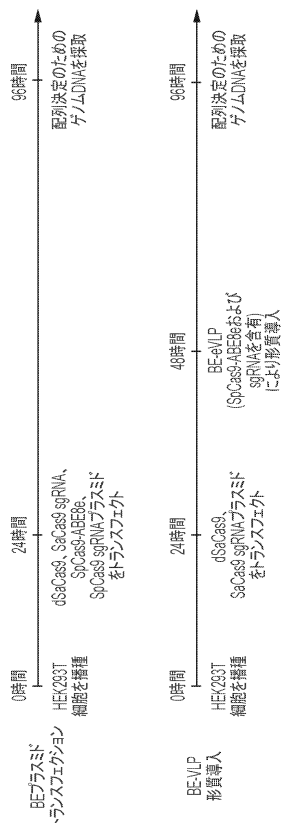


図 11A

【図 11 B - C】

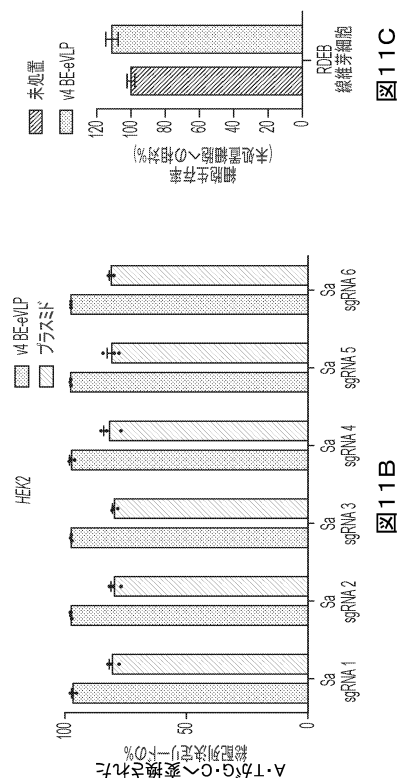


図 11C

図 11B

10

20

30

40

50

【図 1 1 D】

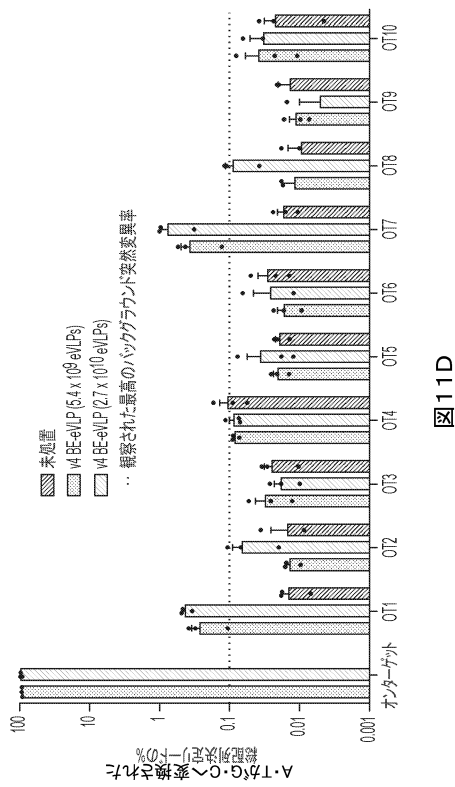


図11D

【図 1 2】

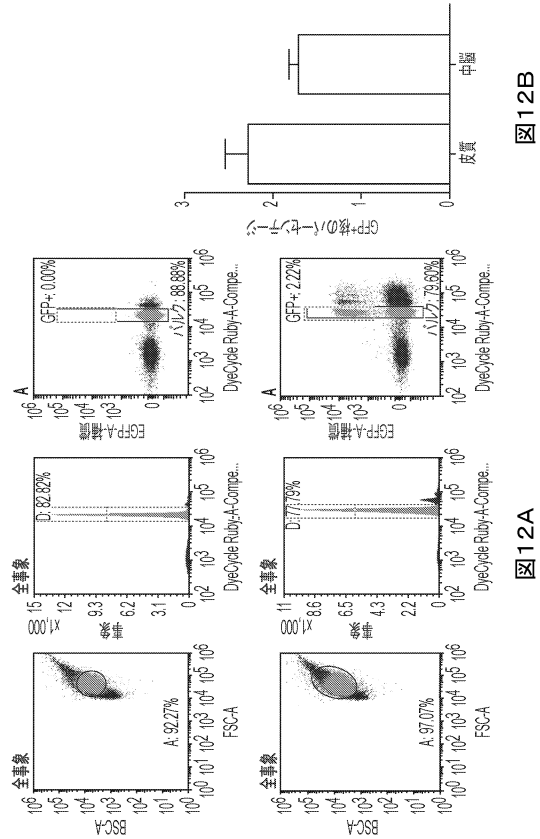


図12B

図12A

【図 1 3】

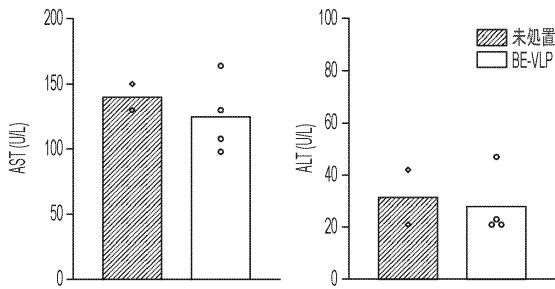


図13A

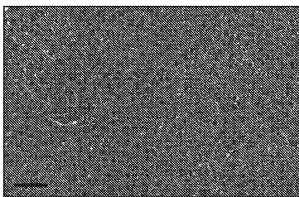


図13B

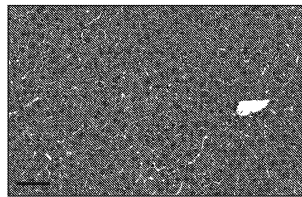


図13C

【図 1 4 A】

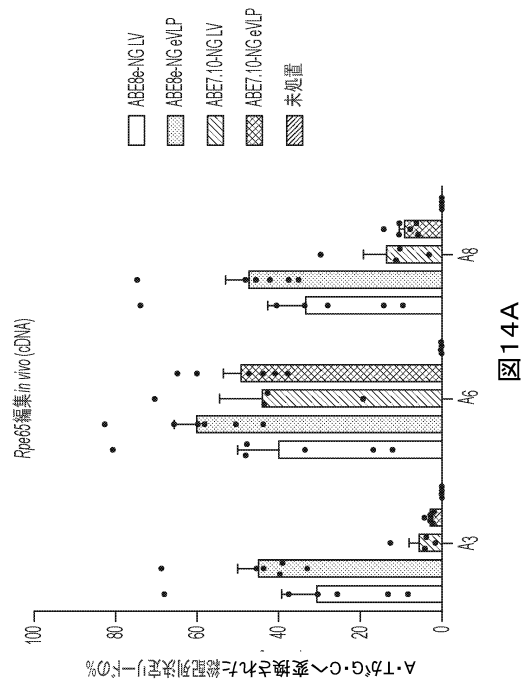


図14A

10

20

30

40

50

【図 1 4 B】

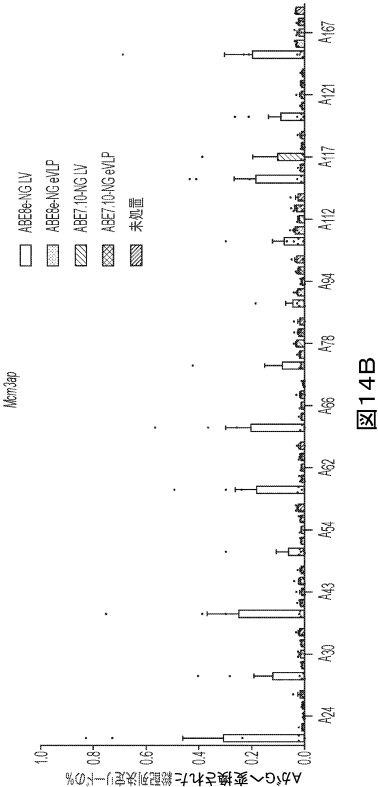


図14B

【図 1 4 C】

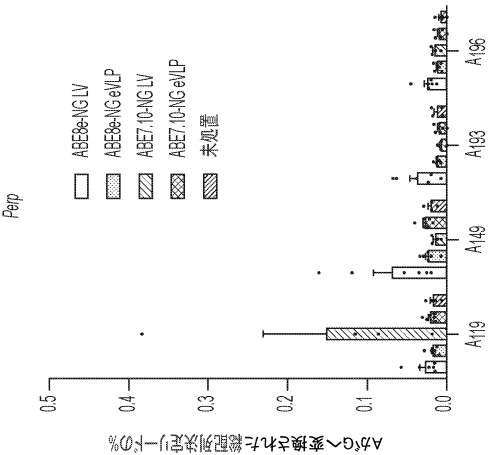


図14C

【配列表】

2024544013000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/080856

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C07K14/005 C12N7/00 C07K14/47 C12N9/22 C12N15/10	
	C12N15/113 C12N15/62 C12N15/86	
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) C07K C12N C40B		
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, 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	WO 2017/068077 A1 (INST NAT DE LA SANTE ET DE LA RECH MEDICALE [FR] ET AL.) 27 April 2017 (2017-04-27) abstract page 4, line 25 - page 5, line 24 page 21, line 21 - line 28 page 25, line 31 - page 26, line 16 page 26, line 21 - page 30, line 5 page 43, line 5 - page 45, line 15; figures 1,3,4,11,14; example 7 ----- -/--	63-93, 109-127, 129-155, 157-164, 166-178
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 22 May 2023		Date of mailing of the international search report 24/07/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mossier, Birgit

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2022/080856

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/102709 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 22 May 2020 (2020-05-22) cited in the application abstract paragraph [0095] paragraph [0098] - paragraph [0115] paragraph [0123] - paragraph [0132] paragraph [0200] - paragraph [0201] paragraph [0349] - paragraph [0394] paragraph [0334] paragraph [0322] paragraph [0734] - paragraph [0737] paragraph [0449]; claims 1,2,4,7,35,37,39-41,66-76,78; figures 1,21,22,35; examples 9,15 -----	63-93, 109-127, 129-155, 157-164, 166-178
Y	PHILIPPE E. MANGEOT ET AL: "Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 10, no. 1, 3 January 2019 (2019-01-03), XP055563461, DOI: 10.1038/s41467-018-07845-z cited in the application abstract page 11, column 2, paragraph 5 page 12, column 1, paragraph 1 - paragraph 4; figures 1,5 -----	63-93, 109-127, 129-155, 157-164, 166-178
Y	HAMILTON JENNIFER R. ET AL: "Targeted delivery of CRISPR-Cas9 and transgenes enables complex immune cell engineering", CELL REPORTS, vol. 35, no. 9, 1 June 2021 (2021-06-01), page 109207, XP093032331, US ISSN: 2211-1247, DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109207 abstract page e1; figures 1,4 ----- -/--	63-93, 109-127, 129-155, 157-164, 166-178

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/080856

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WU DAI-TZE ET AL: "MLV based viral-like-particles for delivery of toxic proteins and nuclear transcription factors", BIOMATERIALS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 35, no. 29, 3 July 2014 (2014-07-03), pages 8416-8426, XP028880170, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.06.006 cited in the application abstract page 8420, column 2 - page 8421, column 1, paragraph 1 -----	163,164
Y	ROBERT MARC-ANDRÉ ET AL: "Virus-Like Particles Derived from HIV-1 for Delivery of Nuclear Proteins: Improvement of Production and Activity by Protein Engineering", MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, SPRINGER US, NEW YORK, vol. 59, no. 1, 9 November 2016 (2016-11-09), pages 9-23, XP036144568, ISSN: 1073-6085, DOI: 10.1007/S12033-016-9987-1 [retrieved on 2016-11-09] abstract page 10, column 1, paragraph 4 - column 2, paragraph 2 page 16, column 2, paragraph 3 - page 17; figures 1,6,8 -----	163,164
Y	WO 2019/226953 A1 (BROAD INST INC [US]; HARVARD COLLEGE [US]) 28 November 2019 (2019-11-28) abstract paragraph [0168] - paragraph [0169] paragraph [0210]; claims 1-10,100-119; figure 2A -----	63-93, 109-120, 129-155, 158-164, 173-175
Y	WO 2018/176009 A1 (HARVARD COLLEGE [US]) 27 September 2018 (2018-09-27) abstract; figures 109,126C,132B,152 ----- -/--	63-93, 109-120, 129-155, 158-164, 173-175

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/080856

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RICHTER MICHELLE F ET AL: "Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP US, NEW YORK, vol. 38, no. 7, 16 March 2020 (2020-03-16) , pages 883-891, XP037523981, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/S41587-020-0453-Z [retrieved on 2020-03-16] cited in the application abstract page 889, column 2, paragraph 3 - page 890; figures 1-4 -----	172
X,P	BANSKOTA SAMAGYA ET AL: "Engineered virus-like particles for efficient in vivo delivery of therapeutic proteins", CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 185, no. 2, 11 January 2022 (2022-01-11), page 250, XP086933213, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2021.12.021 [retrieved on 2022-01-11] abstract; figure 2 -----	63-93

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/080856

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/080856**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
63-93, 129-175, 178 (completely); 109-128, 176, 177 (partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2022/080856

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 63-93, 129-175, 178(completely); 109-128, 176, 177(partially)

particle/composition/fusion protein comprising (a) sequence of a gag nucleocapsid protein (feature F), (b) a therapeutic cargo (feature C), (c) a cleavable linker (feature E), and (d) a nuclear export sequence (NES) (feature D) and the subject-matter relating thereto.

2. claims: 94-108(completely); 109-128, 176, 177(partially)

Particle comprising a fusion protein comprising a gag nucleocapsid (feature F) and a therapeutic cargo (feature C) and the subject-matter relating thereto.

3. claims: 1-14, 57(completely); 48-50, 53-56, 61, 62, 176, 177, 179(partially)

Particles/compositions comprising (a) a human endogenous retroviral (HERV) envelope protein (feature A1), a humanized viral envelope protein (feature A2), or a non-immunogenic cell fusion molecule (feature A3); (b) a fusion protein comprising a plasma membrane localization protein (feature B) and (c) therapeutic cargo (feature C) wherein the fusion protein is "coupled" to a nuclear export sequence (NES) (feature D) and the subject-matter relating thereto.

4. claims: 15-26, 58(completely); 48-50, 53-56, 61, 62, 176, 177, 179(partially)

Particles/compositions comprising (a) a human endogenous retroviral (HERV) envelope protein (feature A1), a humanized viral envelope protein (feature A2), or a non-immunogenic cell fusion molecule (feature A3); (b) a fusion protein comprising a plasma membrane localization protein (feature B) and (c) therapeutic cargo (feature C) wherein the fusion protein is "coupled" to a cleavable linker (feature E) (Invention 2) and the subject-matter relating thereto.

5. claims: 27-32, 59(completely); 48, 53, 55, 56, 61, 176, 177, 179(partially)

Particles comprising fusion protein comprising (i) a humanized viral structural protein (feature A4), a human endogenous retroviral (HERV) envelope protein (feature A1), a pleckstrin homology (PH) domain (feature A5) or a non-immunogenic plasma membrane recruitment protein (feature A6), (ii) a nuclear export sequence (NES) (feature D) and

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/US2022 /080856

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

the subject-matter relating thereto.

6. claims: 33-37(completely); 51, 52, 54, 176, 177, 179(partially)

Compositions comprising fusion protein comprising (i) a humanized viral structural protein (feature A4), a human endogenous retroviral (HERV) envelope protein (feature A1), a pleckstrin homology (PH) domain (feature A5) or a non-immunogenic plasma membrane recruitment protein (feature A6), (ii) a nuclear export sequence (NES) (feature D) and (iii) a cargo (feature C) and the subject-matter relating thereto

7. claims: 38-47, 60(completely); 48, 51-56, 61, 62, 176, 177, 179(partially)

Particles/compositions comprising a fusion protein comprising i) a humanized retroviral structural protein (feature A4); a human endogenous retroviral (HERV) structural protein (feature A1); a pleckstrin homology (PH) domain (feature A5); or a non-immunogenic plasma membrane recruitment protein (feature A6), ii) a cleavable linker (feature E), and iii) a cargo (feature C) and the subject-matter relating thereto.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/080856

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017068077 A1	27-04-2017	JP 7059179 B2	25-04-2022
		JP 2018531023 A	25-10-2018
		JP 2022046680 A	23-03-2022
		US 2019055288 A1	21-02-2019
		US 2021284697 A1	16-09-2021
		WO 2017068077 A1	27-04-2017
WO 2020102709 A1	22-05-2020	EP 3880717 A1	22-09-2021
		US 2023193255 A1	22-06-2023
		WO 2020102709 A1	22-05-2020
WO 2019226953 A1	28-11-2019	EP 3797160 A1	31-03-2021
		US 2021198330 A1	01-07-2021
		WO 2019226953 A1	28-11-2019
WO 2018176009 A1	27-09-2018	AU 2018240571 A1	17-10-2019
		BR 112019019655 A2	22-04-2020
		CA 3057192 A1	27-09-2018
		CL 2019002679 A1	20-03-2020
		CL 2020001894 A1	23-10-2020
		CN 110914426 A	24-03-2020
		EP 3601562 A1	05-02-2020
		GB 2575930 A	29-01-2020
		IL 269458 A	28-11-2019
		JP 7191388 B2	19-12-2022
		JP 2020511970 A	23-04-2020
		JP 2023029926 A	07-03-2023
		KR 20190130613 A	22-11-2019
		SG 11201908658T A	30-10-2019
		US 2018312828 A1	01-11-2018
		WO 2018176009 A1	27-09-2018

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/48 (2006.01)	C 1 2 N 15/48	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115	Z
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55	
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00	C
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0
C 1 2 N 15/34 (2006.01)	C 1 2 N 15/34	
C 1 2 N 15/49 (2006.01)	C 1 2 N 15/49	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K 9/16 (2006.01)	A 6 1 K 9/16	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(32)優先日 令和4年1月11日(2022.1.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/298,626

(32)優先日 令和4年1月11日(2022.1.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/423,372

(32)優先日 令和4年11月7日(2022.11.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

ハーバード カレッジ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, クインシー ストリート 1 7

(74)代理人 110003971

弁理士法人葛和国際特許事務所

(72)発明者 リウ, デイヴィッド, アール.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
ケア オブ ザ ブロード インスティテュート、インコーポレーテッド

(72)発明者 ケーヒル, トーマス, ジェイ. サード

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
ケア オブ ザ ブロード インスティテュート、インコーポレーテッド

-
- (72)発明者 デソーザ, フィリップ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
 ケア オブ ザ ブロード インスティテュート, インコーポレーテッド
- (72)発明者 ラグラム, アディチャ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
 ケア オブ ザ ブロード インスティテュート, インコーポレーテッド
- (72)発明者 バンスコータ, サマギヤ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
 ケア オブ ザ ブロード インスティテュート, インコーポレーテッド
- (72)発明者 アン, メールイ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
 ケア オブ ザ ブロード インスティテュート, インコーポレーテッド
- F ターム (参考) 4B064 AG01 AG32 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA90X AB01 BA05 CA24 CA44
 4C076 AA11 AA17 AA19 AA22 AA31 AA95 BB01 BB11 BB13 BB15
 BB16 BB21 BB24 BB25 BB26 BB29 BB31 EE41 EE52 FF68
 4C084 AA17 AA27 MA05 MA13 MA17 MA22 MA23 MA41 MA52 MA55
 MA56 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 NA05 NA10 NA13 ZC021 ZC022
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA01 EA20 FA74