

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-519922
(P2024-519922A)

(43)公表日 令和6年5月21日(2024.5.21)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 C 0 8 4
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/46		4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		
A 6 1 K	9/127(2006.01)	A 6 1 K	9/127		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全122頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-571978(P2023-571978)		(71)出願人	520439645	
(86)(22)出願日	令和4年5月20日(2022.5.20)			ビーム セラピューティクス インク.	
(85)翻訳文提出日	令和6年1月12日(2024.1.12)			アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチュー	
(86)国際出願番号	PCT/US2022/030359			セッツ州 ケンブリッジ メイン ストリ	
(87)国際公開番号	WO2022/246266			ート 2 3 8 9 ス フロア	
(87)国際公開日	令和4年11月24日(2022.11.24)		(74)代理人	100083806	
(31)優先権主張番号	63/191,458			弁理士 三好 秀和	
(32)優先日	令和3年5月21日(2021.5.21)		(74)代理人	100111235	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			弁理士 原 裕子	
(31)優先権主張番号	63/322,182		(74)代理人	100195257	
(32)優先日	令和4年3月21日(2022.3.21)			弁理士 大淵 一志	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		(72)発明者	チャドウィック、アレキサンドラ シー.	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー	
		最終頁に続く		セッツ州 ケンブリッジ テクノロジー	
				スクエア 5 0 0 スイート 9 0 1	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 トランスサイレチン遺伝子の塩基編集

(57)【要約】

塩基エディタースystemに関連する遺伝子改変のための組成物、及びミスフォールドトランスサイレチン(TTR)タンパク質の凝集により形成されるアミロイド原線維の様々な組織における細胞外沈着に関連する状態を処置または予防するためにそれを使用する方法が、本明細書で提供される。そのような状態としては、これらに限定されないが、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスによる多発性ニューロパシー(hATTR-PN)及びトランスサイレチンアミロイドーシスによる遺伝性心筋症(hATTR-CM) (これらの両方は、TTR遺伝子の常染色体優性変異に関連する)、ならびに野生型TTRタンパク質(ATTR wt)に関連する加齢性心筋症 (老人性心アミロイドーシスとしても知られる) が含まれる。

【選択図】 図10

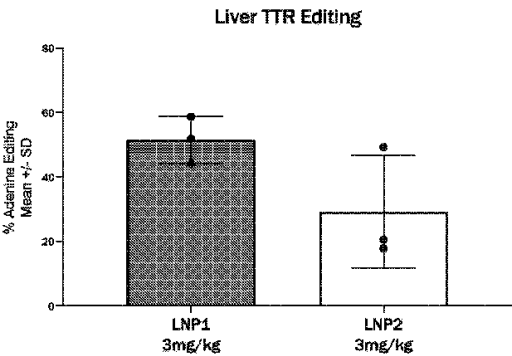


FIG. 10

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸であって、前記ポリヌクレオチドが、ゲノム内のNGGプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列に隣接するトランスサイレチン（TTR）をコードする遺伝子内の標的プロトスペーサー配列と相同である約17～約23ヌクレオチドを含む5'-スペーサー配列を含み、

前記単離ポリヌクレオチドが、前記TTR遺伝子における核酸塩基の変化を生じさせるように塩基エディターシステムを誘導するガイドポリヌクレオチドとして機能する、前記単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。

【請求項 2】

前記5'スペーサーの3'に、さらにtracrRNAドメインを含み、前記tracrRNAが、塩基エディタータンパク質に結合するように構成されている、請求項1に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。

【請求項 3】

前記プロトスペーサー配列が、前記TTR遺伝子の開始コドンまたはスプライス部位を含む、請求項1または2に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。

【請求項 4】

前記TTR遺伝子にもたらされた前記核酸塩基の変化が、開始コドンの破壊またはイントロンエクソンスプライス部位の破壊を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。

【請求項 5】

前記TTR遺伝子にもたらされた前記核酸塩基の変化が、イントロンエクソンスプライス部位の破壊を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。

【請求項 6】

前記単離ポリヌクレオチド、または前記それをコードする核酸にコードされるポリヌクレオチドが、下記の配列に対して、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するスペーサー配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド、またはそれをコードする核酸：

5'-GCCAUCCUGCCAAGAAUGAG-3'（配列番号1）（GA457）、
5'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3'（配列番号2）（GA519）、
5'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3'（配列番号2）（GA458）、
5'-GCAACUUAACCCAGAGGCCAAA-3'（配列番号3）（GA459）、
5'-UAUAGGAAAACCAGUGAGUC-3'（配列番号4）（GA460/GA520）、または
5'-UACUCACCUUGCAUGCUCA-3'（配列番号5）（GA461）。

【請求項 7】

前記単離ポリヌクレオチドまたは前記それをコードする核酸にコードされるポリヌクレオチドが、以下の配列のうちの1つを有するスペーサー配列を含む、請求項6に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸：

5'-GCCAUCCUGCCAAGAAUGAG-3'（配列番号1）（GA457）、
5'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3'（配列番号2）（GA519）、
5'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3'（配列番号2）（GA458）、
5'-GCAACUUAACCCAGAGGCCAAA-3'（配列番号3）（GA459）、
5'-UAUAGGAAAACCAGUGAGUC-3'（配列番号4）（GA460/GA520）、または
5'-UACUCACCUUGCAUGCUCA-3'（配列番号5）（GA461）。

【請求項 8】

前記単離ポリヌクレオチド、または前記それをコードする核酸にコードされたポリヌクレオチドが、ガイドRNAを含む、先行請求項のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

先行請求項のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸を含む、組成物。

【請求項 10】

先行請求項のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸と、塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸とを含む、組成物。

【請求項 11】

前記塩基エディター融合タンパク質が、プログラム可能なDNA結合ドメイン及びデアミナーゼを含む、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼまたはアデニンデアミナーゼを含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記プログラム可能なDNA結合ドメインが、触媒作用が損なわれたCas9タンパク質を含む、請求項 10～12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記触媒作用が損なわれたCas9タンパク質が、触媒作用が損なわれた*Streptococcus pyogenes* Cas9タンパク質を含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記デアミナーゼが、ABE8.8を含む、請求項 11～14 のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 16】

請求項 1～8 のいずれか1項に記載の単離ポリヌクレオチドもしくはそれをコードする核酸、または請求項 9～15 のいずれか1項に記載の組成物を含む、医薬組成物。

【請求項 17】

請求項 1～8 のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸、請求項 9～15 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 16 に記載の医薬組成物を含む、脂質ナノ粒子（LNP）。

【請求項 18】

請求項 17 に記載のLNPを含む、医薬組成物。

【請求項 19】

細胞内のTTR遺伝子に1つ以上の核酸塩基の変化を生じさせる方法であって、前記方法が、前記細胞を、請求項 1～8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドもしくは核酸、請求項 9～15 のいずれか一項に記載の組成物、請求項 16 もしくは18 に記載の医薬組成物、または請求項 17 に記載のLNPと接触させることを含む、前記方法。

【請求項 20】

対象においてトランスサイレチン（TTR）遺伝子に1つ以上の核酸塩基の変化を生じさせる方法であって、前記方法が、請求項 1～8 のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたは核酸、請求項 9～15 のいずれか1項に記載の組成物、請求項 16 もしくは18 に記載の医薬組成物、または請求項 17 に記載の脂質ナノ粒子を、前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 21】

前記TTR遺伝子の1つ以上の対立遺伝子が、サイレンシングされる、請求項 19 または20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記対象が、ヒトである、請求項 20 または21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ポリヌクレオチドもしくは核酸、前記組成物、前記医薬組成物、または前記LNPが投与される前記対象が、それを必要とする対象である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

前記ポリヌクレオチドもしくは核酸、前記組成物、前記医薬組成物、または前記LNPを投与することが、治療有効量の前記ポリヌクレオチド、前記組成物、前記医薬組成物、または前記LNPを投与することを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記対象が、前記TTR遺伝子における1つ以上の変異による遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス(hATTR)に罹患しているか、またはそのリスクがある、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記対象が、心筋症(hATTR-CM)及び/または多発性神経障害(hATTR-PN)に罹患しているか、またはそのリスクがある、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記対象が、前記TTR遺伝子の野生型対立遺伝子(ATTRwt)を特徴とする老人性心アミロイドーシスに罹患しているか、またはそのリスクがある、請求項24に記載の方法。

【請求項28】

前記ポリヌクレオチドもしくは核酸、前記組成物、前記医薬組成物、または前記LNPが、静脈内投与される、請求項20～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

TTR遺伝子を編集するための組成物であって、

(a)編集ウィンドウを有する塩基エディタータンパク質をコードするmRNA、及び

(b)前記塩基エディタータンパク質の結合足場として機能するtracr配列と、前記塩基エディタータンパク質を前記TTR遺伝子上のプロトスペーサー配列に導くように機能するスペーサー配列とを含むガイドRNA、を含み、

前記スペーサー配列が、前記TTR遺伝子のスプライス部位または開始コドンに対して、少なくとも部分的に相補的である、前記組成物。

【請求項30】

前記塩基エディタータンパク質が、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼを含む、請求項29に記載の組成物。

【請求項31】

前記塩基エディタータンパク質が、ニックアーゼ及びシチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼを含む融合タンパク質を含む、請求項29に記載の組成物。

【請求項32】

前記塩基エディタータンパク質が、D10AニックアーゼCas9及びシチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼを含む融合タンパク質を含む、請求項29に記載の組成物。

【請求項33】

前記シチジンデアミナーゼが、デオキシシチジンデアミナーゼである、請求項30～32のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項34】

前記アデノシンデアミナーゼが、デオキシアデノシンデアミナーゼである、請求項30～32のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項35】

前記塩基エディタータンパク質が、アデニン塩基エディターABE8.8を含む融合タンパク質を含む、請求項29に記載の組成物。

【請求項36】

前記スペーサー配列が、表1から選択されるプロトスペーサー配列と相同である、請求項29～35のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項37】

前記スペーサー配列が、以下の表から選択される、請求項29～35のいずれか1項に記載の組成物：

10

20

30

40

50

gRNA スペーサー配列(5'-3')
gscscsAUCCUGCCAAGAAUGAG (配列番号6)
gscscsAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号7)
gscsasACUUACCCAGAGGCAAA (配列番号8)
usasusAGGAAAACCAGUGAGUC (配列番号9)
usascsUCACCUCUGCAUGCUC (配列番号10)
gscscsAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号7)

10

(配列中、Aは、アデノシンであり；Cは、シチジンであり；Gは、グアノシンであり；Uは、ウリジンであり；aは、2'-O-メチルアデノシンであり；cは、2'-O-メチルシチジンであり；gは、2'-O-メチルグアノシンであり、uは、2'-O-メチルウリジンであり；sは、ホスホロチオエート(PS)主鎖結合である)。

20

【請求項38】

前記スペーサー配列が、以下の表に提示されるスペーサー配列に対して80%を超える配列同一性を有する、請求項29～35のいずれか1項に記載の組成物：

gRNA スペーサー配列(5'-3')
GCCAUCCUGCCAAGAAUGAG (配列番号1)
GCCAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号2)
GCAACUUACCCAGAGGCAAA (配列番号3)
UAUAGGAAAACCAGUGAGUC (配列番号4)
UACUCACCUCUGCAUGCUC (配列番号5)
GCCAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号2)

30

(配列中、Aは、修飾または未修飾アデノシンであり；Cは、修飾または未修飾シチジンであり；Gは、修飾または未修飾グアノシンであり；Uは、修飾または未修飾ウリジンである)。

40

【請求項39】

前記ガイドRNAが、以下の表から選択される、請求項29～35のいずれか1項に記載の組成物：

50

ガイドRNA配列(5'-3')	
gscscs AUCCUGCCAAGAAUGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu (配列 番号11)	
AUCCUGCCAAGAACGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu (配列番号 12)	10
gscsas ACUUACCCAGAGGCCAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu (配列 番号13)	
usasus AGGAAAACCAGUGAGUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu (配列 番号14)	
usascs UCACCUCUGCAUGCUCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu (配列 番号15)	20
gscscs AUCCUGCCAAGAACGAGgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUc cGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcuususus (配列番号16)	
usasus AGGAAAACCAGUGAGUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGU ccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcuususus (配列番号17)	

(配列中、Aは、アデノシンであり；Cは、シチジンであり；Gは、グアノシンであり；Uは、ウリジンであり；aは、2'-O-メチルアデノシンであり；cは、2'-O-メチルシチジンであり；gは、2'-O-メチルグアノシンであり、uは、2'-O-メチルウリジンであり；sは、ホスホロチオエート(PS)主鎖結合であり；太字は、スペーサー配列を表す)。

【請求項40】

前記スペーサー配列が、以下の表から選択されるガイドRNA配列に対して80%を超える配列同一性を有する、請求項29～35のいずれか1項に記載の組成物：

10

20

30

40

50

gRNA配列(5'-3')	
GCCAUCCUGCCAAGAAUGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号 18)	
GCCAUCCUGCCAAGAACGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号 19)	10
GCAACUUACCCAGAGGCAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号 20)	
UAUAGGAAAACCAGUGAGUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号 21)	
UACUCACCUCUGCAUGCUCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号 22)	20
GCCAUCCUGCCAAGAACGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号 19)	

【請求項 4 1】

前記組成物が、GA459を除いた表2に記載の編集活性の50%以内の編集活性を生じさせることが可能であるか、または表3に記載の編集活性の50%以内の編集活性を生じさせることが可能である、請求項 2 9 ~ 4 0 のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項 4 2】

前記組成物が、表4、6、7、8、9、もしくは10に記載の1つ以上の潜在的なオフターゲット部位において、総オフターゲット編集活性の50%以内、または観察されたオフターゲット編集活性以下を生じさせることが可能であるか、またはオフターゲット編集活性を生じさせないことが可能である、請求項 2 9 ~ 4 1 のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記組成物が、脂質ナノ粒子内にカプセル化されている、請求項 2 9 ~ 4 2 のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記組成物が、対象にin vivoで投与される、請求項 2 9 ~ 4 3 のいずれか1項に記載の組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2021年5月21日に出願された米国仮特許出願第63/191,458号及び2022年3月21日に出願された同第63/322,182号の利益を主張する。

【0002】

配列表

50

本出願は、ASCII形式で電子的に提出されている配列表を含有し、全体が参照により本明細書に組み込まれる。2022年5月20日に作成された該ASCIIコピーは、0650_000001W001_SL.txtという名称であり、サイズは946,110バイトである。

【背景技術】

【0003】

トランスサイレチン (Transthyretin: TTR) は、チロキシン (T4) 及びレチノール結合タンパク質の両方に関する55kDaの輸送タンパク質であり、これは、健康なヒトの血清及び脳脊髄液 (CSF) 中で可溶性の形態で循環する。通常の条件下では、TTRタンパク質は、ホモテトラマーとして循環する。遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス (hATTR) は、TTRをコードする遺伝子の変異による疾患である。常染色体優性変異は、TTRテトラマーを不安定化し、モノマーへの解離を増強し、これにより、ミスフォールディング、凝集、及びその後の様々な部位でのTTRアミロイド線維の細胞外沈着がもたらされる。この多系統の細胞外アミロイド沈着により、様々な臓器及び組織の機能不全がもたらされる。特に、トランスサイレチンアミロイドーシスによる多発性神経障害 (ATTR-PN) 及び心筋症 (ATTR-CM) は、重大な罹患率及び死亡率を伴う重度の疾患である。

10

【0004】

TTRは、主に肝臓で産生されるので、hATTRアミロイドーシスの初期の治療法は、肝移植であった。他の治療法は、TTRテトラマーの動的安定剤として作用する経口薬の投与 (例えば、タファミジス及びジフルニサル)、ならびに、低分子干渉RNA (siRNA) (パチシラン) 及びアンチセンスオリゴヌクレオチド (イノテルセン) などの遺伝子サイレンシング薬を用いるTTRタンパク質合成の抑制を含む。

20

【0005】

本開示の発明は、多発性神経障害及び心筋症の両方を含む、トランスサイレチンアミロイドーシスの処置のための遺伝子編集アプローチが、既存の処置よりも優れた結果をもたらす一度で完了する処置を提供する可能性を有することを認識する。

【発明の概要】

【0006】

遺伝子改変または編集のための組成物、及びミスフォールドトランスサイレチン (TTR) タンパク質の凝集により形成されるアミロイド原線維の様々な組織における細胞外沈着に関連する状態を処置または予防するためにそれを使用する方法が、本明細書で提供される。そのような状態は、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスによる多発性ニューロパシー (hATTR-PN) 及びトランスサイレチンアミロイドーシスによる遺伝性心筋症 (hATTR-CM) が含まれるが、これらに限定されず、これらの両方は、TTR遺伝子の常染色体優性変異と、野生型TTRタンパク質 (ATTRwt) に関連する加齢性心筋症 (老人性心アミロイドーシスとしても既知) に関連する。塩基エディター及びガイドRNAを含むものなどの編集システムを使用してTTR遺伝子を編集することを目的とする組成物及び方法が開示される。

30

【0007】

第1の態様では、単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸が記載されている。ポリヌクレオチドは、ゲノム内のNGGプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列に隣接するトランスサイレチン (TTR) をコードする遺伝子内の標的プロトスペーサー配列と相同である、約17~約23ヌクレオチドを含む5'-スペーサー配列を含む。単離ポリヌクレオチドは、塩基エディターシステムに、TTR遺伝子における核酸塩基の変化を生じさせるように誘導するガイドポリヌクレオチドとして機能する。

40

【0008】

プロトスペーサー配列は、TTR遺伝子の開始コドンまたはスプライス部位を含んでもよい。TTR遺伝子に影響を与える核酸塩基の変化は、開始コドンの破壊またはイントロンエクソンスプライス部位の破壊を含み得る。単離ポリヌクレオチド、またはそれをコードする核酸にコードされるポリヌクレオチドは、下記と、少なくとも約75%、少なくとも

50

も約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または100%の同一性のスペーサー配列を含んでもよい：

5'-GCCAUCCUGCCAAGAAUGAG-3' (配列番号1) (GA457)、
5'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3' (配列番号2) (GA519)、
5'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3' (配列番号2) (GA458)、
5'-GCAACUUACCCAGAGGCCAAA-3' (配列番号3) (GA459)、
5'-UAUAGGAAAACCAGUGAGUC-3' (配列番号4) (GA460/GA520)、または
5'-UACUCACCUCUGCAUGCUC-3' (配列番号5) (GA461)。

【0009】

単離ポリヌクレオチド、またはそれをコードする核酸にコードされるポリヌクレオチドは、ガイドRNAを含み得る。 10

【0010】

第2の態様では、組成物が記載される。組成物は、第1の態様によるポリヌクレオチドまたは核酸を含む。組成物は、塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸を含んでもよい。塩基エディター融合タンパク質は、プログラム可能なDNA結合ドメイン及びデアミナーゼを含んでもよい。デアミナーゼは、シトシンデアミナーゼまたはアデニンデアミナーゼを含んでもよい。デアミナーゼは、ABE8.8を含んでもよい。プログラム可能なDNA結合ドメインは、Cas9タンパク質を含んでもよい。Cas9タンパク質、例えば、*Streptococcus pyogenes* Cas9タンパク質は、その切断活性が部分的または完全に除去されるように修飾（改変）される。そのような修飾Cas9タンパク質は、本明細書では「触媒作用が損なわれた」Cas9タンパク質と呼ばれる。 20

【0011】

第3の態様では、医薬組成物が記載される。医薬組成物は、第2の態様による組成物を含んでも、または第1の態様によるポリヌクレオチドまたは核酸を含んでもよい。

【0012】

第4の態様では、脂質ナノ粒子（LNP）が記載される。LNPは、第3の態様による医薬組成物を含んでも、第2の態様による組成物を含んでも、または第1の態様によるポリヌクレオチドもしくは核酸を含んでもよい。LNPは、コレステロールを含んでもよい。

【0013】

第5の態様では、LNPを含む医薬組成物が記載される。 30

【0014】

第6の態様では、細胞内のTTR遺伝子に1つ以上の核酸塩基の変化を生じさせる方法が記載される。方法は、細胞を、第1の態様によるポリヌクレオチドもしくは核酸、第2の態様による組成物、第3もしくは第5の態様による医薬組成物、または第4の態様によるLNPと接触させることを含む。

【0015】

第7の態様では、対象においてトランスサイレチン（TTR）遺伝子に1つ以上の核酸塩基の変化を生じさせる方法が記載される。方法は、第1の態様によるポリヌクレオチドもしくは核酸、第2の態様による組成物、第3もしくは第5の態様による医薬組成物、または第4の態様によるLNPを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、TTR遺伝子の1つ以上の対立遺伝子がサイレンシングされる。対象は、ヒトであってよい。対象は、それを必要とする対象であってよい。対象は、TTR遺伝子における1つ以上の変異により、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス（hATTR）に罹患した、またはそのリスクを有する対象であり得る。対象は、心筋症（hATTR-CM）及び/または多発性神経障害（hATTR-PN）に罹患した、またはそのリスクを有する対象であり得る。対象は、TTR遺伝子の野生型対立遺伝子（ATTRwt）を特徴とする老人性心アミロイドーシスに罹患した、またはそのリスクを有する対象であり得る。 40

【0016】

第1の態様によるポリヌクレオチドもしくは核酸、第2の態様による組成物、第3もしくは第5の態様による医薬組成物、または第4の態様によるLNPは、治療有効量で対象に 50

投与され得る。第1の態様によるポリヌクレオチドもしくは核酸、第2の態様による組成物、第3もしくは第5の態様による医薬組成物、または第4の態様によるLNPは、静脈内投与され得る。

【0017】

第8の態様では、TTR遺伝子を編集するための組成物が記載される。組成物は、(a)編集ウィンドウを有する塩基エディタータンパク質をコードするmRNA、及び、(b)塩基エディタータンパク質の結合足場として機能するtracr配列と、塩基エディタータンパク質をTTR遺伝子上のプロトスペーサーに導くように機能するスペーサー配列とを含むガイドRNA、を含む。スペーサー配列は、少なくとも部分的に、TTR遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖のスプライス部位または開始コドンに対して相補的である。

10

【0018】

塩基エディタータンパク質は、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼを含んでもよい。シチジンデアミナーゼは、デオキシシチジンデアミナーゼであってよい。アデノシンデアミナーゼは、デオキシアデノシンデアミナーゼであってよい。塩基エディタータンパク質は、ニックアーゼ及びシチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼを含む融合タンパク質を含んでもよい。塩基エディタータンパク質は、D10AニックアーゼCas9及びシチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼを含む融合タンパク質を含んでもよい。塩基エディタータンパク質は、アデニン塩基エディターABE8.8を含む融合タンパク質で構成され得る。

20

【0019】

スペーサー配列は、表1または表13から選択されるプロトスペーサー配列と相同であり得る。スペーサー配列は、以下の表から選択され得る：

gRNAスペーサー配列(5'-3')
gscscsAUCCUGCCAAGAAUGAG (配列番号6)
gscscsAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号7)
gscsasACUUACCCAGAGGCAAA (配列番号8)
usasusAGGAAAACCAGUGAGUC (配列番号9)
usascsUCACCUCUGCAUGCUCA (配列番号10)
gscscsAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号7)

30

【0020】

(式中、Aは、アデノシンであり；Cは、シチジンであり；Gは、グアノシンであり；Uは、ウリジンであり；aは、2'-O-メチルアデノシンであり；cは、2'-O-メチルシチジンであり；gは、2'-O-メチルグアノシンであり、uは、2'-O-メチルウリジンであり；sは、ホスホロチオエート(PS)主鎖結合である)。

40

【0021】

スペーサー配列は、以下の表に提示されるスペーサー配列と80%を超える配列同一性を有し得る：

50

gRNA スペーサー配列(5'-3')
GCCAUCCUGCCAAGAAUGAG (配列番号1)
GCCAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号2)
GCAACUUACCCAGAGGCAAA (配列番号3)
UAUAGGAAAACCAGUGAGUC (配列番号4)
UACUCACCUCUGCAUGCUC (配列番号5)
GCCAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号2)

10

【0022】

(式中、Aは、修飾または未修飾アデノシンであり；Cは、修飾または未修飾シチジンであり；Gは、修飾または未修飾グアノシンであり；Uは、修飾または未修飾ウリジンである)。

【0023】

20

ガイドRNAは、次の表から選択され得る：

ガイドRNA配列(5'-3')
gscscs AUCCUGCCAAGAAUGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu (配列番号11)
AUCCUGCCAAGAACGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu (配列番号12)
gscsas ACUUACCCAGAGGCAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu (配列番号13)
usasus AGGAAAACCAGUGAGUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu (配列番号14)
usascs UCACCUCUGCAUGCUCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU sususu (配列番号15)
gscscs AUCCUGCCAAGAACGAGgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcu sususu (配列番号16)
usasus AGGAAAACCAGUGAGUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcu sususu (配列番号17)

30

40

【0024】

50

(式中、Aは、アデノシンであり；Cは、シチジンであり；Gは、グアノシンであり；Uは、ウリジンであり；aは、2'-O-メチルアデノシンであり；cは、2'-O-メチルシチジンであり；gは、2'-O-メチルグアノシンであり、uは、2'-O-メチルウリジンであり；sは、ホスホロチオエート(PS)主鎖結合であり；太字は、スペーサー配列を表す)。

【0025】

スペーサー配列は、以下の表から選択されるガイドRNA配列と80%を超える配列同一性を有し得る：

gRNA配列(5'-3')	
5'GCCAUCCUGCCAAGAAUGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU 3' (配列番号18)	10
5'GCCAUCCUGCCAAGAACGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU 3' (配列番号19)	
5'GCAACUUACCCAGAGGCCAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU 3' (配列番号20)	20
5'UAUAGGAAAACCAGUGAGUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU 3' (配列番号21)	
5'UACUCACCUCUGCAUGCUCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU 3' (配列番号22)	
5'GCCAUCCUGCCAAGAACGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU 3' (配列番号19)	30

【0026】

組成物は、表2 (GA459を除く)、または表3に記載の編集活性を生じさせることを可能にし得る。組成物は、表4、6、7、8、9、または10に記載のオフターゲット編集活性を最小限に生じさせる、または全く生じさせないことが可能であり得る。組成物は、脂質ナノ粒子内にカプセル化され得る。組成物は、対象にin vivoで投与され得る。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】 目的の遺伝子を標的とするgRNAと複合化された遺伝子エディターの一般的な概略図である。Cas9タンパク質、ガイドRNA、スペーサー配列、プロトスペーサー配列、及びPAM (プロトスペーサー隣接モチーフ) が特定される (図1A)。図1Aは、配列番号5760を開示する。さらに、シトシン塩基エディター (CBE) を用いた (図1B) 及びアデニン塩基エディター (ABE) を用いた (図1C) 塩基編集の一般原理の概略図が示される。

【0028】

【図2】 塩基編集によるスプライドナー部位の改変。上部パネルは、遺伝子から転写されたRNAの正常なスプライシングを表す。下部パネルは、編集により破壊されたスプラ

10

20

30

40

50

イス部位を有する遺伝子の転写により生じ得るスプライシングを示す。

【0029】

【図3】ヒトTTR遺伝子(hTTR遺伝子)のマップは、様々な制限酵素認識部位、エクソン1~4、及び表1に指定された単一ガイドRNA GA457、GA459、GA460、及びGA461の位置を示す。

【0030】

【図4】参照ヒトゲノム(GRCh38)からのヒトTTR遺伝子(UniProtKB-P02766(TTHY_HUMAN))のヌクレオチド配列が示され、ガイドGA457、GA459、GA460、及びGA461が位置する遺伝子上の領域を示す。図4は配列番号5761を開示する。

【0031】

【図5】TTRガイド並びにGA457(図5A)、GA460(図5B)、及びGA461(図5C)の編集位置を示す概略図。ヒトゲノムDNA(gDNA)配列は、黒でラベル付けされる。ガイド配列は、上に灰色で強調される。ゲノムエクソン配列は、大文字であり、イントロン配列は、小文字である。ABE編集で標的とされる主な位置は、黒い矢印がラベル付けされる。図5は、出現順に、それぞれ、配列番号1、5762、4、5763、5、及び5764を開示する。

【0032】

【図6】単一ガイドRNAであるGA457、GA459、GA460、及びGA461ガイドRNAを用いるABE編集を使用した、ヒト肝細胞におけるスプライス編集率(%)を表すグラフである。3つのTTRガイドRNA GA457、GA460、及びGA461は、ヒト肝細胞において高い活性を示す。ガイドのそれぞれは、同一のtracr配列を用い、標的TTR遺伝子上の所定のDNAプロトスペーサー配列に対応するRNAスペーサー配列のみが異なる。

【0033】

【図7】候補オフターゲット部位を決定するためのONE-seqプロトコールのフローチャートである。

【0034】

【図8】NHP及びヒトTTRエクソン1にハイブリダイズされたGA519及びGA457の比較の概略図である。出現順に、それぞれ、配列番号1、5765、2、及び5766を開示する。

【0035】

【図9】NHP及びヒトTTRエクソン3にハイブリダイズされたGA520及びGA460の比較を示す概略図である。出現順に、それぞれ、配列番号5767~5768及び5767~5768を開示する。

【0036】

【図10】実施例に記載の非ヒト霊長類(NHP)におけるLNP1及びLNP2によるTTR遺伝子の肝臓編集を示す棒グラフである。

【0037】

【図11】実施例に記載のLNP1及びLNP2で処置されたNHPの、ELISAで測定された血清中TTRタンパク質の変化を示す棒グラフである。

【0038】

【図12】実施例に記載のLNP1及びLNP2で処置されたNHPにおける質量分析法で測定された血清中TTRタンパク質の変化を示す棒グラフである。

【0039】

【図13】実施例に記載のLNP1及びLNP2で処置されたNHPの、血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)濃度(A)及び血清中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)濃度(B)を示す棒グラフである。

【0040】

【図14】実施例に記載のLNP1及びLNP2で処置されたNHPの、血清中乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)濃度(A)及び血清中グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)濃度(B)を示す棒グラフである。

10

20

30

40

50

【0041】

【図15】実施例に記載のLNP1及びLNP2で処置されたNHPの、血清中ガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)濃度(A)及び血清中アルカリホスファターゼ(AP)濃度(B)を示す棒グラフである。

【0042】

【図16】実施例に記載のLNP1及びLNP2で処置されたNHPの、血清中総ビリルビン濃度を示す棒グラフである。

【0043】

【図17】実施例に記載のLNP1及びLNP2で処置されたNHPの、血清中クレアチンキナーゼ濃度を示す棒グラフである。

10

【0044】

【図18】実施例に記載のLNP1及びLNP2で処置されたNHPの、経時的な血清中サイトカイン濃度(MCP-1、左上のパネル；IL-6、右上のパネル；IP-10、左下のパネル；及びIL-1RA、右下のパネル)の棒グラフを示す。

【0045】

【図19】実施例に記載のLNP1及びLNP2で処置されたNHPの、iLipid(A)及びPEG脂質(B)の血漿中薬物動態プロファイルのプロットである。

【0046】

【図20】実施例に記載される、NHPのLNP3によるTTR遺伝子の肝臓編集を示す棒グラフである。

20

【0047】

【図21】実施例に記載のLNP3で処理されたNHPの、ELISAで測定された血清中TTRタンパク質の変化を示すプロットである。

【0048】

【図22】実施例に記載のLNP3で処理されたNHPの、液体クロマトグラフィー質量分析法で測定された血清中TTRタンパク質の変化を示すプロットである。

【0049】

【図23】実施例に記載のLNP3で処理されたNHP中の、血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)濃度(A)及び血清中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AS T)濃度(B)を示す棒グラフである。

30

【0050】

【図24】実施例に記載のLNP3で処置されたNHPの、血清中乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)濃度(A)ならびに血清中グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)濃度(B)を示す棒グラフである。

【0051】

【図25】実施例に記載のLNP3で処理されたNHPの、血清中ガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)濃度(A)及び血清中アルカリホスファターゼ(AP)濃度(B)を示す棒グラフである。

【0052】

【図26】実施例に記載のLNP2で処理されたNHPの、血清中総ビリルビン濃度を示す棒グラフである。

40

【0053】

【図27】実施例に記載のLNP3で処理されたNHPの、血清中クレアチンキナーゼ濃度を示す棒グラフである。

【0054】

【図28】実施例に記載のLNP1及びLNP2で処置されたNHPの、iLipid(A)及びPEG脂質(B)の血漿中薬物動態プロファイルのプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0055】

遺伝子改変または編集のための組成物、及びミスフォールドトランスサイレチン(TT

50

R) タンパク質の凝集により形成されるアミロイド原線維の様々な組織における細胞外沈着に関連する状態を処置または予防するためにそれを使用する方法が、本明細書で提供される。そのような状態は、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシスによる多発性ニューロパシー (hATTR-PN) 及びトランスサイレチンアミロイドーシスによる遺伝性心筋症 (hATTR-CM) が含まれるが、これらに限定されず、これらの両方は、TTR遺伝子の常染色体優性変異と、野生型TTRタンパク質 (ATTRwt) に関連する加齢性心筋症 (老人性心アミロイドーシスとしても既知) に関連する。塩基エディター及びガイドRNAを含むものなどの編集システムを使用してTTR遺伝子を編集することを目的とする組成物及び方法が開示される。

【0056】

定義

以下は、本開示全体に通して提示されるいくつかの用語の定義を提示する。いくつかの場合では、用語は、この「定義」セクション以外のこの本明細書の場所で定義されている。

【0057】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、内容が明確に別途指示をしない限り、複数の指示対象を含む。「または」という用語は、一般に、内容が明確に別途指示をしない限り、「及び/または」を包含する意味で用いられることも理解されるべきである。本明細書で使用される「及び/または」という用語及び「それらの任意の組み合わせ」という用語、ならびに、それらの文法的同等物は、互換的に使用することができる。これらの用語は、あらゆる組み合わせが具体的に企図されていることを意味し得る。単に例示を目的として、以下の語句「A、B、及び/またはC」または「A、B、C、またはそれらの任意の組み合わせ」は、「A単独；B単独；A及びB；B及びC；A及びC；ならびにA、B、及びC」を意味し得る。「または」という用語は、内容が具体的に選言的使用を指さない限り、結合的または選言的に使用することができる。

【0058】

「約」または「およそ」という用語は、当業者により決定される特定値の許容誤差範囲内を意味し得、これは、部分的に、値がどのように測定または決定されるか、すなわち、測定システムの限界、に依存するであろう。例えば、「約」は、当該技術分野の慣例に従って、1内または1超の標準偏差を意味し得る。あるいは、「約」は、所定の値の最大20%、最大10%、最大5%、または最大1%の範囲を意味し得る。あるいは、特に、生物学的システムまたはプロセスに関して、用語は、値の桁内、5倍以内、より好ましくは、2倍以内を意味し得る。特定値が、出願及び特許請求の範囲で記載されている場合、別途記載のない限り、「約」という用語は、特定値の許容誤差範囲内にあるとみなされることを意味する。

【0059】

本明細書及び特許請求の範囲(複数可)で使用される場合、「を含むこと(comprising)」(ならびに、を含むこと(comprising)の任意の形態、例えば、「を含む(comprise)」及び「を含む(comprises)」)、「を有する(having)」(ならびに、を有する(having)の任意の形態、例えば、「を有する(have)」及び「を有する(has)」)、「を含むこと(including)」(ならびに、を含むこと(including)の任意の形態、例えば、「を含む(includes)」及び「を含む(include)」)、「または」を含有する(containing)」(ならびに、を含有する(containing)の任意の形態、例えば、「を含有する(contains)」及び「を含有する(contain)」)は、包括的またはオープンエンドであり、追加の未記載の要素または方法のステップを除外するものではない。本明細書で考察される任意の実施形態は、本開示の任意の方法または組成物に関して実行することができ、その逆も同様であることが企図される。さらに、本開示の組成物は、本開示の方法を達成するために使用することができる。

【0060】

10

20

30

40

50

1つ以上の要素を含む物品、組成物、方法などは、1つ以上の要素から構成されても、1つ以上の要素から本質的になってもよい。本明細書及び特許請求の範囲(複数可)で 사용되는場合、「からなること(consisting of)」「ならびに、からなること(consisting of)の任意の形態、例えば、「からなる(consists of)」及び、「からなる(consist of)」は、含むこと及び限定されることを意味する。本明細書及び特許請求の範囲(複数可)で 사용되는場合、「から本質的になる(consisting essentially of)」「ならびに、から本質的になること(consisting essentially of)の任意の形態、例えば、「から本質的になる(consists essentially of)」及び「から本質的になる(consist essentially of)」など)物品、組成物、方法などは、物品、組成物、方法などが、具体的に列挙された要素、例えば、構成成分、化合物、材料、ステップなどを含むことを意味し、物品、組成物、方法などの基本的な特性及び新規な特性に実質的に影響を及ぼさない追加の要素を含んでもよい。

10

【0061】

本明細書における「いくつかの実施形態」、「ある実施形態」、「一実施形態」、「実施形態」、または「他の実施形態」への言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造、または特性が、本開示の、必ずしも全ての実施形態ではないが少なくともいくつかの実施形態に含まれることを意味する。

【0062】

「好ましい」及び「好ましくは」という言葉は、特定の状況下で特定の利益をもたらし得る本発明の実施形態を指す。しかし、同じまたは他の状況下では、他の実施形態も好ましいことがある。さらに、1つ以上の好ましい実施形態の列挙は、他の実施形態が有用ではないことを意味するものではなく、他の実施形態を本発明の範囲から除外することを意図するものではない。

20

【0063】

本明細書で使用される「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖の形態で少なくとも2つのヌクレオチド(すなわち、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド)を含有するポリマーを指し、DNA及びRNAを含む。「ヌクレオチド」は、糖デオキシリボース(DNA)またはリボース(RNA)、塩基、及びリン酸基を含有する。ヌクレオチドは、リン酸基を介して結合される。「塩基」には、プリン及びピリミジンが含まれ、これは、さらに、天然化合物のアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、及び天然アナログ、ならびにプリン及びピリミジンの合成誘導体(これらは、限定されないが、アミン、アルコール、チオール、カルボン酸塩、及びハロゲン化アルキルなどの新しい反応性基を配置する修飾を含むが、これらに限定されない)を含む。核酸は、既知のヌクレオチドアナログあるいは修飾主鎖残基または結合もしくは修飾糖残基、あるいは非標準的/化学的修飾核酸塩基及びそれらの組み合わせを含有する核酸を含み、これらは、合成、天然、及び非天然であり、これは、標準核酸と同様の結合性質を有する。そのようなアナログ及び/または修飾残基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロアミダート、メチルホスホナート、キラルメチルホスホナート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、及びペプチド核酸(PNA)が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0064】

「核酸」という用語は、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含み、最大60ヌクレオチドを含むフラグメントは、一般に、オリゴヌクレオチドと呼ばれ、それより長いフラグメントはポリヌクレオチドと呼ばれる。デオキシリボオリゴヌクレオチドは、交互の非分岐ポリマーを形成するために、この糖の5'及び3'炭素でリン酸に共有結合したデオキシリボースと呼ばれる5炭素糖からなる。DNAは、例えば、アンチセンス分子、プラスミドDNA、プレコンデンスDNA、PCR産物、ベクター、発現カセット、キメラ配列、染色体DNA、またはこれらの群の誘導体及び組み合わせの形態であり得る。リボオリゴヌクレオチドは、五炭糖がリボースである同様の繰り返し構造からなる。従って、「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然に存在する塩基、糖、及び糖間(主鎖)結合からなるヌクレオチドまたはヌクレオシドモノマーのポリマ

40

50

ーまたはオリゴマーを指し得る。「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、同様に機能する天然に存在しないモノマーまたはその一部を含むポリマーまたはオリゴマーも含み得る。そのような修飾または置換オリゴヌクレオチドは、例えば、細胞取り込みの増強、免疫原性の低減、及びヌクレアーゼ存在下での安定性などの特性から、多くの場合、天然型よりも好まれる。「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書に記載されているような、主鎖の修飾と組み合わせた、デオキシ及びリボヌクレオチドの両方の組み合わせを含むポリマーもしくはオリゴマー、またはそのバリエーションも含み得ると理解すべきである。

【0065】

本明細書に記載の「核酸」は、1つ以上のヌクレオチドバリエーション、例えば、非標準ヌクレオチド（複数可）、非天然ヌクレオチド（複数可）、ヌクレオチドアナログ（複数可）、及び／または修飾ヌクレオチドを含み得る。修飾ヌクレオチドの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ジアミノプリン、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロロウラシル、 β -D-ガラクトシルクエオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイブトキソシン、プソイドウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w, 2,6-ジアミノプリンなど。いくつかの場合では、ヌクレオチドは、三リン酸部分への修飾を含む、リン酸部分の修飾を含み得る。そのような修飾の非限定例としては、より長いリン酸鎖（例えば、4、5、6、7、8、9、10以上のリン酸部分を有するリン酸鎖）ならびにチオール部分による修飾（例えば、 α -チオ三リン酸及び β -チオ三リン酸）が挙げられる。

【0066】

本明細書に記載されている核酸は、塩基部分（例えば、通常、相補的ヌクレオチドとの水素結合を形成するのに利用できる1つ以上の原子、及び／または、通常、相補的なヌクレオチドとの水素結合を形成することが可能でない1つ以上の原子）、糖部分、またはリン酸主鎖で修飾され得る。主鎖修飾は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニラデート、ホスホロアミデート、及びホスホロジアミデート結合を含み得るが、これらに限定されない。ホスホロチオエート結合は、リン酸主鎖の非架橋酸素を硫黄原子に置き換え、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ分解を遅延させる。ホスホロジアミデート結合（N3'→P5'）は、ヌクレアーゼの認識及び分解を防ぐ。主鎖修飾は、主鎖構造内のリンの代わりにペプチド結合（例えば、ペプチド核酸内のペプチド結合で結合されたN-(2-アミノエチル)-グリシン単位）、またはカルバマート、アミド、ならびに直鎖状及び環状炭化水素基を含む連結基も含み得る。修飾主鎖を有するオリゴヌクレオチドは、以下で概説される：Micklefield, Curr. Med. Chem., 8 (10): 1157-79, 2001及びLyer et al., Curr. Opin. Mol. Ther., 1 (3): 344-358, 1999。本明細書に記載の核酸分子は、天然ヌクレオチドに存在するようなりボースもしくはデオキシリボースを含む糖部分、または修飾糖部分もしくは糖アナログを含有してもよい。修飾糖部分は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル、2'-O-アミノエチル、2'-フルオロ、N3'→P5'ホスホロアミデート、2'ジメチルアミノオキシエトキシ、2'2'ジメチルアミノエトキシエトキシ、2'-グアニジニウム、2'-O-グアニジニウムエチル、カルバマート修飾糖、及び二環式修飾糖

を含むが、これらに限定されない。2'-O-メチルまたは2'-O-メトキシエチル修飾は、オリゴヌクレオチドのA型またはRNA様構造を促進し、RNAへの結合親和性を高め、ヌクレアーゼ耐性を高めている。修飾糖部分は、余分な架橋結合（例えば、ロックド核酸のリボースの2'-O原子及び4'-C原子を結合するメチレン架橋）またはモルホリン環などの糖アナログ（例えば、ホスホロジアミデートモルホリノにおけるもの）も含み得る。

【0067】

別途指示のない限り、特定の核酸配列は、その保存的に修飾されたバリエーション（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNP、及び相補配列ならびに明示された配列を暗黙裡に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された（または全ての）コドンの3番目の位置が混合塩基及び/またはデオキシイノシン残基で置換される配列を生成することにより達成され得る（Batzner et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994))。

【0068】

本開示は、単離されたまたは実質的に精製された核酸分子及びそれらの分子を含有する組成物を包含する。本明細書で使用される場合、「単離された」または「精製された」DNA分子またはRNA分子は、その本来の環境から離れて存在するDNA分子またはRNA分子である。単離されたDNA分子またはRNA分子は、精製形態で存在し得るか、または、例えば、トランスジェニック宿主細胞などの非天然環境に存在し得る。例えば、「単離された」または「精製された」核酸分子またはその生物学的に活性な部分は、組み換え手法で生成される場合、他の細胞材料もしくは培地を実質的に含まず、または化学合成される場合、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。一実施形態では、「単離された」核酸は、核酸が由来する生物のゲノムDNAにおいて、核酸に天然に隣接する配列（すなわち、核酸の5'末端及び3'末端に位置する配列）を含まない。

【0069】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」、「ポリペプチド」、及び「ペプチド」という用語は、互換的に使用され、ペプチド結合を介して連結されており、2つ以上のポリペプチド鎖から構成され得るアミノ酸残基のポリマーを指す。「ポリペプチド」、「タンパク質」、及び「ペプチド」という用語は、アミド結合を介して結合している少なくとも2つのアミノ酸モノマーのポリマーを指す。アミノ酸は、L光学異性体またはD光学異性体であってよい。より具体的には、「ポリペプチド」、「タンパク質」、及び「ペプチド」という用語は、特定の順序、例えば、タンパク質をコードする遺伝子またはRNA内のヌクレオチドの塩基配列により決定される順序、で2つ以上のアミノ酸から構成される分子を指す。タンパク質は、体の細胞、組織、及び器官の構造、機能、及び制御に不可欠であり、各タンパク質は、独自の機能がある。例は、ホルモン、酵素、抗体、及びそれらの任意のフラグメントである。いくつかの場合では、タンパク質は、タンパク質の一部、例えば、タンパク質のドメイン、サブドメイン、またはモチーフであり得る。いくつかの場合では、タンパク質は、1つ以上のアミノ酸残基が、タンパク質の天然に存在する（または少なくとも既知の）アミノ酸配列に挿入、欠失、及び/または置換されるタンパク質のバリエーション（または変異）であり得る。タンパク質またはそのバリエーションは、天然に存在するか、または組み換えであり得る。生体材料中のポリペプチドの検出及び/または測定方法は、当該技術分野で周知であり、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、ELISA、RIA、及び様々なプロテオミクス手法を含むが、これらに限定されない。ポリペプチドを測定または検出する例示的な方法は、ELISAなどのイムノアッセイである。このタイプのタンパク質定量は、特定の抗原を捕捉することが可能な抗体と、捕捉された抗原を検出することが可能な2次抗体に基づくものであり得る。

【0070】

「対象」または「患者」という用語は、哺乳動物を包含する。哺乳動物の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：哺乳動物クラスの任意のメンバー：ヒト、非ヒト霊長類、例えば、チンパンジー、ならびに他の類人猿及びサル種；家畜、例えば、

ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ；家畜、例えば、ウサギ、イヌ、及びネコ；実験動物、例えば、齧歯動物、例えば、ラット、マウス、及びモルモットなど。

【0071】

「それを必要とする対象」は、疾患、疾患の症状、または疾患に対する素因を有し、疾患、疾患の症状、または疾患に対する素因の治療、解消、緩和、軽減、変化、治療、寛解、改善、またはそれに影響を及ぼすことを目的とする個体を指す。いくつかの実施形態では、対象は、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス（hATTR）に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、トランスサイレチンアミロイドーシスによる心筋症（ATTR-CM）に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、トランスサイレチンアミロイドーシスによる多発性神経障害（ATTR-PN）に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、野生型ATTR（ATTRwt）、野生型TTRタンパク質の加齢関連沈着（以前は、老人性アミロイドーシスとして知られた）に罹患している。

10

【0072】

本明細書で使用される「投与」及びその文法的同等物は、本明細書に記載の1つ以上の複製能を有する組み換えアデノウイルスまたは医薬組成物を対象または患者に提供することを指し得る。限定ではなく例として、「投与すること」は、静脈内(i.v.)注射、皮下(s.c.)注射、皮内(i.d.)注射、腹腔内(i.p.)注射、筋肉内(i.m.)注射、血管内注射、脳室内(i.c.v.)注射、髄腔内(i.t.)注射、注入(inf.)、経口経路(p.o.)、局所(top.)投与、または直腸(p.r.)投与で実施することができる。1つ以上のそのような経路を用いることができる。

20

【0073】

本明細書で使用される「非経口」という用語は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液嚢内、胸骨内、脳室内、髄腔内、病変内、及び頭蓋内注射または注入手法を含む。非経口投与は、例えば、ボラス注射または時間をかけて徐々に灌流することにより行うことができる。さらに、それは、例えば、1、3、または6ヶ月のデポー注射可能または生分解性材料及び方法を使用して、注射可能なデポー投与経路を介して対象に投与することができる。

【0074】

本明細書で使用される「処置する」、「処置すること」、または「処置」という用語、及びその文法的同等物は、予防的及び/または治療的に、疾患もしくは状態の少なくとも1つの症状を緩和、軽減、もしくは改善すること、追加の症状を予防すること、疾患もしくは状態を阻害すること、例えば、疾患もしくは状態の進行を阻止すること、疾患もしくは状態を緩和すること、疾患もしくは状態の退行を引き起こすこと、疾患もしくは状態により引き起こされる状態を緩和すること、または、疾患もしくは状態の症状を停止させること、を含み得る。「処置すること」は、疾患または状態の発症後または発症が疑われた後の対象に、脂質ナノ粒子（LNP）などのナノ粒子を含む組成物を投与することを指し得る。「処置すること」は、「緩和する」という概念を含み、これは、疾患もしくは状態に関連する任意の症状もしくは他の悪影響、及び/または疾患もしくは状態に関連する副作用の、出現もしくは再発の頻度、または重症度の低減を指す。「処置すること」という用語は、患者の特定の疾患もしくは障害の重症度を低減すること、または、その再発を遅延させること、例えば、疾患に罹患していた患者の寛解期間を延長すること、を指す「管理すること」の概念も包含する。「処置すること」という用語は、さらに、「予防する」、「防止すること」、及び「予防」の概念を包含する。排除されないが、障害または状態を処置することは、それに関連する障害、状態、または症状が完全に除去されることを必要としないことが理解される。

30

40

【0075】

本明細書で使用される場合、「予防する」、「予防すること」、「予防」などの用語は、疾患または状態の発症がないが、そのリスクがあるか、またはそれに罹患しやすい対象の疾患または状態を発症する可能性を低減すること、を指す。

【0076】

50

本明細書で使用される「改善する」という用語は、疾患の発症または進行を減少、抑制、減弱、減少、阻止、または安定化させることを指すことができる。

【0077】

本明細書で使用される場合、疾患の発症を「遅延させること」は、疾患の進行を遅延、妨害、減速、抑制、安定化、及び/または延期することを意味する。この遅延は、疾患の病歴及び/または処置される個体に応じて、様々な時間のものであり得る。疾患の発症を「遅延」もしくは軽減するか、または、疾患の発症を遅延させる方法は、方法を使用しない場合と比較して、所定の時間フレームで疾患の1つ以上の症状を発症する可能性を低減させるか、及び/または所定の時間フレームで症状の程度を低減する方法である。そのような比較は、通常、統計的に有意な結果を得るのに十分な対象数を使用した臨床研究に基づいている。

10

【0078】

疾患の「発症」または「進行」は、疾患の初期症状及び/またはその後の進行を意味する。疾患の発症は、当該技術分野で周知の標準的な臨床技術を使用して検出可能であり、評価することができる。しかし、発症は、検出不可能であり得る進行も指す。本開示の目的では、発症または進行は、症状の生物学的経過を指す。「発症」は、発生、再発、及び発病を含む。

【0079】

本明細書で使用される場合、疾患の「発病」または「発生」は、最初の発病及び/または再発を含む。

20

【0080】

「治療薬」という用語は、対象に投与される場合、治療効果、診断効果、及び/もしくはは予防効果を有し、ならびに/または所望の生物学的効果及び/または薬理学的効果を誘発する任意の薬剤を指し得る。治療薬は、「活性物質」または「活性薬」とも呼ぶことができる。そのような薬剤は、細胞毒素、放射性イオン、化学療法薬、小分子薬剤、タンパク質、及び核酸を含むが、これらに限定されない。

【0081】

本明細書で使用される「医薬組成物」という用語及びその文法的同等物は、対象、例えば、それを必要とするヒト、に投与されるべき1つ以上の薬学的に許容される賦形剤、担体、及び/または治療薬と共に、治療有効量の医薬品有効成分を含む混合物または溶液を指し得る。

30

【0082】

本明細書で使用される「薬学的に許容される」という用語及びその文法的同等物は、一般に安全で、無毒で、生物学的にも他の点で望ましくないものでもなく、獣医学及びヒトの医薬品用途に許容される、医薬組成物の調製に有用な材料の属性を指すことができる。

「薬学的に許容される」は、化合物の生物学的活性または特性を無効にせず、比較的非毒性である、担体または希釈剤などの物質を指し得、すなわち、かかる物質は、望ましくない生物学的影響を引き起こすことなく、または含有される医薬組成物の構成成分のいずれかと有害な形で相互作用することなく、対象に投与され得る。

【0083】

「薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤」は、薬剤と一緒に対象に投与することができる賦形剤、担体、または希釈を指し、これは、その薬理活性を破壊せず、治療量の薬剤を送達するのに十分な用量で投与された場合、非毒性である。

40

【0084】

「薬学的に許容される塩」は、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症のない、ヒトまたは動物の組織と接触して使用するのに適している当該技術分野で一般に考えられている酸または塩基の塩であってよい。当業者は、本開示及び当該技術分野の知識から、さらなる薬学的に許容される塩が以下に記載されるものを含むことを理解するであろう：Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p.1418 (1985)。

50

【0085】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、感染症、疾患、障害、及び/または状態に罹患しているか、またはそれらに罹患しやすい対象に投与される場合に、その感染症、疾患、障害、及び/または状態を処置、その症状を改善、診断、予防、及び/またはその発病を遅延させるために十分な、送達されるべき薬剤(例えば、核酸、薬物、ペイロード、組成物、治療薬、診断薬、予防薬など)の量を意味する。

【0086】

本明細書で提供される範囲は、その範囲内の全ての値の省略形であると理解される。例えば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50からなる群の、任意の数値、数値の組み合わせ、または部分範囲、ならびに、例えば、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、及び1.9などの上述の整数の間にある全ての少数の数値を含むと理解されている。部分範囲に関しては、範囲のいずれかの端点から広がる「入れ子になった部分範囲」が具体的に企図されている。例えば、1～50の例示的な範囲の入れ子になった部分範囲は、一方向に1～10、1～20、1～30、及び1～40、または、反対方向に50～40、50～30、50～20、及び50～10を含んでもよい。

10

【0087】

本明細書及び特許請求の範囲で使用される構成成分の量、分子量などを表す数字は、全ての場合において「約」という用語で修飾されるものとして理解されるべきである。従って、別途反対の指示のない限り、明細書及び特許請求の範囲に記載の数値パラメータは、本発明により入手しようとする所望の特性に応じて変動し得る近似値である。控えめに言っても、均等論を特許請求の範囲に限定するものではなく、各数値パラメータは、少なくとも報告された有効桁数を考慮して、通常の丸め手法を適用することにより解釈されるべきである。

20

【0088】

本発明の広い範囲を示す数値範囲及びパラメータは、近似値であるにもかかわらず、特定の実施例に示される数値は、可能な限り正確に報告されている。しかし、全ての数値は、それぞれの試験測定値で見出される標準偏差から必然的に生じる範囲を本質的に含有する。

30

【0089】

本明細書で使用される場合、ガイド核酸のスペーサー配列は、スペーサー配列を含む塩基エディターシステムの塩基エディターが標的核酸内の塩基に修飾を加えることが可能な場合、標的核酸のプロトスペーサー配列に対して「相同」であるとみなされる。プロトスペーサー配列と相同なスペーサー配列は、プロトスペーサー配列と同一または実質的に同一であってよい。

【0090】

本明細書で使用される場合、別の核酸配列と「実質的に同一」な核酸配列は、他の核酸配列と70%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列である。

40

【0091】

RNA配列(例えば、スペーサー)及びDNA配列(例えば、標的遺伝子プロトスペーサー)間のパーセント配列同一性を目的として、RNA中のウラシル塩基は、DNA配列中のチミン塩基と同一であるとみなされるべきである。

【0092】

本明細書で使用される場合、「配列同一性」は、最適にアラインされた2つの核酸配列が、構成要素、例えば、ヌクレオチド、のアラインメントのウィンドウ全体にわたって不変である程度を指す。「同一性」は、限定されないが、以下に記載されている方法を含む既知の方法により容易に計算することができる: Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, New York (1988); Biocomp

50

uting: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987);及びSequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Stockton Press, New York (1991)。

【0093】

本明細書で使用される場合、「配列同一性パーセント」または「同一性パーセント」という用語は、2つの配列が最適にアラインメントされている場合、試験(「対象」)核酸(またはその相補鎖)と比較して、参照(「クエリ」)核酸(またはその相補鎖)の直鎖状ポリヌクレオチド配列における同一ヌクレオチドの割合を指す。配列同一性パーセントは、比較される配列が最大の一致を目指してアラインされる場合、以下に記載の配列比較アルゴリズムを使用して測定されるように、及び当該技術分野で知られているように、または、目視検査により、決定され得る。

【0094】

配列比較の場合、通常、1つの配列が、テスト配列と比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、テスト配列及び参照配列が、コンピューターに入力され、必要に応じて、部分配列座標が設計され、配列アルゴリズムプログラムのパラメーターが指定される。次に、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列(複数可)の配列同一性パーセントを計算する。比較ウィンドウをアラインさせるための配列の最適なアラインメントは、当業者に周知であり、Smith and Watermanの局所相同性アルゴリズム、Needleman and Wunschの相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipmanの類似性検索法、任意に、GCG(登録商標)Wisconsin Package(登録商標)(Accelrys Inc., San Diego, CA)の一部として利用可能なGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTAなどのこれらのアルゴリズムのコンピューター化された実装によるものなどのツールで行われ得る。試験配列及び参照配列のアラインされたセグメントの「同一性比率」は、2つのアラインされた配列により共有される同一の構成要素の数を、参照配列セグメントの構成要素の総数、すなわち、全参照配列または参照配列のより小さい定義された部分、で除したものである。配列同一性パーセントは、100を乗じた同一性の割合として表される。

【0095】

「同一性パーセント」は、また、翻訳されたヌクレオチド配列の場合、BLASTXバージョン2.0を、ポリヌクレオチド配列の場合、BLASTNバージョン2.0を使用して決定され得る。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通じて一般に利用可能である。このアルゴリズムは、まず、クエリ配列内の長さWの短いワードを同定することにより、高スコアの配列ペア(HSP)を同定することを含み、これらは、データベース配列内の同じ長さのワードとアラインされた場合、いくつかの正の値の閾値スコアTと一致するかまたはそれらを満たす。Tは、近傍ワードスコア閾値と呼ばれる(Altschul et al., 1990)。これらの最初の近傍ワードヒットは、それらを含む長いHSPを見出す検索を開始するためのシードとして機能する。次に、ワードヒットは、累積アライメントスコアを増加させることができる限り、各配列に沿って両方向に拡張される。累積スコアは、ヌクレオチド配列のパラメーターM(一致する残基のペアに対する報酬スコア、常に >0)及びN(不一致残基に対するペナルティスコア、常に <0)を使用して計算される。各方向のワードヒットの拡張は、累積アライメントスコアが最大達成値から量Xだけ低下するか、1つ以上の負のスコアの残基アライメントの蓄積により累積スコアが0以下になるか、またはいずれかの配列の終わりに達する場合、停止される。BLASTアルゴリズムのパラメーターW、T、及びXは、アライメントの感度及び速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列の場合)は、デフォルトとしてワード長(W)11、期待値(E)10、カットオフ100、M=5、N=-4、及び両鎖の比較を使用する。

【0096】

配列同一性パーセントの計算に加えて、BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計分析も実施する（例えば、以下を参照：Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)）。BLASTアルゴリズムで提供される類似性の尺度の1つは、最小合計確率（ $P(N)$ ）であり、これは、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然に発生する確率の指標を提供する。例えば、試験ヌクレオチド配列対参照ヌクレオチド配列との比較における最小合計確率が、約0.1未満～約0.001未満である場合、試験核酸配列は、参照配列に類似しているとみなされる。

【0097】

いくつかの実施形態では、第2のヌクレオチド配列に相同である第1のヌクレオチド配列は、ストリンジェントな条件または高ストリンジェントな条件下で第2のヌクレオチド配列の相補配列にハイブリダイズし得る。核酸ハイブリダイゼーションの文脈における「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」及び「ストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件」は、配列に依存し、異なる環境パラメーターの下では異なる。核酸のハイブリダイゼーションに関する広範なガイドは、以下に見出される：Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, New York (1993)。一般に、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、規定のイオン強度及びpHにおける特定の配列の熱融解点(T_m)より約5℃低くなるように選択される。 T_m は、標的配列の50%が、完全に一致するプローブにハイブリダイズする温度（規定されたイオン強度及びpHの下で）である。高度にストリンジェントな条件は、特定のプローブの T_m と等しくなるように選択される。サザンブロットまたはノーザンブロットにおいてフィルター上に100を超える相補的残基を有する相補的ヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションのためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は、42℃で1mgのヘパリンを含む50%のホルムアミドであり、ハイブリダイゼーションは、一晚実施される。高ストリンジェントな洗浄条件の例は、0.15MのNaCl、72℃、約15分間である。ストリンジェントな洗浄条件の例は、65℃で15分間の0.2x SSC洗浄である（SSCバッファの説明については以下を参照：Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 for a description of SSC buffer）。多くの場合、バックグラウンドのプローブシグナルを除去するために、高ストリンジェンシーの洗浄の前に低ストリンジェンシーの洗浄が行われる。例えば、100ヌクレオチドを超える、二本鎖に対する中程度のストリンジェンシーの洗浄の例は、45℃で15分間の1x SSCである。例えば、100ヌクレオチドを超える、二本鎖に対する低ストリンジェンシーの洗浄の例は、40℃で15分間の4～6x SSCである。短いプローブ（例えば、約10～50ヌクレオチド）の場合、ストリンジェントな条件は、通常、pH7.0～8.3で、約1.0M未満のNaイオンの塩濃度、通常は、約0.01～1.0MのNaイオン濃度（または他の塩）を含み、温度は、通常は、少なくとも約30℃である。ホルムアミドなどの不安定化剤を添加して、ストリンジェントな条件を達成することもできる。

【0098】

本出願全体のいくつかの箇所では、例を通じてガイダンスが提供され、特定の態様を含むそれらの例は、様々な組み合わせで使用され、特許請求の範囲の対象となる。それぞれの事例では、記載のリストは、代表的な群としてのみ機能し、排他的なリストとして解釈されるべきではない。特定の例、材料、量、及び手順は、本明細書に記載の本発明の範囲及び趣旨に従って広く解釈されるべきであることが理解されるべきである。

【0099】

本明細書に開示される、個別のステップを含む任意の方法については、ステップは、実行可能な任意の順序で実行され得る。また、必要に応じて、2つ以上のステップの任意の組み合わせが、同時に実行されてもよい。

【0100】

全ての見出しは、読者の便宜のためのものであり、特に指定がない限り、見出しに続くテキストの意味を制限するために使用されるべきではない。

【0101】

トランスサイレチンタンパク質及び遺伝子

元々ブレアルブミンとして知られたトランスサイレチン (TTR) は、チロキシン (T₄) 及びレチノール結合タンパク質の両方に関する55kDaの輸送タンパク質であり、これは、健康なヒトの血清及び脳脊髄液 (CSF) 中で可溶性の形態で循環する。TTRは、主に、肝臓で合成されると理解されている。通常の条件下では、TTRは、中央チャネルを有するホモテトラマーとして循環する。野生型TTRモノマーの長さは、147アミノ酸であり、以下のアミノ酸配列を有する：

MASHRLLLLC LAGLVFVSEA GPTGTGESKC PLMVKVLDVAV RGSPAINVAV
HVFRKAADDT WEPFASGKTS ESGELHGLTT EEEFVEGIYK VEIDTKSYWK
ALGISPFHEH AEVVFTANDS GPRRYTIAAL LSPYSYSTTA VVTNPKE (配列番号
23)。

【0102】

TTR遺伝子は、4つのエクソンで構成され、18q12.1の染色体18に位置する。ヒトTTR遺伝子の完全な配列が図4に示され、UniProtKB-P02766 (TTHY_HUMAN) でも入手できる。これまでに120を超えるTTRバリエーションが同定されており、その大部分は病原性である。最も一般的な病原性バリエーションは、成熟タンパク質の30位でバリンのメチオニンによる置換をもたらす点変異からなる。このVal30Met変異は、hATTRアミロイドーシスの原因であり、世界中で最も頻繁に起こるアミロイド形成性変異であり、TTRバリエーションの約50%を占めている。

【0103】

遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス (hATTR) は、TTR遺伝子の変異により引き起こされる疾患である。常染色体優性変異は、TTRテトラマーを不安定化し、モノマーへの解離を増強し、これにより、ミスフォールディング、凝集、及びその後の様々な組織部位でのTTRアミロイド線維の細胞外沈着をもたらされる。この多系統の細胞外アミロイド沈着 (アミロイドーシス) により、様々な臓器及び組織の機能不全をもたらされる。特に、トランスサイレチンアミロイドーシスによる多発性神経障害 (ATTR-PN) 及びトランスサイレチンアミロイドーシスによる心筋症 (ATTR-CM) は、重大な罹患率及び死亡率を伴う重度の疾患である。

【0104】

hATTR-PNの臨床的疑いがある場合、診断は、通常、アミロイド染色を伴う組織生検、アミロイドタイピング (免疫組織化学もしくは質量分析を使用)、及び/またはTTR遺伝子シーケンシングにより行われる。臨床的にATTR-CMの疑いがある場合、重要な診断ツールは、心筋生検 (免疫組織化学もしくは質量分析による組織染色及びアミロイドタイピングを用いる) または99mテクネチウムピロリン酸スキャンのいずれかである。これらのアプローチは双方ともに、ATTR-CMの診断を提供し得る。TTR遺伝子シーケンシングは、hATTR-CM (変異陽性) 及びATTRwt-CM (変異陰性) を区別するために使用することができる。

【0105】

本明細書に記載の組成物は、例えば、TTR遺伝子に1つ以上の核酸塩基の変化を導入することにより、遺伝子編集タンパク質 (例えば、塩基エディター) に、TTR遺伝子を変化させるように誘導するガイドとして機能するヌクレオチド配列を有するスパーサーを含む。これらの点変異は、低機能的または非機能的タンパク質の産生をもたらし、それにより、TTR遺伝子がサイレンシングされるミスセンス変異 (複数可) の導入により、遺伝子機能を破壊するために使用され得る。あるいは、1つ以上の点変異に対する修正が、TTR遺伝子の機能不全を引き起こす原因の変異を修正する、または、別の方法で遺伝子の機能不全を軽減するために、変異した遺伝子を改変する遺伝子編集タンパク質を使用して

行われ得ることが本明細書で企図される。

【0106】

遺伝子編集/遺伝子の改変

本明細書で使用される「遺伝子編集」または「遺伝子改変」という用語及びその文法的同等物は、1つ以上のヌクレオチドがゲノムに挿入、置換、またはそれから除去される遺伝子操作を指す。遺伝子編集は、ヌクレアーゼ（例えば、天然に存在するヌクレアーゼまたは人工的に操作されたヌクレアーゼ）を使用して実施することができる。遺伝子改変は、ポリヌクレオチド配列、例えば、標的ポリヌクレオチド配列における、二本鎖切断、ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライス部位の変化、または逆位を導入することを含み得る。図1Aは、DNAまたは遺伝子の部位特異的位置に二本鎖切断を与えるために使用することができるRNA誘導性エンドヌクレアーゼであるcrispr Cas9タンパク質を示す。遺伝子修飾は、塩基エディターなどの他のエディターを使用しても行うこともできる。

10

【0107】

塩基エディター

塩基エディター(BE)または核酸塩基エディター(NBE)は、核酸配列（例えば、DNAまたはRNA）内の塩基（例えば、A、T、C、G、またはU）に修飾を加えることが可能なポリペプチドを含む薬剤を指す。塩基エディターは、塩基編集ウィンドウ内の1つの位置または2つ以上の位置で、ポリ核酸配列中の核酸塩基を、別の核酸塩基に変換（例えば、転移またはトランスバージョン）することができる巨大分子または巨大分子複合体を含んでもよい。塩基エディターは、(a)ヌクレオチド、ヌクレオシド、または核酸塩基変換酵素、及び、(b)特定の核酸配列に結合するようにプログラムすることができる核酸結合タンパク質、の組み合わせを含んでもよい。核酸結合タンパク質は、一本鎖核酸標的を切断しないように、または二本鎖核酸標的の多くとも一方の鎖でニックを入れるかもしくは切断するように、触媒的に不活化または損なわれ得る。

20

【0108】

塩基エディターは、塩基編集活性を有するドメインに融合または連結されているポリヌクレオチドのプログラム可能なDNA結合ドメインを含んでもよく、それにより、塩基エディター融合タンパク質が得られる。塩基エディター融合タンパク質は、1つ以上のリンカー、例えば、ドメイン間のペプチドリンカー、を含んでもよい。いくつかの実施形態では、塩基編集活性を有するドメインは、（例えば、ガイドRNA上のRNA結合モチーフ、及びデアミナーゼに融合されているRNA結合ドメインを介して）ガイドRNAに連結される。

30

【0109】

いくつかの実施形態では、塩基エディターは、触媒作用が損なわれたCRISPR-Cas酵素に融合しているデアミナーゼドメインを含むモジュール式プログラム可能タンパク質のクラスである。二本鎖DNA切断を生じさせることなく、加水分解脱アミノ化及びその後の細胞プロセッシングを通じて、アデニン塩基エディター(ABE)は、A:T塩基対をG:C塩基対に変換し、シトシン塩基エディター(CBE)は、C:G塩基対をT:A塩基対に変換する。塩基エディターのそれぞれのデアミナーゼは、D10AニックアーゼCas9(nCas9)内のガイドRNA(gRNA)により目的の部位に向けられる。CBEのシチジンデアミナーゼ酵素は、シトシンのウリジンへの変換を指示し、それにより、C→T（またはG→A）置換がもたらされる（図1Bを参照）。「シチジンデアミナーゼ」は、本明細書では、デオキシシチジンで、シチジンで、またはデオキシシチジン及びシチジンの両方で作用して、シトシンをウリジンに変換するデアミナーゼ酵素を指すために使用される。シチジンデアミナーゼ及びシトシンデアミナーゼは、本明細書では互換的に使用され得る。目標が治療目的でin vivoで遺伝子を破壊することである場合、シトシン塩基エディター(CBE)は、グルタミン(CAG→TAG、CAA→TAA)、アルギニン(CGA→TGA)、及びトリプトファン(TGG→TAG/TAA/TGA、アンチセンス鎖上のシトシンを編集)に対する特定のコードンを変更することにより、終止コードンを遺伝子のコード配列に潜在的に直接導入でき

40

50

る可能性がある（ナンセンス変異）。

【0110】

比較すると、ABEのアデノシンデアミナーゼ酵素は、アデノシンからイノシンへの変換を指示し、それにより、A→G（またはT→C）置換がもたらされる（図1Bを参照）。「アデノシンデアミナーゼ」は、本明細書において、デオキシアデノシンで、アデノシンで、またはデオキシアデノシン及びアデノシンの両方で作用して、アデニンをヒポキサンチンに、あるいはアデノシンをイノシンに変換する、デアミナーゼ酵素を指すために使用される。イノシンの構造がグアノシンに類似しているため（イノシンは、グアノシンの環外アミノ基を含まない）、イノシンは、グアノシンのように挙動する傾向がある。イノシンは、最終的に、その後の細胞処理を通じてグアノシンに置き換えられる。従って、アデノシンデアミナーゼは、A→G（またはT→C）置換をもたらす。アデノシンデアミナーゼ及びアデニンデアミナーゼは、本明細書では互換的に使用され得る。アデニン塩基エディター（ABE）は、ナンセンス変異を引き起こすA→G変化がないので、終止コドンに直接導入できない。

10

【0111】

アデニン塩基エディターは、例えば、開始コドンに、ATG→GTGまたはATG→ACGのいずれかに編集することにより遺伝子機能を破壊するために使用することができる。アデニン塩基エディターが遺伝子機能を破壊し得る2番目の方策は、イントロンの5'末端のスプライスドナーかイントロンの3'末端のスプライスアクセプターのスプライス部位を編集することによるものである。スプライス部位の破壊は、ナンセンス変異、フレームシフト変異、またはインフレーム変異が導入される可能性がある、メッセンジャーRNA（mRNA）中のイントロン配列の含有をもたらす得、これらの変異は、未成熟終止コドン、またはタンパク質の活性を阻害するアミノ酸の挿入/欠失、またはナンセンス変異、フレームシフト変異、もしくはフレーム内インデル変異の導入の可能性があるエクソン配列の除外をもたらす。

20

【0112】

図2に示されるように、正準スプライスドナーは、センス鎖上にDNA配列GTを含む一方、正準スプライスアクセプターは、DNA配列AGを含む。配列の変更は、正常なスプライシングを破壊する。スプライスドナーは、アンチセンス鎖の2番目の位置の相補塩基のアデニン塩基編集（GT→GC）により破壊することができ、スプライスアクセプターは、センス鎖の1番目の位置のアデニン塩基編集（AG→GG）により破壊することができる。

30

【0113】

アデニン塩基エディター（ABE）は、ABE8.8を含むが、これに限定されない（Gaudelli et al., Nat Biotechnol. 2020 Jul;38(7):892-900. doi: 10.1038/s41587-020-0491-6. Epub 2020 Apr 13)）。

【0114】

実施形態では、アデニン塩基エディターは、表11に示されるMA004 mRNAの配列を含むmRNAにコードされる。実施形態では、アデニン塩基エディターは、表11に示されるMA004 mRNAと50%以上の配列同一性、表11に示されるMA004 mRNAと60%以上の配列同一性、表11に示されるMA004 mRNAと70%以上の配列同一性、表11に示されるMA004 mRNAと75%以上の配列同一性、表11に示されるMA004 mRNAと80%以上の配列同一性、表11に示されるMA004 mRNAと85%以上の配列同一性、表11に示されるMA004 mRNAと90%以上の配列同一性、表11に示されるMA004 mRNAと95%以上の配列同一性、表11に示されるMA004 mRNAと96%以上の配列同一性、表11に示されるMA004 mRNAと97%以上の配列同一性、表11に示されるMA004 mRNAと98%以上の配列同一性、または、表11に示されるMA004 mRNAと99%以上の配列同一性を有する配列を含むmRNAにコードされる。

40

【0115】

ABE7.10（Gaudelli et al., Nature. 2017 Nov 23;551(7681):464-471. doi: 10.1038/nature24644）、及びStreptococcus pyogenes Cas9を含有する他の

50

ABEバリエーション。The CRISPR Journal, Volume 4, Number 2, 2021 pp. 169-177及び補足図S1～s9、補足データS4～S6、及び補足表S1～S2は、追加のインレイド塩基エディター(IBE)バリエーションを開示する。

【0116】

いくつかの実施形態では、塩基エディターは、C：G塩基対をG：C塩基対に変換し得る。そのような塩基エディターの例は、以下に開示されている：(a) Chen et al. Programmable C:G to G:C genome editing with CRISPR-Cas9-directed base excision repair proteins. Nat Commun 12, 1384 (2021). doi:10.1038/s41467-021-21559-9.Epub 2021-March-02; (b) Kurt, I.C., Zhou, R., Iyer, S. et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. Nat Biotechnol 39, 41-46 (2021). doi: 10.1038/s41587-020-0609-x.Epub 2020-July-20;及び (c) Zhao, D., Li, J., Li, S. et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. Nat Biotechnol 39, 35-40 (2021). doi: 10.1038/s41587-020-0592-2.Epub 2020-July-20。そのような塩基エディターは、Cas9ニッカーゼ及びシチジンデアミナーゼを含んでもよい。そのような塩基エディターは、さらに、ウラシル-DNAグリコシラーゼ、XRCC1などのDNA修復タンパク質、DNAリガーゼS、またはDNAポリメラーゼβのDNA結合及びリガーゼドメインを含んでもよい。

【0117】

いくつかの実施形態では、塩基エディターは、C：G塩基対を、A：T塩基対に変換し得る。そのような塩基エディターの例は、以下に開示されている：Zhao, D., Li, J., Li, S. et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. Nat Biotechnol 39, 35-40 (2021). doi: 10.1038/s41587-020-0592-2.Epub 2020-July-20。そのような塩基エディターは、Cas9ニッカーゼ及びシチジンデアミナーゼを含んでもよい。そのような塩基エディターは、さらに、ウラシル-DNAグリコシラーゼを含んでもよい。

【0118】

「塩基エディターシステム」という用語は、標的ヌクレオチド配列の核酸塩基を編集するためのシステムを指す。種々の実施形態では、塩基エディターシステムは、以下を含む：(1) ポリヌクレオチドプログラム可能なヌクレオチド結合ドメイン(例えば、Cas9)；(2) 該核酸塩基を脱アミノ化するためのデアミナーゼドメイン(例えば、アデノシンデアミナーゼまたはシチジンデアミナーゼ)；及び、(3) 1つ以上のガイドポリヌクレオチド(例えば、ガイドRNA)。いくつかの実施形態では、塩基エディターシステムは、(1)及び(2)を含む塩基エディター融合タンパク質、または、(1)及び(2)を含む塩基エディター融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド(例えば、mRNA)を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドのプログラム可能なヌクレオチド結合ドメインは、ポリヌクレオチドのプログラム可能なDNA結合ドメインである。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、アデニンまたはアデノシン塩基エディター(ABE)である。いくつかの実施形態では、塩基エディターは、シトシン塩基エディター(CBE)である。

【0119】

ゲノム編集システムは、クラスター化規則的間隔短回文反復(CRISPR)／Casシステムを含む。例示的なガイドヌクレオチド配列プログラム可能なDNA結合タンパク質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Cas9(例えば、dCas9及びnCas9)、saCas9(例えば、saCas9d、saCas9d、saKKHCas9) CasX、CasY、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、アルゴノート、及び本明細書に記載の他の任意の好適なタンパク質、またはその好適なバリエーション。

【0120】

DNA内の配列NGG(Nは、任意の標準塩基)を含む特定のプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に隣接する標的ゲノム(プロトスペーサーとして既知)内のDNAの配列と相同な配列を有するガイドRNA(gRNA)の使用により、Cas9は、標的配列に二本鎖切

断 (DSB) を作成するために使用することができる。DSBでの非相同末端結合 (NHEJ) は、インデルを作成し、遺伝子座で遺伝子をノックアウトする可能性がある。同様に、導入されたテンプレートDNAを使用した相同性指向修復 (HDR) は、遺伝子を挿入したり、標的配列を修飾したりすることができる。

【0121】

近年、様々なCas9ベースのツールが開発されている。(例えば、ゲノム改変のための) 部位特異的切断に、Cas9などのガイドヌクレオチド配列プログラム可能なDNA結合タンパク質を使用する方法が記載されている(例えば、以下を参照: Cong et al., Science 339, 819-823 (2013); Mali et al., Science 339, 823-826 (2013); Hwang et al., Nature Biotechnology 31, 227-229 (2013); Jinek et al., eLife 2, e00471 (2013); Dicarlo et al., Nucleic Acids Research (2013); 及び Jiang et al., Nature Biotechnology 31, 233-239 (2013))。

10

【0122】

2016年に、Komor et al.は、鋳型DNA鎖の導入なしの且つDSBを必要としない、シトシン塩基をチミン塩基に変換するためのCRISPR-Cas9の使用について記載していた(Komor et al., Nature, 2016, 533: 420-4)。ラットAPOBEC1のシチジンデアミナーゼドメインが、リンカーXTENを使用して触媒的に死んだCas9 (dCas9) のN末端に融合された後(塩基エディター1またはBE1と呼ばれる融合タンパク質をもたらす)、シトシンからウラシルへの変換が、DNAの20ntプロトスペーサー領域内の4位及び8位間(または、別の方法で表現すると、PAMの13~17ヌクレオチド上流)に観察された。注目すべきことに、この「ウィンドウ」内のシトシン塩基は、編集の影響を受けやすく、これにより、どれだけの及びどのシトシンが編集されたかに応じて様々な結果が得られた。DNAの複製または修復後、各ウラシルは、チミンに置き換えられ、CからTへの塩基編集が完了した。

20

【0123】

次のバージョンの塩基エディター (BE2) は、シチジンデアミナーゼ活性に起因するウラシル塩基の塩基除去修復の阻害を助けるために、dCas9のC末端に融合されているウラシルグリコシラーゼ阻害剤 (UGI) を組み込んだ(別の方法で、元のシトシン塩基に回復するように作用するであろう); これにより、C→T塩基編集の効率が向上した。

【0124】

塩基エディターの次のバージョン (BE3) は、dCas9ではなくCas9ニックアーゼを使用した。ニックアーゼは、編集されたC→T塩基の反対側にある未編集鎖を切断し、真核生物のミスマッチ修復を通じて反対側のグアニジンの除去が刺激される。BE2及びBE3塩基編集は、ヒト及びマウス細胞株の両方で観察された。図1Bは、BE3の図である。塩基編集の特異性は、Cas9ニックアーゼに変異を追加することでさらに向上しており; 同様の方法で、Cas9は、編集ウィンドウの幅を約5ヌクレオチドから、わずか1~2ヌクレオチドに狭めるように変異されている(Rees et al., Nat Commun, 2017, 8: 15790, Kim et al., Nat Biotechnol, 2017, 35: 371-6)。

30

【0125】

Escherichia coli アデニンtTNAデアミナーゼTadA (ecTadA) をdCas9に融合すること、及び編集活性の選択と併せてecTadAドメインの変異導入は、A106V及びD108N変異が、DNA内のアデニンをグアニンに編集することが可能な塩基エディター (ABE7.10と呼ばれる) を生成したことが明らかになった(Gaudelli et al. Nature, 2017, 551: 464-71)。

40

【0126】

アデニン8.8-m (本明細書では、ABE8.8とも呼ばれる) は、そのコアとなるStreptococcus pyogenes ニックアーゼCas9 (nSpCas9) タンパク質をガイドRNA (gRNA) と共に使用して、3'末端でNGGプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列に隣接する二本鎖プロトスペーサーDNA配列をエンゲージする。プロトスペーサー配列は、gRNAの最初の20塩基と「標的」DNA鎖上の相補配列とのハイブリダイゼーションにより特定さ

50

れ、露出した一本鎖構造形態（Rループと呼ばれる）の残りの（「非標的」）鎖の一部はそのままである。Cas9及びCas12とは異なり、ABE8.8は、標的のDNA配列内で二本鎖切断を行わない。むしろ、図1Cに示されるように、ABE8.8は、nSpCas9に融合した進化したデオキシアデノシンデアミナーゼドメインを使用して、Rループの一本鎖DNA部分に含有されるアデノシンヌクレオシドをイノシンに化学修飾し、RループのDNA:RNAヘテロ二本鎖内の標的DNA鎖にニックを入れる。このニックは、新たに脱アミノ化された鎖を鋳型として使用するようにDNA修復機序にバイアスをかけ、標的部位での非常に効率的な塩基転移変異を可能にする。ABE8.8の活性ウィンドウは、通常、NGG PAM（21～23位）の5'側の12～18塩基対で、gRNAにより指定されるプロトスペーサーDNA配列の3～9位の範囲にあり、ピーク編集は、プロトスペーサーの6位で観察される（Gaudelli et al., Nat Biotechnol. 2020 Jul;38(7):892-900）。

10

【0127】

いくつかの実施形態では、塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸は、mRNAである。いくつかの実施形態では、mRNAは、投与後に標的細胞または対象内で翻訳されると、塩基エディター融合タンパク質を生成する。いくつかの実施形態では、塩基エディター融合タンパク質は、標的細胞または対象内でリボ核タンパク質(RNP)複合体を形成する。

【0128】

本開示の融合タンパク質は、1つ以上の追加の特徴を含み得ると理解されるべきである。例えば、いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、細胞質局在化配列、核輸送配列などの輸送配列、もしくは他の局在化配列、及び、融合タンパク質の可溶化、精製、または検出に有用な配列タグを含んでもよい。本明細書で提供される好適なタンパク質タグは、以下を含むが、これらに限定されない：ビオチンカルボキシラーゼキャリアタンパク質(BCCP)タグ、mycタグ、カルモジュリンタグ、FLAGタグ、ヘマグルチニン(HA)タグ、ヒスチジンタグまたはHisタグとも呼ばれるポリヒスチジンタグ、マルトース結合タンパク質(MBP)タグ、nusタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)タグ、緑色蛍光タンパク質(GFP)タグ、チオレドキシントグ、Sタグ、Softタグ（例えば、Softag 1、Softag 3）、strepタグ、ビオチンリガーゼタグ、FLAsHタグ、V5タグ、及びSBPタグ。追加の好適な配列は、当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、1つ以上のHisタグを含む。

20

【0129】

プロトスペーサー

本明細書で使用される「プロトスペーサー」または「標的配列」という用語及びその文法的同等物は、PAM隣接核酸配列を指し得る。プロトスペーサーは、gRNAに標的とされる遺伝子、ゲノム、または染色体内のヌクレオチド配列であり得る。天然状態では、プロトスペーサーは、PAM（プロトスペーサー隣接モチーフ）に隣接している。RNA誘導性ヌクレアーゼによる切断部位は、プロトスペーサー配列内にある。例えば、図1Aに示されるように、gRNAが特定のプロトスペーサーを標的とする場合、Casタンパク質は、プロトスペーサー配列内で二本鎖切断を生成し、それにより、プロトスペーサーを切断する。切断後に、プロトスペーサーの破壊は、非相同末端結合または相同性指向修復をもたらし得る。プロトスペーサーの破壊は、プロトスペーサーの欠失をもたらし得る。追加的または代替的に、プロトスペーサーの破壊は、外因性核酸配列のプロトスペーサーへの挿入、またはプロトスペーサーの置換をもたらし得る。

30

40

【0130】

本開示では、編集ウィンドウ内（DNAの20ntプロトスペーサー領域のおよそ4～7位）でA→G編集を介して、ABE8.8（及びABE7.10などのStreptococcus pyogenes Cas9を含有する他のABEバリエーション、またはNGG PAMを使用し得る別のCasタンパク質）に、開始コドン破壊させるか、またはスプライス部位（ドナーまたはアクセプター）を破壊させるガイド配列として使用されるべきヒトTTR遺伝子の核酸配列内で、プロトスペーサー配列を同定した。ヒトTTR遺伝子内で、表1に示される配列のうち4つを同

50

定した。ヒトTTR遺伝子のマップ上のこれら4つのプロトスペーサー配列のアラインメントが図3に示される。

【0131】

ガイドRNA GA457に対応するプロトスペーサーは、配列5'-GCCATCCTGCCAAGAA TGAG-3' (配列番号24) を有し、ヒトTTR遺伝子の34,879~34,898bpに位置する。

【0132】

ガイドRNA GA459に対応するプロトスペーサーは、配列5'-GCAACTTATCCAGAGG CAAA-3' (配列番号25) を有し、ヒトTTR遺伝子の36,007~36,026bpに位置する。

【0133】

ガイドRNA GA460に対応するプロトスペーサーは、配列5'-TATAGGAAAACCACT GAGTC-3' (配列番号26) を有し、ヒトTTR遺伝子の38,106~38,125bpに位置する。

10

【0134】

ガイドRNA GA461に対応するプロトスペーサーは、配列5'-TACTCACCTCTGCATG CTCA-3' (配列番号27) を有し、ヒトTTR遺伝子の38,234~38,253に位置する。

【0135】

ガイドRNA GA458に対応するプロトスペーサーは、配列5'-GCCATCCTGCCAAGAA CGAG-3' (配列番号28) を有し、ガイドRNA GA459に対応するヒトプロトスペーサー配列に対応するカニクイザルTTR遺伝子内の配列を表す。

【0136】

ガイド核酸 (例えば、ガイドRNA) は、約15~100ヌクレオチド長であり、標的プロトスペーサー配列に相補的な少なくとも10個の連続するヌクレオチドの配列を含む。いくつかの実施形態では、標的配列の3'末端は、正準PAM配列 (NGG) のすぐ隣にある。いくつかの実施形態では、標的配列の3'末端は、正準PAM配列 (NGG) に直接隣接していない。いくつかの実施形態では、標的配列の3'末端は、AGC、GAG、TTT、GTG、またはCAA配列に直接隣接している。

20

【0137】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、DNAである。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、RNAであり、本明細書では、ガイドRNAまたはgRNAとも呼ばれる。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、修飾された人工ポリヌクレオチドである。

30

【0138】

いくつかの実施形態では、限定されないがgRNAを含む、ガイドポリヌクレオチドが合成され得る。ガイドポリヌクレオチドは、例えば、細胞内の条件下で、表1に示されるプロトスペーサー配列の相補配列にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含んでもよい。ガイドポリヌクレオチドは、表1に示されるプロトスペーサー配列と相同なスペーサー配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、表1に記載のプロトスペーサーと相同な配列を有するスペーサーを含むガイドRNAを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、表1に記載のガイドRNA (gRNA) 配列を含む配列を有し得る。

40

【0139】

本開示は、配列5'-GCCAUCCUGCCAAGAAUGAG-3' (配列番号1) (GA457) と、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性の配列を有するガイドポリヌクレオチドを含む。本開示は、配列5'-GCCAUCCUGCCAAGAAUGAG-3' (配列番号1) (GA457) を有するガイドポリヌクレオチドを含む。

【0140】

本開示は、配列5'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3' (配列番号2) (GA458) と、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性の配列を有するガイドポリヌクレオチドを含む。本開示は、配列5

50

'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3'(配列番号2)(GA458)を有するガイドポリヌクレオチドを含む。

【0141】

本開示は、配列5'-GCAACUUACCCAGAGGCCAAA-3'(配列番号3)(GA459)と、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性の配列を有するガイドポリヌクレオチドを含む。本開示は、配列5'-GCAACUUACCCAGAGGCCAAA-3'(配列番号3)(GA459)を有するガイドポリヌクレオチドを含む。

【0142】

本開示は、配列5'-UAUAGGAAAACCAGUGAGUC-3'(配列番号4)(GA4560)と、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性の配列を有するガイドポリヌクレオチドを含む。本開示は、配列5'-UAUAGGAAAACCAGUGAGUC-3'(配列番号4)(GA4560)を有するガイドポリヌクレオチドを含む。

【0143】

本開示は、配列5'-UACUCACCUCUGCAUGCUCA-3'(配列番号5)(GA4561)と、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性の配列を有するガイドポリヌクレオチドを含む。本開示は、配列5'-UACUCACCUCUGCAUGCUCA-3'(配列番号5)(Ga4561)を有するガイドポリヌクレオチドを含む。

【0144】

ガイドポリヌクレオチドは、少なくとも3つの領域：染色体配列中の標的部位と相同であり得る5'末端の第1の領域（スペーサー領域）、ステムループ構造を形成し得る第2の内部領域、及び一本鎖となり得る3'領域、を含んでもよい。第2及び第3の領域は、ガイドRNAのtracr配列または領域と考えられ、塩基エディターまたはCRISPR/Casタンパク質の結合足場として機能し、スペーサー領域は、タンパク質を特定の標的部位に誘導するために機能する。tracrの頭字語は、trans-活性化crispr (trans-activating crispr) を指す。

【0145】

gRNAの第2領域は、2次構造を形成し得る。いくつかの実施形態では、gRNAにより形成される2次構造は、ステム（またはヘアピン）及びループを含み得る。ループ及びステムの長さは、変動し得る。いくつかの実施形態では、ループは、約3～約10ヌクレオチド長の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、ステムは、約6～約20ヌクレオチド長の範囲であり得る。ステムは、1～10ヌクレオチドまたは約10ヌクレオチドの1つ以上のバルジを含み得る。いくつかの実施形態では、第2の領域の全長は、約16～60ヌクレオチド長の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、ループは、約4ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、ステムは、約12ヌクレオチド長であり得る。

【0146】

gRNAの3'末端の3番目の領域は、一本鎖であり得る。いくつかの実施形態では、第3の領域は、目的の細胞内のどの任意の染色体配列にも相補的ではなく、gRNAの残部にも相補的ではない。第3の領域は、任意の好適な長さを有し得る。例えば、第3の領域は、3ヌクレオチド長以上、または4ヌクレオチド長以上であってよい。いくつかの実施形態では、第3の領域の長さは、約5～約60ヌクレオチド長の範囲で変動し得る。

【0147】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、0、1、2、3、4、または5個のミスマッチを有する、表1に示すTTR遺伝子のプロトスペーサー配列と相同であるスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、ミスマッチのない、表1に示すTTR遺伝子のプロトスペーサー配列と相同なスペーサー配列を含む。

【0148】

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドの長さは、塩基エディターシステム

10

20

30

40

50

のCRISPR/Cas構成要素及び使用される構成要素に依存する。例えば、異なる細菌種に由来する異なるCasタンパク質は、様々な最適な標的化配列長を有する。従って、標的化配列は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、または50ヌクレオチド長以上を含んでもよい。いくつかの実施形態では、標的化配列は、18~24ヌクレオチド長を含む。いくつかの実施形態では、標的化配列は、19~21ヌクレオチド長を含む。表1に記載されるものなどのいくつかの実施形態では、標的化配列は、20ヌクレオチド長を含む。

【0149】

10

いくつかの実施形態では、ガイドポリヌクレオチドは、スペーサー配列を含み、他の点では、標準的な100ntの*Streptococcus pyogenes*のCRISPR gRNA配列に適合する。

【0150】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、化学修飾されている。化学的修飾されたgRNAは、哺乳動物細胞にトランスフェクトされた場合に、安定性が増加していることがある。例えば、gRNAは、各gRNAの少なくとも1つの5'ヌクレオチド及び少なくとも1つの3'ヌクレオチドにおける2'-O-メチルリボ糖及びホスホロチオエート主鎖修飾の組み合わせを含むように化学修飾することができる。いくつかの場合では、3つの末端5'ヌクレオチド及び3つの末端3'ヌクレオチドは、2'-O-メチルリボ糖及びホスホロチオエート修飾の組み合わせを含むように化学修飾されている。

20

【0151】

本明細書に記載のgRNAは、化学的、酵素的、またはそれらの組み合わせで合成することができる。例えば、gRNAは、標準的なホスホルアミダイトベースの固相合成法を使用して合成することができる。あるいは、gRNAは、gRNAをコードするDNAを、ファージRNAポリメラーゼに認識されるプロモーター制御配列に作動可能に連結することにより、*in vitro*で合成することができる。好適なファージプロモーター配列の例としては、T7、T3、SP6プロモーター配列、またはそれらの変形形態が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、gRNAは、2つの別個の分子（例えば、crRNA（スペーサーを含む）及びtracrRNA）を含む。一方の分子（例えば、crRNA）は、化学的に合成することができ、他方の分子（例えば、tracrRNA）は、酵素的に合成できる。

30

【0152】

治療用途

本明細書に記載のガイドポリヌクレオチド及び組成物は、トランスサイレチンアミロイドーシスに関連する状態を予防または処置するために、治療有効量で標的細胞またはそれを必要とする対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、対象は、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス（hATTR）に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、トランスサイレチンアミロイドーシスによる心筋症（ATTR-CM）に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、トランスサイレチンアミロイドーシスによる多発性神経障害（ATTR-PN）に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、野生型ATTR（ATTRwt）、野生型TTRタンパク質の加齢関連沈着（以前は、老人性アミロイドーシスとして知られた）を有している。

40

【0153】

そのような投与では、ガイドポリヌクレオチドは、対象のTTR遺伝子の核酸塩基変化を与えるように、エディターシステム（例えば、ABEエディターシステム）を誘導し、TTR遺伝子を編集して、産生される全長の機能的タンパク質の量を低減または消失させ、それによって症状を処置する。いくつかの実施形態では、塩基変化は、対象の肝臓の細胞（肝細胞）で生じる。

【0154】

例えば、gRNA及びアデノシン塩基エディタータンパク質は、標的遺伝子編集が望まれる細胞（例えば、肝細胞など）で発現され、それにより、標的遺伝子のgRNA及びアデノ

50

シン塩基エディタータンパク質との接触が可能になり得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子内のその標的ポリヌクレオチド配列へのアデノシン塩基エディタータンパク質の結合は、ガイドRNAにより誘導され、gRNAのスペーサー配列は、標的遺伝子内の標的ポリヌクレオチド配列、例えば、プロトスペーサーとの相補的配列、とハイブリダイズする。従って、ガイドRNAは、標的遺伝子内の標的ポリヌクレオチド配列（例えば、プロトスペーサー配列）を編集するようにアデノシン塩基エディタータンパク質を誘導する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、編集が望まれる細胞に、アデノシン塩基エディタータンパク質またはアデノシン塩基エディタータンパク質をコードする核酸と共に同時導入される。

【0155】

特定の実施形態では、アデニン塩基エディターは、標的遺伝子のスプライス部位の核酸塩基を修飾することにより遺伝子の機能及び/または発現を破壊するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアデノシン核酸塩基エディターは、イントロンの5'末端のスプライスドナー部位を、またはイントロンの3'末端のスプライスアクセプター部位を破壊するために使用され得る。いくつかの実施形態では、スプライス部位破壊は、ナンセンス変異、フレームシフト変異、またはインフレームインデル変異を導入する可能性がある、メッセンジャーRNA (mRNA)におけるイントロン配列の包含をもたらし、これらの変異は、未成熟終止コドン、またはタンパク質活性を破壊するアミノ酸の挿入/欠失、またはナンセンス変異、フレームシフト変異、もしくはフレーム内インデル変異も導入し得るエクソン配列の除外をもたらす。

【0156】

正準スプライスドナーは、センス鎖上にDNA配列GTを含む一方、正準スプライスアクセプターは、DNA配列AGを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアデノシン核酸塩基エディターなどの塩基エディターは、正常なスプライシングを破壊する配列の変化を生成するために使用することができる。いくつかの実施形態では、アデノシン塩基エディターは、スプライスドナーのアンチセンス鎖上の相補的Aを破壊して、GT→GCの編集を引き起こす。いくつかの実施形態では、アデノシン塩基エディターは、センス鎖上のスプライスアクセプター部位のAを破壊し、AG→GGの編集を引き起こす。

【0157】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の方法及び組成物は、TTR遺伝子にコードされるトランスサイレチンタンパク質の発現及び/または機能を低減または消失させる。例えば、本明細書に開示の方法及び組成物は、トランスサイレチンの発現及び/または機能を、対照と比較して少なくとも2分の1、少なくとも3分の1、少なくとも4分の1、少なくとも5分の1、少なくとも6分の1、少なくとも7分の1、少なくとも8分の1、少なくとも9分の1、または少なくとも10分の1に低減させ得る。

【0158】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、状態の処置または予防を必要とする対象の状態を処置または予防するための方法は、(i)ガイドポリヌクレオチド、及び、(ii)塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸、を対象に投与することを含む。

【0159】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、状態の処置または予防を必要とする対象の状態を処置または予防する方法は、(i)ガイドポリヌクレオチドもしくはガイドポリヌクレオチドをコードする核酸、及び/または、(ii)プログラム可能なDNA結合ドメイン及びデアミナーゼまたはそれをコードする核酸を含む塩基エディター融合タンパク質、を封入する脂質ナノ粒子(LNP)を投与することを含む。いくつかの態様では、(i)ガイドポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸、及び、(ii)プログラム可能なDNA結合ドメイン及びデアミナーゼを含む塩基エディター融合タンパク質またはそれをコードする核酸は、同じLNPに封入される。いくつかの態様では、それらは、別個のLNPに封入される。

10

20

30

40

50

【0160】

医薬組成物

いくつかの態様では、本明細書に提供される塩基エディターシステム、及び薬学的に許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物が本明細書に提供される。いくつかの態様では、本明細書に記載のガイドRNA及び塩基エディター融合タンパク質または塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸配列、ならびに薬学的に許容される担体を含む遺伝子改変のための医薬組成物が本明細書で提供される。医薬組成物は、活性化合物の、薬学的に使用することができる調製物への処理を促進する、1つ以上の薬学的に許容可能な不活性成分を使用して、従来の方法で製剤化される。本開示での使用に適した製剤及び送達方法は、一般に、当該技術分野で周知である。好適な製剤は、選択された投与経路に依存している。本明細書に記載の医薬組成物の概要は、例えば、以下に見出すことができる：Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; 及び Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999)。

10

【0161】

医薬組成物は、他の化学構成成分（すなわち、薬学的に許容される成分）、例えば、担体、賦形剤、結合剤、充填剤、懸濁化剤、香料、甘味剤、崩壊剤、分散剤、界面活性剤、滑沢剤、着色剤、希釈剤、可溶化剤、湿潤剤、可塑剤、安定剤、浸透剤、湿潤剤、消泡剤、酸化防止剤、防腐剤、またはそれらの1つ以上の組み合わせのうちの1つ以上を伴う、本明細書に記載のガイドRNAまたはガイドRNAをコードする核酸配列と、塩基エディター融合タンパク質または塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸配列の混合物であり得る。医薬組成物は、それを必要とする生物または対象への投与を容易にする。

20

【0162】

本開示の医薬組成物は、当該技術分野で既知の任意の好適な方法を使用して対象に投与することができる。本明細書に記載の医薬組成物は、非経口、静脈内、皮内、筋肉内、結腸内、直腸内、または腹腔内を含む様々な方法で対象に投与することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、対象の腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射で投与することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、非経口、静脈内、筋肉内、または経口的に投与することができる。

30

【0163】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変のための医薬組成物は、さらなる治療薬を含む。追加の治療薬は、処置される疾患、障害、または症状の様々な態様を調節し、治療薬単独の投与よりも大きな全体的な利益を提供し得る。治療薬は、化学療法薬、放射線治療薬、ホルモン治療薬、及び/または免疫治療薬を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、治療薬は、放射線治療薬であってよい。いくつかの実施形態では、治療薬は、ホルモン治療薬であってよい。いくつかの実施形態では、治療薬は、免疫治療薬であってよい。いくつかの実施形態では、治療薬は、化学療法薬である。追加の治療薬の調製及び投与スケジュールは、製造業者の使用説明書に従って、または熟練した医師により経験的に決定されるように使用することができる。

40

【0164】

脂質ナノ粒子（LNP）組成物

本明細書に記載の遺伝子改変用の医薬組成物は、脂質ナノ粒子（LNP）中にカプセル化され得る。本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子（LNP）組成物」または「ナノ粒子組成物」は、1つ以上の記載の脂質を含む組成物である。本明細書で企図されるLNP組成物または製剤は、通常、マイクロメートルオーダー以下の大きさであり、脂質二重層を含んでもよい。ナノ粒子組成物は、脂質ナノ粒子（LNP）、リポソーム（例えば、脂質小

50

胞)、及びリポプレックスを含む。例えば、本明細書で企図されるナノ粒子組成物または製剤は、脂質二重層を有する直径500nm以下のリポソームであってよい。本明細書に記載のLNPは、約1nm～約2500nm、約10nm～約1500nm、約20nm～約1000nm、約30nm～約150nm、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約50nm～90nm、約55nm～85nm、約55nm～75nm、約50nm～約80nm、約60nm～約80nm、約70nm～約110nm、約70nm～約100nm、約80nm～約100nm、約90nm～約100nm、約70～約90nm、約80nm～約90nm、または約70nm～約80nmの平均直径を有し得る。本明細書に記載のLNPは、約30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm、150nm、またはそれ以上の平均直径を有し得る。一実施形態では、LNPの平均直径は、約70nm±20nm、70nm±10nm、70nm±5nmである。本明細書に記載のLNPは、実質的に無毒であり得る。

10

【0165】

脂質ナノ粒子(LNP)は、血管を通過して肝細胞に到達できる非ウイルス薬物送達機序を用いる[Am. J. Pathol. 2010, 176, 14-21]。アポリポタンパク質E(ApoE)タンパク質は、血流中で中性に近い電荷を有するLNP表面からのPEG脂質拡散後に、LNPに結合することが可能であり、それにより、低密度リポタンパク質受容体(LDLr)を発現する肝細胞に対する内因性リガンドとして機能する[Mol. Ther., 2010, 18, 1357-1364.]。LNPの効率的な肝臓送達の制御は、以下を含む: 1) 血清中のLNP表面からの効果的なPEG脂質脱落、及び、2) LNPへのApoEの結合。内因性ApoE媒介LDLr依存性LNP送達経路は、LDLr欠損患者集団においてLNPベースの肝臓遺伝子送達を達成するために利用できないか、または効果の低い経路である。

20

【0166】

細胞への効率的な送達は、特異的な標的化と、細胞外環境、特に、血清タンパク質からの実質的な保護を必要とする。特異的標的化を達成する1つの方法は、標的化部分を活性薬または核酸薬などの医薬エフェクターにコンジュゲートし、それにより、標的化部分の特異性に応じて活性薬または医薬エフェクターを特定の細胞または組織に向けることである。標的化部分が送達を改善し得る1つの方法は、受容体媒介エンドサイトーシス活性によるものである。この取り込み機序は、膜構造の陥入を介して、または送達システムの細胞膜との融合により、膜に包まれる領域の内部への膜受容体に結合している核酸物質の移動を含む。このプロセスは、特定のリガンドが受容体に結合した後の細胞表面または膜受容体の活性化を介して開始される。受容体媒介エンドサイトーシス系は、糖、例えば、ガラクトース、マンノース、マンノース-6-リン酸、ペプチド及びタンパク質、例えば、トランスフェリン、アシアロ糖タンパク質、ビタミンB12、インスリン、及び上皮成長因子(EGF)を認識するものを含む。コレステロールまたは脂肪酸などの親油性部分は、核酸などの親水性の高い分子に結合すると、血漿タンパク質の結合を大幅に高め、従って、循環半減期を延長させ得る。親油性コンジュゲートは、標的化送達アプローチの細胞内輸送を改善するために、標的化リガンドと組み合わせて使用することもできる。

30

【0167】

アシアロ糖タンパク質受容体(ASGP-R)は、肝細胞に豊富に存在する大容量受容体である。ASGP-Rは、N-アセチル-D-ガラクトシルアミン(GalNAc)に対して、D-Galより50倍高い親和性を示す。受容体標的化コンジュゲートを含むLNPは、本明細書に記載の薬剤物質の標的送達を促進するために使用され得る。LNPは、比較的低い～比較的高い表面密度の範囲の特定のまたは操作された表面密度で、粒子の表面または周囲に1つ以上の受容体標的化部分を含んでもよい。受容体標的化コンジュゲートは、標的化部分(またはリガンド)、リンカー、及び標的化部分に結合している親油性部分を含んでもよい。いくつかの実施形態では、受容体標的化部分(またはリガンド)は、レクチン受容体を標的とする。いくつかの実施形態では、レクチン受容体は、アシアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)である。いくつかの実施形態では、受容体標的化部分は、ASGPRを標的とするGalN

40

50

Acまたは誘導体GalNAcである。一態様では、受容体標的化コンジュゲートは、1つのGalNAc部分またはその誘導体を含む。別の態様では、受容体標的化コンジュゲートは、2つの異なるGalNAc部分またはその誘導体を含む。別の態様では、受容体標的化コンジュゲートは、3つの異なるGalNAc部分またはその誘導体を含む。別の態様では、受容体標的化コンジュゲートは、親油性である。いくつかの実施形態では、受容体標的化コンジュゲートは、1つ以上のGalNAc部分及び1つ以上の脂質部分、すなわち、GalNAc-脂質を含む。いくつかの実施形態では、受容体標的化コンジュゲートは、GalNAc-脂質である。

【0168】

本明細書では、(i)アミノ脂質、リン脂質、PEG脂質、コレステロール、もしくはその誘導体、ペイロード、またはそれらの任意の組み合わせを含むLNP組成物、及び、(ii)アミノ脂質、リン脂質、PEG脂質、コレステロール、GalNAc-脂質もしくはその誘導体、ペイロード、またはそれらの任意の組み合わせを含むLNP組成物が、記載される。各構成成分は、以下で詳細に記載される。

【0169】

賦形剤アミノ脂質、リン脂質、PEG脂質、及びコレステロールを含むLNP組成物の調製では、所望のモル比の4つの賦形剤を、水混和性有機溶媒、例えば、エタノールに溶解させる。次に、均一な脂質溶液は、核酸ペイロードを含有する酸性pH4~6.5の範囲の水性緩衝液とインラインで迅速に混合して、核酸ペイロード（複数可）をカプセル化する脂質ナノ粒子(LNP)を形成する。迅速なインライン混合の後、このようにして形成されたLNPは、濃縮及び緩衝液交換を含むさらなる下流処理を受けて、評価用の細胞株または動物疾患モデルに投与するため、またはヒト対象に投与するための、中性に近いpHを有する最終LNP医薬組成物を得る。

【0170】

GalNAc-LNP医薬組成物の調製では、GalNAc-脂質は、GalNAc-LNPの調製前に、水混和性有機溶媒中で4つの脂質賦形剤と混合する。次に、GalNAc-LNP医薬組成物の調製は、LNP医薬組成物について記載したのと同じステップに従う。GalNAc-LNP調製物中のGalNAc-脂質のモル%は、全賦形剤の0.001~2.0の範囲である。

【0171】

LNP及びGalNAc-LNPの両方の調製では、ペイロードは、TTR遺伝子を標的とするガイドRNA及び塩基エディタータンパク質をコードするmRNAを含む。いくつかの実施形態では、酸性水性緩衝液中及び最終製剤中のガイドRNA対mRNAの重量比は、6:1、5:1、4:1、3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1:1、1:1.5、1:2、1:2.5、1:3、1:5、または1:6である。いくつかの実施形態では、該mRNAは、アデノシン塩基エディタータンパク質をコードする。いくつかの他の実施形態では、該mRNAは、シトシンまたはシチジン塩基エディタータンパク質をコードする。

【0172】

いくつかの実施形態では、LNP組成物は、以下に記載されるように調製され得る：Kallanthottathil G. Rajeevを発明者として、Verve Therapeutics, Inc.を出願人として指名する、米国仮特許出願第62/984,866号(2020年3月4日出願)及び同第63/078,982号(2020年9月16日出願)の利益を主張する、「COMPOSITIONS AND METHODS FOR TARGETED RNA DELIVERY」と題する米国特許出願第17/192,709号(2021年3月4日出願)（この出願は、全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0173】

アミノ脂質

式(I)

いくつかの実施形態では、LNP組成物は、アミノ脂質を含む。一態様では、式(I)の構造を有するアミノ脂質、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が本明細書に開示される：

10

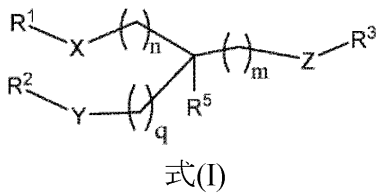
20

30

40

50

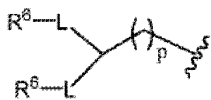
【化 1】



(式中、

R^1 及び R^2 のそれぞれは、独立して、 C_3-C_{22} アルキル、 C_3-C_{22} アルケニル、 C_3-C_8 シクロアルキル、 $-C_2-C_{10}$ アルキレン-L- R^6 、または

【化 2】



であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、及びシクロアルキルのそれぞれは、独立して、置換または非置換であり、

X、Y、及びZのそれぞれは、独立して、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-O$ 、S、または結合であり、

Lのそれぞれは、独立して、 $-C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=O)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4-$ 、 $-C(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4-$ 、 $-NR^4C(=S)NR^4-$ 、 $-C(=O)S-$ 、 $SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4-$ 、O、S、 $-C_1-C_{10}$ アルキレン-O-、 $-C_1-C_{10}$ アルキレン-C(=O)O-、 $-C_1-C_{10}$ アルキレン-OC(=O)-、または結合であり、アルキレンは、置換または非置換であり、

R^3 は、 $-C_0-C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 、 $-C_0-C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキル、または $-C_0-C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアリールであり、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、及びヘテロシクロアリールは、独立して、置換または非置換であり； R^4 のそれぞれは、独立して、水素、または置換もしくは非置換 C_1-C_6 アルキルであり、

R^5 は、水素、または置換もしくは非置換 C_1-C_6 アルキルであり、

R^6 のそれぞれは、独立して、置換もしくは非置換 C_3-C_{22} アルキル、または置換もしくは非置換 C_3-C_{22} アルケニルであり、

R^7 及び R^8 のそれぞれは、独立して、水素、または置換もしくは非置換 C_1-C_6 アルキルであるか、あるいは、 R^7 及び R^8 は、それらが結合している窒素と一緒に置換もしくは非置換 C_2-C_6 ヘテロシクリルを形成し、

p は、1～10の整数であり、

n、m、及びqのそれぞれは、独立して、0、1、2、3、4、または5である。

【0174】

式(I)のいくつかの実施形態では、構造が2つ以上の不斉C原子を有する場合、各不斉C原子は、独立して、ラセミ異性体、キラル的に純粋なR及び/またはキラル的に純粋なS異

性体、あるいはそれらの組み合わせを表す。

【0175】

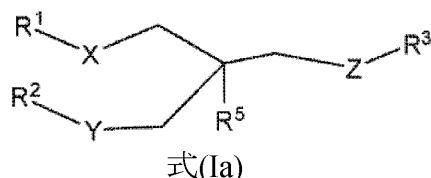
いくつかの実施形態では、式(1)の n 、 i 、 n 、及び q のそれぞれは、独立して、0、1、2、または3である。いくつかの実施形態では、式(1)の n 、 m 、及び q のそれぞれは、1である。

【0176】

式(1a)

いくつかの実施形態では、式(1)の化合物は、式(1a)の構造、またはその薬学的に許容される塩もしくは薬学的に許容される溶媒和物を有する：

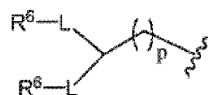
【化3】



(式中、

R^1 及び R^2 のそれぞれは、独立して、 C_3 - C_{22} アルキル、 C_3 - C_{22} アルケニル、 C_3 - C_8 シクロアルキル、 $-C_2$ - C_{10} アルキレン-L- R^6 、または

【化4】



であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、及びシクロアルキルのそれぞれは、独立して、置換または非置換であり、

X、Y、及びZのそれぞれは、独立して、 $C(=O)NR^4$ -、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4$ -、 $-NR^4C(=O)NR^4$ -、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4$ -、 $-C(=S)NR^4$ -、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(E)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4$ -、 $-NR^4C(=S)NR^4$ -、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4$ -、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4$ -、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4$ -、O、S、 $-C_1$ - C_{10} アルキレン-O-、または結合であり、アルキレンは、置換または非置換であり、

Lのそれぞれは、独立して、 $-C(=O)NR^4$ -、 $-NR^4C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4$ -、 $-NR^4C(=O)NR^4$ -、 $-NR^4C(=NR^4)NR^4$ -、 $-C(=S)NR^4$ -、 $-NR^4C(=S)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=S)-$ 、 $OC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)O-$ 、 $-OC(=S)NR^4$ -、 $-NR^4C(=S)NR^4$ -、 $-C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)-$ 、 $-OC(=O)S-$ 、 $-NR^4C(=O)S-$ 、 $-SC(=O)NR^4$ -、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=S)O-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4$ -、 $-C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)-$ 、 $-SC(=O)S-$ 、 $-SC(=S)S-$ 、 $-NR^4C(=S)S-$ 、 $-SC(=S)NR^4$ -、O、S、 $-C_1$ - C_{10} アルキレン-O-、 $-C_1$ - C_{10} アルキレン- $C(=O)O-$ 、 $-C_1$ - C_{10} アルキレン-O- $C(=O)-$ 、または結合であり、アルキレンは、置換または非置換であり、

R^3 は、 $-C_0$ - C_{10} アルキレン- NR^7R^8 、 $-C_0$ - C_{10} アルキレン-ヘテロシクロアルキル、または $-C_0$ - C_{10} アルキレン-ヘテロシクロイルであり、アルキレン、ヘテロシクロアルキル、及びヘテロシクロアリアルは、独立して、置換または非置換であり、

R^4 のそれぞれは、独立して、水素、または置換もしくは非置換の C_1 - C_6 アルキルであり、

R^5 は、水素、または置換もしくは非置換 C_1-C_6 アルキルであり、

R^6 のそれぞれは、独立して、置換もしくは非置換 C_3-C_{22} アルキル、または置換もしくは非置換 C_3-C_{22} アルケニルであり、

R^7 及び R^8 のそれぞれは、独立して、水素、または置換もしくは非置換 C_1-C_6 アルキルであるか、あるいは、 R^7 及び R^8 は、それらが結合している窒素と一緒に置換もしくは非置換 C_2-C_6 ヘテロシクリルを形成し、

p は、1～10の整数である）。

【0177】

式(1a)のいくつかの実施形態では、構造が2つ以上の不斉C原子を有する場合、各不斉C原子は独立して、ラセミ異性体、キラル的に純粋なR異性体及び/またはキラル的に純粋なS異性体、あるいはそれらの組み合わせを表す。

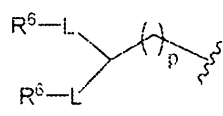
10

【0178】

式(1)及び(1a)の変形形態

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)の R^1 及び R^2 は、独立して、 C_3-C_{22} アルキル、 C_3-C_{22} アルケニル、 $-C_2-C_{10}$ アルキレン-L- R^6 、または

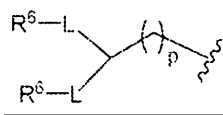
【化5】



20

であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、及びシクロアルキルのそれぞれは、独立して、置換または非置換である。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)の R^1 及び R^2 は、独立して、 $C_{10}-C_{20}$ アルキル、 $C_{10}-C_{20}$ アルケニル、 $-C_8-C_7$ アルキレン-L- R^6 、または

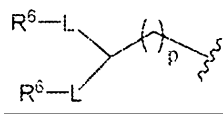
【化6】



30

であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、及びシクロアルキルのそれぞれは、独立して、置換または非置換である。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)の R^1 は、

【化7】



40

である。

【0179】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のLのそれぞれは、独立して、O、S、 $-C_1-C_{10}$ アルキレン-O-、 $-C_1-C_{10}$ アルキレン-C(=O)O-、 $-C_1-C_{10}$ アルキレン-OC(=O)-、または結合であり、アルキレンは、置換または非置換である。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のLのそれぞれは、独立して、O、S、 $-C_1-C_3$ アルキレン-O-、 $-C_1-C_3$ アルキレン-C(=O)O-、 $-C_1-C_3$ アルキレン-OC(=O)-、または結合であり、アルキレンは、置換または非置換である。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のLのそれぞれは、独立して、O、S、 $-C_1-C_3$ アルキレン-O-、 $-C_1-C_3$ アルキレン-C(=O)O-、 $-C_1-C_3$ アルキレン-OC(=O)-、または結合であり、アルキレンは、直鎖または分枝鎖の非置換アルキレンである。

50

【0180】

いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^6 のそれぞれは、独立して、置換もしくは非置換の直鎖状 C_3-C_{22} アルキル、または置換もしくは非置換の直鎖状 C_3-C_{22} アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^6 のそれぞれは、独立して、置換もしくは非置換の C_3-C_{20} アルキル、または置換もしくは非置換の C_3-C_{20} アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^6 のそれぞれは、独立して、置換もしくは非置換の C_3-C_{10} アルキル、または置換もしくは非置換の C_3-C_{10} アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^6 のそれぞれは、独立して、置換または非置換 C_3-C_{10} アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^6 のそれぞれは、独立して、置換または非置換の直鎖 C_3-C_{10} アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^6 のそれぞれは、独立して、置換または非置換の n -ペンチル、 n -ヘキシル、 n -ヘプチル、 n -オクチル、 n -ノニル、 n -デシル、 n -ウンデシル、または n -ドデシルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^6 のそれぞれは、独立して、置換または非置換の n -オクチルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^6 のそれぞれは、 n -オクチルである。

10

【0181】

いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の L のそれぞれは、独立して、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C_1-C_{10}$ アルキレン- $O-$ 、または O である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の L のそれぞれは、 O である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の L のそれぞれは、 $-C_1-C_3$ アルキレン- $O-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の p は、1、2、3、4、または5である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の p は、2である。

20

【0182】

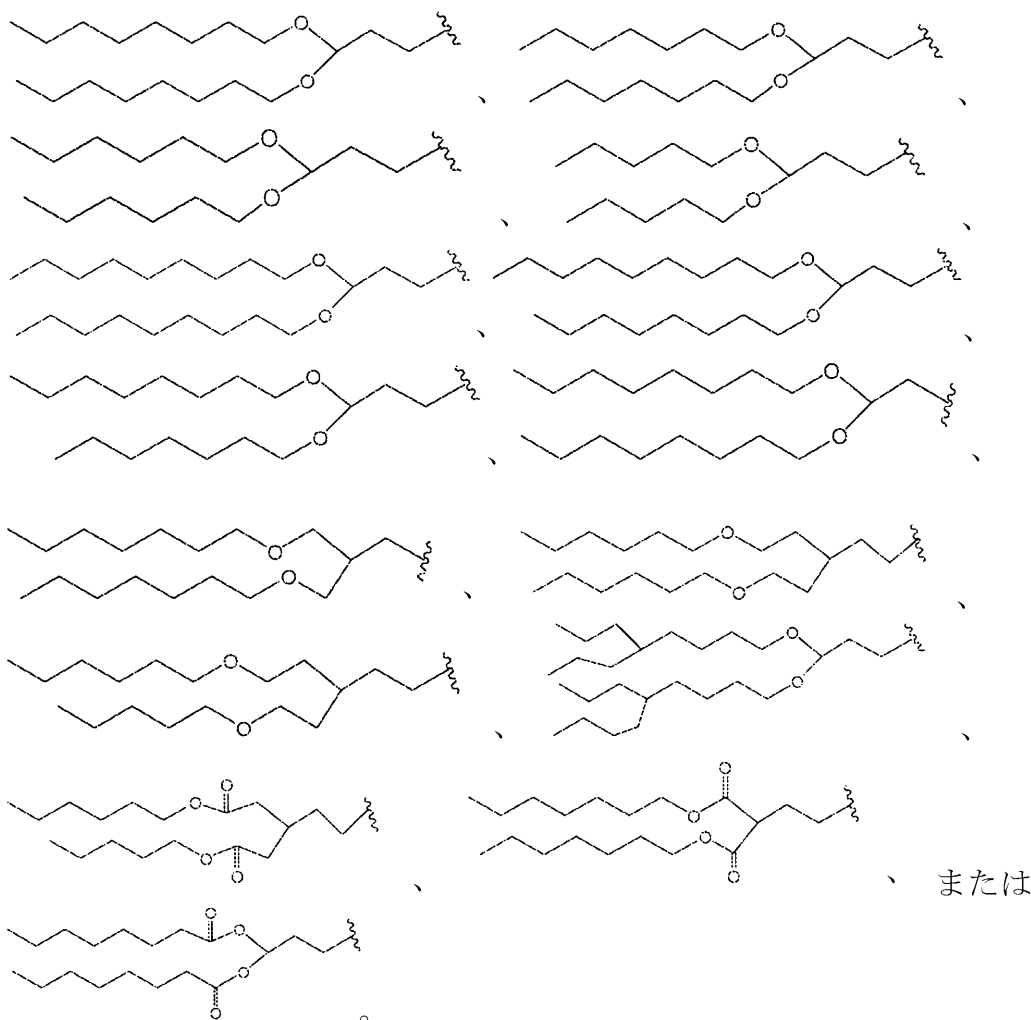
いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^1 は、以下である：

30

40

50

【化 8】



【0183】

いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^1 は、 R^2 である。

【0184】

いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 のそれぞれは、独立して、H、または置換もしくは非置換 C_1 - C_4 アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 のそれぞれは、独立して、置換または非置換の直鎖状 C_1 - C_4 アルキルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 のそれぞれは、Hである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 のそれぞれは、独立して、H、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、または $-CH(CH_3)_2$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 のそれぞれは、独立して、Hまたは $-CH_3$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^4 のそれぞれは、 $-CH_3$ である。

40

【0185】

いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のXは、 $-C(=O)O-$ または $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のXは、 $-C(=O)NR^4-$ または $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のXは、 $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、または $-NHC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のXは、 $-C(=O))NH-$ 、 $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-OC(=O))-$ 、 $-NHC(=O)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O))-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)O-$ 、 $-OC(=O))NH-$ 、 $-OC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-NHC(=O)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=O))NH-$ 、 $-NHC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)N(CH_3)-$ 、 $NHC(=NH)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=NH)NH-$ 、 $-NHC(=NH)N$

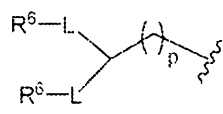
50

(CH₃)-、-N(CH₃)C(=NH)N(CH₃)-、NHC(=NMe)NH-、-N(CH₃)C(=NMe)NH-、-NHC(=NMe)N(CH₃)-、または-N(CH₃)C(=NMe)N(CH₃)-である。

【0186】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のR²は、C₃-C₂₂アルキル、C₃-C₂₂アルケニル、-C₂-C₁₀アルキレン-L-R⁶、または

【化9】



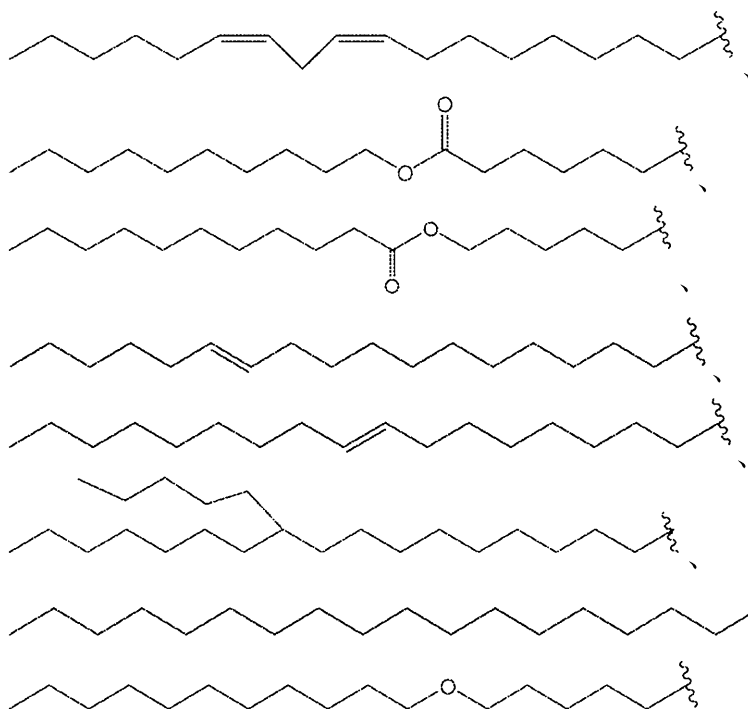
10

であり、アルキル、アルキレン、アルケニル、及びシクロアルキルのそれぞれは、独立して、置換または非置換である。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のR²は、置換もしくは非置換C₇-C₂₂アルキル、または置換もしくは非置換C₃-C₂₂アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のR²は、置換もしくは非置換の直鎖状C₇-C₂₂アルキル、または置換もしくは非置換の直鎖状C₃-C₂₂アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のR²は、置換もしくは非置換C₁₀-C₂₀アルキル、または置換もしくは非置換C₁₀-C₂₀アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のR²は、非置換C₁₀-C₂₀アルキルである。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のR²は、非置換C₁₀-C₂₀アルケニルである。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のR²は、-C₂-C₁₀アルキレン-L-R⁶である。いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のR²は、-C₂-C₁₀アルキレン-C(=O)O-R⁶または-C₂-C₁₀アルキレン-OC(=O)-R⁶である。

20

【0187】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のR²は、
【化10】



30

40

である。

【0188】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のR¹は、R¹である。

50

【0189】

いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のYは、 $-C(=O)O-$ または $-OC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のYは、 $-C(=O)NR^4-$ または $-NR^4C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のYは、 $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、または $-NHC(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のYは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、または $-NR^4C(=O)NR^4-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のYは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、または $-NHC(=O)NH-$ である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)のYは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、または $-NHC(=O)NH-$ である。

10

【0190】

いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_0-C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 または $-C_0-C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、アルキレン及びヘテロシクロアルキルは、独立して、置換または非置換である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_0-C_{10}$ アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_1-C_6$ アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_1-C_4$ アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_1$ -アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_2$ -アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_3$ -アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_4$ -アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_5$ -アルキレン- NR^7R^8 である。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_0-C_{10}$ アルキレン-ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_1-C_6$ アルキレン-ヘテロシクロアルキルであり、ヘテロシクロアルキルは、1~3個の窒素及び0~2個の酸素を含む。いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、 $-C_1-C_6$ アルキレン-ヘテロシクロアリールである。

20

【0191】

いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^7 及び R^8 のそれぞれは、独立して、水素、または置換もしくは非置換 C_1-C_6 アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 のそれぞれは、独立して、水素、または置換もしくは非置換 C_1-C_3 アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 のそれぞれは、独立して、置換または非置換 C_1-C_3 アルキルである。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 のそれぞれは、独立して、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、または $-CH(CH_3)_2$ である。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 のそれぞれは、 CH_3 である。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 のそれぞれは、 $-CH_2CH_3$ である。

30

【0192】

いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^7 及び R^8 は、それらが結合している窒素と一緒に、置換または非置換 C_2-C_6 ヘテロシクロリルを形成する。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 は、それらが結合している窒素と一緒に、置換または非置換 C_2-C_6 ヘテロシクロアルキルを形成する。いくつかの実施形態では、 R^7 及び R^8 は、それらが結合している窒素と一緒に、置換または非置換の3~7員ヘテロシクロアルキルを形成する。

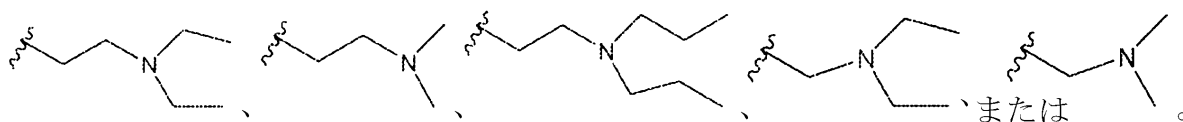
40

【0193】

いくつかの実施形態では、式(I)及び式(Ia)の R^3 は、以下である：

50

【化 1 1】

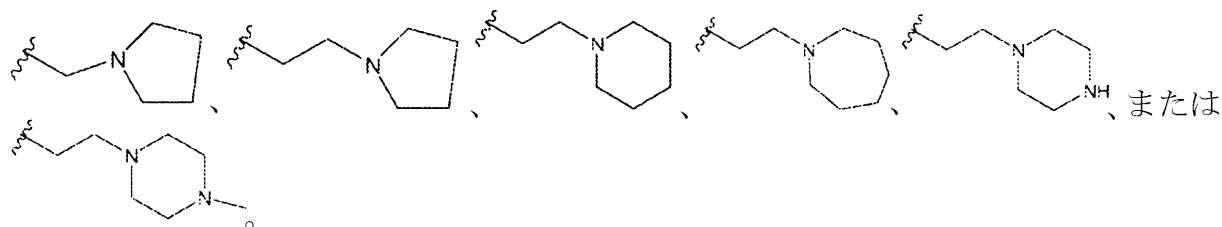


【0 1 9 4】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)の R^3 は、以下である：

【化 1 2】

10

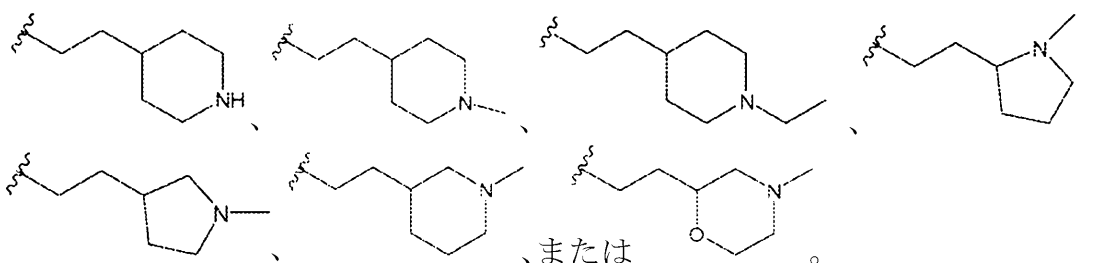


いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)の R^3 は、以下である：

20

【0 1 9 5】

【化 1 3】



30

【0 1 9 6】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のZは、 $-C(=O)O-$ または $-OC(=O)-$ である。

【0 1 9 7】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のZは、 $-C(=O)NR^4-$ または $-NR^4C(=O)-$ である。

【0 1 9 8】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のZは、 $-C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、または $-NHC(=O)-$ である。

40

【0 1 9 9】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のZは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR^4C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^4-$ 、または $-NR^4C(=O)NR^4-$ である。

【0 2 0 0】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のZは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ 、 $-NHC(=O)NH-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)N(CH_3)-$ 、 $-N(CH_3)C(=O)N(CH_3)-$ 、 $-NHC(=O)N(CH_3)-$ 、または $-N(CH_3)C(=O)NH-$ である。

【0 2 0 1】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)のYは、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC$

50

(=O)NH-、または-NHC(=O)NH-である。

【0202】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)の R^5 は、水素、または置換もしくは非置換 C_1-C_3 アルキルである。

【0203】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)の R^5 は、H、-CH₃、-CH(CH₃)CH₃、-CH₂CH₂CH₃、または-CH(CH₃)₂である。

【0204】

いくつかの実施形態では、式(1)及び式(1a)の R^5 は、Hである。

【0205】

異なるアミノ脂質を含むLNP組成物

いくつかの実施形態では、LNPは、異なる式を有する複数のアミノ脂質を含む。例えば、LNP組成物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のアミノ脂質を含み得る。別の例では、LNP組成物は、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも9、少なくとも10、または少なくとも20のアミノ脂質を含み得る。さらに別の例では、LNP組成物は、最大2、最大3、最大4、最大5、最大6、最大7、最大9、最大10、最大20、または最大30のアミノ脂質を含み得る。

【0206】

いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第1のアミノ脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第1のアミノ脂質及び第2のアミノ脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第1のアミノ脂質、第2のアミノ脂質、及び第3のアミノ脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第1のアミノ脂質、第2のアミノ脂質、第3のアミノ脂質、及び第4のアミノ脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第4のアミノ脂質を含まない。いくつかの実施形態では、LNP組成物は、第3のアミノ脂質を含まない。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質対第2のアミノ脂質のモル比は、約0.1～約10である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質対第2のアミノ脂質のモル比は、約0.20～約5である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質対第2のアミノ脂質のモル比は、約0.25～約4である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質対第2のアミノ脂質のモル比は、約0.25、約0.33、約0.5、約1、約2、約3、または約4である。

【0207】

いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約4：1：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約1：1：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約2：1：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約2：2：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約3：2：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約3：1：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約5：1：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約3：3：1である。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質：第2のアミノ脂質：第3のアミノ脂質のモル比は、約4：4：1である。

【0208】

追加のアミノ脂質の実施形態

いくつかの実施形態では、LNP組成物は、1つ以上のアミノ脂質を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のアミノ脂質は、粒子中に存在する総脂質の約40モル%～約65モル%を占める。いくつかの実施形態では、1つ以上のアミノ脂質は、粒子中に存在する総脂質の約40モル%、約41モル%、約42モル%、約43モル%、約44モル%、約45モル%、

10

20

30

40

50

約46モル%、約47モル%、約48モル%、約49モル%、約50モル%、約51モル%、約52モル%、約53モル%、約54モル%、約55モル%、約56モル%、約57モル%、約58モル%、約59モル%、約60モル%、約61モル%、約62モル%、約63モル%、約64モル%、または約65モル%を含む。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質は、粒子中に存在する総アミノ脂質の約1モル%～約99モル%を占める。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質は、粒子中に存在する総アミノ脂質の約16.7モル%～約66.7モル%を占める。いくつかの実施形態では、第1のアミノ脂質は、粒子中に存在する総アミノ脂質の約20モル%～約60モル%を占める。

【0209】

いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、イオン化可能な脂質である。イオン化可能な脂質は、1つ以上のイオン化可能な窒素原子を含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のイオン化可能な窒素原子のうちの少なくとも1つは、正荷電である。いくつかの実施形態では、LNP組成物中のイオン化可能な窒素原子の少なくとも10モル%、20モル%、30モル%、40モル%、50モル%、60モル%、70モル%、80モル%、90モル%、95モル%、または99モル%は、正荷電である。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、1級アミン、2級アミン、3級アミン、イミン、アミド、グアニジン部分、ヒスチジン残基、リジン残基、アルギニン残基、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、1級アミン、2級アミン、3級アミン、グアニジン部分、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、3級アミンを含む。

【0210】

いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、カチオン性脂質である。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、イオン化可能な脂質である。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、1つ以上の窒素原子を含む。いくつかの実施形態では、アミノ脂質は、1つ以上のイオン化可能な窒素原子を含む。例示的なカチオン性及び/またはイオン化可能脂質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：3-(ジドデシルアミノ)-N1,N1,4-トリドデシル-1-ピペラジンエタンアミン(KL10)、N142-(ジドデシルアミノ)エチル]-N1,N4,N4-トリドデシル-1,4-ピペラジンジエタンアミン(KL22)、14,25-ジトリドデシル-15,18,21,24-テトラアザ-オクタトリアコンタン(KL25)、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLin-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-DMA)、ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノアート(DLin-MC 3-DMA)、2,2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DODMA)、2-({8- [(3 β)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N,N-ジメチル-3- [(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン(オクチル-CLinDMA)、(2R)-2-({8- [(3 β)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N,N-ジメチル-3- [(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン(オクチル-CLinDMA(2R))、及び(2S)-2-({8- [(3 β)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N,N-ジメチル-3- [(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン(オクチル-CLinDMA(2S))。

【0211】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアミノ脂質は、薬学的に許容される塩などの塩の形態をとることができる。アミノ脂質の薬学的に許容される塩は全て、本開示に含まれる。本明細書で使用される場合、「アミノ脂質」という用語は、その薬学的に許容される塩、ならびに、そのジアステレオマー、エナンチオマー、及びエピマー形態も含む。

【0212】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアミノ脂質は、1つ以上の立体中心を有し、各立体中心は、R立体配置またはS立体配置のいずれかで独立して存在する。本明細書

に提示される脂質は、全てのジアステレオマー、エナンチオマー、及びエピマー形態、ならびに、それらの適切な混合物を含む。本明細書で提供される脂質は、全ての *cis*、*trans*、*syn*、*anti*、*entgegen* (E)、及び *zusammen* (Z) 異性体、ならびに、それらの適切な混合物を含む。特定の実施形態では、本明細書に記載の脂質は、化合物のラセミ混合物を光学活性分割剤と反応させて一対のジアステレオ異性体化合物/塩を形成し、ジアステレオマーを分離し、光学的に純粋なエナンチオマーを回収することにより、それらの個々の立体異性体として調製される。いくつかの実施形態では、エナンチオマーの分割は、本明細書に記載の化合物の共有結合ジアステレオマー誘導体を使用して行われる。別の実施形態では、ジアステレオマーは、溶解度の違いに基づく分離/分割手法で分離される。他の実施形態では、立体異性体の分離は、クロマトグラフィーで、またはジアステレオマー塩の形成及び再結晶による分離で、またはクロマトグラフィー、またはそれらの任意の組み合わせによる分離で実施される。Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981。一態様では、立体異性体は、立体選択的合成で得られる。

10

【0213】

いくつかの実施形態では、アミノ脂質などの脂質は、本明細書に開示の構造に基づいて置換されている。いくつかの実施形態では、アミノ脂質などの脂質は、置換されていない。別の実施形態では、本明細書に記載の脂質は、同位体的に（例えば、放射性同位体で）、あるいは、限定されないが、発色団もしくは蛍光部分、生物発光標識、または化学発光標識の使用を含む別の他の手段で標識される。

20

【0214】

本明細書に記載の脂質は、本明細書に提示される様々な式及び構造で列挙されるものと同一である同位体標識化合物を含むが、1つ以上の原子は、自然界に通常見られる原子質量または質量数とは異なる原子質量または質量数を有する原子で置換されているという点を除く。本発明の脂質に組み込むことができる同位体の例としては、水素、炭素、窒素、酸素、硫黄、フッ素、及び塩素の同位体、例えば、 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl が挙げられる。一態様では、本明細書に記載の同位体標識脂質、例えば、 ^3H 及び ^{14}C などの放射性同位体が組み込まれた脂質は、薬物及び/または基質組織分布アッセイにおいて有用である。一態様では、重水素などの同位体による置換は、例えば、*in vivo* 半減期の増加または必要用量の低減などの、代謝安定性の向上に起因する特定の治療上の利点をもたらす。

30

【0215】

いくつかの実施形態では、アミノ脂質の不斉炭素原子は、鏡像異性的に富化された形態で存在する。特定の実施形態では、アミノ脂質の不斉炭素原子は、(S) 立体配置または (R) 立体配置の少なくとも50%のエナンチオマー過剰率、少なくとも60%のエナンチオマー過剰、少なくとも70%のエナンチオマー過剰、少なくとも80%のエナンチオマー過剰、少なくとも90%のエナンチオマー過剰、少なくとも95%のエナンチオマー過剰、または少なくとも99%のエナンチオマー過剰率を有する。

【0216】

いくつかの実施形態では、開示されたアミノ脂質は、N-オキシドに変換することができる。いくつかの実施形態では、N-オキシドは、酸化剤（例えば、3-クロロペルオキシ安息香酸及び/または過酸化水素）での処理で形成される。従って、原子価及び構造的に許容される場合、NOまたは N^+-O^- と表記することができる、記載のアミノ脂質のN-オキシド化合物が本明細書に開示されている。いくつかの実施形態では、本開示の化合物中の窒素は、N-ヒドロキシまたはN-アルコキシに変換することができる。例えば、N-ヒドロキシ化合物は、*rac*-CPBAなどの酸化剤による親アミンの酸化で調製することができる。示されている全ての窒素含有化合物も考慮される。従って、記載のアミノ脂質のN-ヒドロキシ及びN-アルコキシ（例えば、N-OR（式中、Rは、置換または非置換の C_1 - C_6 アルキル、 C_1 - C_6 アルケニル、 C_1 - C_6 アルキニル、3~14員炭素環、または3~14員複素環である））誘導体も本明細書に開示されている。

40

50

【0217】

いくつかの実施形態では、1つ以上のアミノ脂質は、粒子中に存在する総脂質の約40モル%～約65モル%を占める。

【0218】

PEG脂質

いくつかの実施形態では、記載のLNP組成物は、1つ以上のPEG脂質を含む。本明細書で使用される場合、「PEG脂質」または「PEG-脂質」は、ポリエチレングリコール構成成分を含む脂質を指す。好適なPEG脂質の例としては、PEG修飾ホスファチジルエタノールアミン、PEG修飾ホスファチジン酸、PEG修飾セラミド、PEG修飾ジアルキルアミン、PEG修飾ジアシルグリセロール、PEG修飾ジアルキルグリセロール、及びそれらの混合物も挙げられるが、これらに限定されない。例えば、1つ以上のPEG脂質は、PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC、PEG-DSPE脂質、またはそれらの組み合わせを含み得る。

10

【0219】

いくつかの実施形態では、PEG脂質は、粒子中に存在する総脂質の約0.1モル%～約10モル%を占める。

【0220】

リン脂質

いくつかの実施形態では、記載のLNP組成物は、1つ以上のリン脂質を含む。

【0221】

いくつかの実施形態では、リン脂質は、粒子中に存在する総脂質の約5モル%～約15モル%を占める。

20

【0222】

コレステロール

いくつかの実施形態では、LNP組成物は、コレステロールまたはその誘導体を含む。

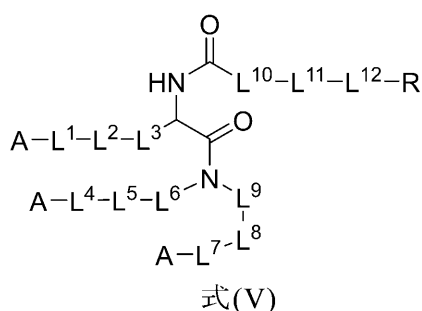
【0223】

GalNAc脂質

いくつかの実施形態では、LNP組成物は、式(V)の化合物を含む受容体標的化コンジュゲートを含む：

【化14】

30



40

(式中、

複数のA基は、集合的に受容体標的化リガンドを含み、

各L¹、L²、L³、L⁴、L⁵、L⁶、L⁷、L⁸、L⁹、L¹⁰、及びL¹²は、独立して、置換または非置換C₁-C₁₂アルキレン、置換または非置換C₁-C₁₂ヘテロアルキレン、置換または非置換C₂-C₁₂アルケニレン、置換または非置換C₂-C₁₂アルキニレン、-(CH₂CH₂O)_m-、-(OCH₂CH₂)_m-、-O-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、-S(=O)(=NR¹)-、-C(=O)-、-C(=N-OR¹)-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-C(=O)C(=O)-、-C(=O)NR¹-、-NR¹C(=O)-、-OC(=O)NR¹-、-NR¹C(=O)O-、-NR¹C(=O)NR¹-、-C(=O)NR¹C(=O)-、-S(=O)₂NR¹-、-NR¹S(=O)₂-、-NR¹-、または-N(OR¹)-であり、

L¹¹は、置換もしくは非置換-(CH₂CH₂O)_n-、置換もしくは非置換-(OCH₂CH₂)_n-、

50

または置換もしくは非置換- $(CH_2)_n$ -であり、

各 R^1 は、独立して、H、または置換もしくは非置換 C_1 - C_6 アルキルであり、

Rは、脂質、核酸、アミノ酸、タンパク質、または脂質ナノ粒子であり、

mは、1~10から選択される整数であり、

nは、1~200から選択される整数である)。

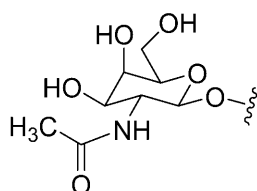
【0224】

いくつかの実施形態では、各 L^1 、 L^4 、及び L^7 は、独立して、置換または非置換 C_1 - C_{12} アルキレンである。いくつかの実施形態では、各 L^1 、 L^4 、及び L^7 は、独立して、置換または非置換 C_2 - C_6 アルキレンである。いくつかの実施形態では、各 L^1 、 L^4 、及び L^7 は、 C_4 アルキレンである。いくつかの実施形態では、各 L^2 、 L^5 、及び L^8 は、独立して、 $-C(=O)NR^1-$ 、 $-NR^1C(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^1-$ 、 $-NR^1C(=O)O-$ 、 $-NR^1C(=O)NR^1-$ 、または $-C(=O)NR^1C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、各 L^2 、 L^5 、及び L^8 は、独立して、 $-C(=O)NR^1-$ または $-NR^1C(=O)-$ である。いくつかの実施形態では、各 L^2 、 L^5 、及び L^8 は、 $-C(=O)NH-$ である。いくつかの実施形態では、各 L^3 、 L^6 、及び L^9 は、独立して、置換または非置換 C_1 - C_{12} アルキレンである。いくつかの実施形態では、各 L^3 は、置換または非置換 C_2 - C_6 アルキレンである。いくつかの実施形態では、 L^3 は、 C_4 アルキレンである。いくつかの実施形態では、各 L^6 及び L^9 は、独立して、置換または非置換 C_2 - C_{10} アルキレンである。いくつかの実施形態では、各 L^6 及び L^9 は、独立して、置換または非置換 C_2 - C_6 アルキレンである。いくつかの実施形態では、各 L^6 及び L^9 は、 C_3 アルキレンである。いくつかの実施形態では、Aは、レクチンに結合する。いくつかの実施形態では、レクチンは、アシアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)である。いくつかの実施形態では、Aは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)または

10

20

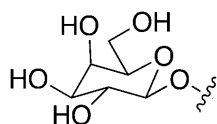
【化15】



30

またはその誘導体である。Aは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)

【化16】



またはその誘導体である。

【0225】

いくつかの実施形態では、受容体標的化コンジュゲートは、ナノ粒子組成物中に存在する総脂質含有量の約0.001モル%~約20モル%を占める。

【0226】

リン酸塩電荷中和剤

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のLNPは、リン酸塩電荷中和剤を含む。いくつかの実施形態では、リン酸塩電荷中和剤は、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、リジン、ヒスチジン、カチオン性デンドリマー、ポリアミン、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、リン酸塩電荷中和剤は、1つ以上の窒素原子を含む。いくつかの実施形態では、リン酸塩電荷中和剤は、ポリアミンを含む。

【0227】

40

50

以下に示されるLNP配合物に使用される好適なリン酸塩電荷中和剤としては、例えば、スペルミジン及び1,3-プロパンジアミンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0228】

酸化防止剤

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のLNPは、1つ以上の抗酸化剤を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗酸化剤は、カチオン性脂質、ペイロード、またはその両方の分解を低減するように機能する。いくつかの実施形態では、1つ以上の酸化防止剤は、親水性酸化防止剤を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗酸化剤は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)及びクエン酸塩などのキレート剤である。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗酸化剤は、親油性抗酸化剤を含む。いくつかの実施形態では、親油性抗酸化剤は、ビタミンE異性体またはポリフェノールを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗酸化剤は、少なくとも1mM、少なくとも10mM、少なくとも20mM、少なくとも50mM、または少なくとも100mMの濃度でLNP組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗酸化剤は、約20mMの濃度で粒子中に存在する。

10

【0229】

他の脂質

いくつかの実施形態では、開示のLNP組成物は、ヘルパー脂質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、開示のLNP組成物は、中性脂質を含む。いくつかの実施形態では、開示のLNP組成物は、ステルス脂質を含む。いくつかの実施形態では、開示のLNP組成物は、追加の脂質を含む。中性脂質は、LNPのプロセッシングを安定化及び改善するように機能し得る。

20

【0230】

「ヘルパー脂質」は、トランスフェクション（例えば、生物学的活性薬を含む、本明細書に提供される組成物を含むナノ粒子(LNP)のトランスフェクション）を増強する脂質を指し得る。ヘルパー脂質がトランスフェクションを増強する機序は、粒子の安定性の増強を含む。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、膜融合性を増強する。ヘルパー脂質は、ステロイド、ステロール、及びアルキルレゾルシノールを含み得る。本開示での使用に適したヘルパー脂質は、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノール、及びコレステロールヘミスクシナートを含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、コレステロールヘミスクシナートであってよい。

30

【0231】

「ステルス脂質」は、ナノ粒子が*in vivo*（例えば、血液中）で存在し得る時間の長さを変更する脂質を指し得る。ステルス脂質は、例えば、粒子の凝集を低減し、粒子サイズを制御することにより、製剤プロセスを支援し得る。本明細書で使用されるステルス脂質は、LNPの薬物動態特性を調節し得る。本開示の脂質組成物での使用に適したステルス脂質としては、脂質部分に結合している親水性頭部基を有するステルス脂質が挙げられ得るが、これに限定されない。本開示の脂質組成物での使用に適したステルス脂質及びそのような脂質の生化学に関する情報は、以下に見出すことができる：Romberg et al, *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 1, 2008, pg. 55-71及びI-Toekstra et al, *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52。追加の好適なPEG脂質は、例えば、WO2006/007712に開示されている。

40

【0232】

いくつかの実施形態では、ステルス脂質は、PEG脂質である。一実施形態では、ステルス脂質の親水性頭部基は、PEG（ポリ(エチレンオキシド)と呼ばれることもある）、ポリ(オキサゾリン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(グリセロール)、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリアミノ酸、及びポリN-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドをベースとしたポリマーから選択されるポリマー部分を含む。ステルス脂質は、脂質部分を含み得る。いくつかの実施形態では、ステルス脂質の脂質部分は、ジアシルグリセロールまたはジアシルグリカミドから誘導され得、これは、約C4～約C40の飽和または不飽和炭素原

50

子を独立して含むアルキル鎖長を有するジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基を含むものを含み、鎖は、1つ以上の官能基、例えば、アミドまたはエステル、を含んでもよい。ジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基は、さらに、1つ以上の置換アルキル基を含み得る。

【0233】

ヘルパー脂質、中性脂質、ステルス脂質、及び/または他の脂質の構造及び特性は、W02017173054A1、W02019067999A1、US20180290965A1、US20180147298A1、US20160375134A1、US8236770、US8021686、US8236770B2、US7371404B2、US7780983B2、US7858117B2、US20180200186A1、US20070087045A1、W02018119514A1、及びW02019067992A1にさらに記載され、これらの全ては、全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0234】

LNP製剤

1つ以上の記載された脂質を含むナノ粒子組成物の特定の製剤が本明細書に記載されている。

【0235】

記載のナノ粒子組成物は、哺乳動物の体内の特定の細胞、組織、器官、または系もしくはそれらの群に、RNAなどの治療薬を送達することができる。ナノ粒子組成物の物理化学的特性は、特定の身体標的に対する選択性を高めるために変更され得る。例えば、粒子サイズは、異なる器官の開窓サイズに基づいて調整され得る。ナノ粒子組成物に含まれる治療薬は、また、所望の送達標的（複数可）に基づいて選択されてもよい。例えば、治療薬は、特定の適応症、症状、疾患、もしくは障害に対して、及び/または特定の細胞、組織、器官もしくは系もしくはそれらの群への送達（例えば、局所的な送達、または特異的な送達）に対して選択され得る。特定の実施形態では、ナノ粒子組成物は、細胞内で目的のポリペプチド（例えば、塩基エディター）を産生するために翻訳可能な目的のポリペプチドをコードするmRNAを含み得る。そのような組成物は、特定の器官または細胞型、例えば、肝臓または肝細胞への薬剤物質の送達を促進するために、それらに対する特異性または親和性を有することが可能である。

20

【0236】

LNP組成物中の治療薬または薬剤物質（例えば、塩基エディター及びガイドRNAをコードするmRNA）の量は、ナノ粒子組成物のサイズ、組成、所望の標的及び/もしくは用途、または他の特性に依存し得る。例えば、ナノ粒子組成物に含まれるRNAの量は、RNAのサイズ、配列、及び他の特性に依存し得る。ナノ粒子組成物中の治療薬及び他の要素（例えば、脂質）の相対量も変動し得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物中の脂質構成成分対治療薬の重量/重量比は、約5:1～約60:1、例えば、約5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、及び60:1であってよい。例えば、脂質構成成分対治療薬の重量/重量比は、約10:1～約40:1であってよい。特定の実施形態では、重量/重量比は、約20:1である。ナノ粒子組成物中の治療薬の量は、吸収分光法（例えば、紫外可視分光法）を使用して測定することができる。

30

40

【0237】

いくつかの実施形態では、LNP製剤は、RNAなどの1つ以上の核酸を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のRNA、脂質、及びそれらの量は、特定のN/P比を提供するように選択され得る。N/P比は、約1～約30から選択することができる。N/P比は、約2～約12から選択することができる。いくつかの実施形態では、N/P比は、約0.1～約50である。いくつかの実施形態では、N/P比は、約2～約8である。いくつかの実施形態では、N/P比は、約2～約15、約2～約10、約2～約8、約2～約6、約3～約15、約3～約10、約3～約8、約3～約6、約4～約15、約4～約10、約4～約8、または約4～約6である。いくつかの実施形態では、N/P比は、約2、約2.5、約3、約3.5、約4、約4.5、約5、約5.5、約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約9、または約10である。いくつかの実施

50

形態では、N/P比は、約4～約6である。いくつかの実施形態では、N/P比は、約4、約4.5、約5、約5.5、または約6である。

【0238】

本明細書で使用される場合、「N/P比」は、例えば、脂質構成成分及びRNAを含むナノ粒子組成物中の、脂質（複数可）中の（例えば、生理学的pH範囲で）イオン化可能な窒素原子対核酸分子実体（複数可）中のリン酸基のモル比である。イオン化可能な窒素原子は、例えば、約pH1、約pH2、約pH3、約pH4、約pH4.5、約pH5、約pH5.5、約pH6、約pH6.5、約pH7、約pH7.5、または約pH8以上でプロトン化され得る窒素原子を含み得る。生理学的pH範囲は、例えば、異なる細胞区画（例えば、器官、組織、及び細胞）ならびに体液（例えば、血液、CSF、胃液、乳、胆汁、唾液、涙、及び尿）のpH範囲を含み得る。ある特定の実施形態では、生理学的pH範囲は、哺乳動物の血液のpH範囲、例えば、約7.35～約7.45を指す。同様に、1つ以上のイオン化可能な窒素原子を有するリン酸塩電荷中和剤の場合、N/P比は、リン酸塩電荷中和剤中のイオン化可能な窒素原子対核酸中のリン酸基のモル比を指し得る。いくつかの実施形態では、イオン化可能な窒素原子は、5～14のpH範囲内でイオン化可能な窒素原子を指す。

10

【0239】

リン酸基を含有しないペイロードの場合、N/P比は、脂質中のイオン化可能な窒素原子対ペイロード中の総負電荷のモル比を指し得る。例えば、LNP組成物のN/P比は、LNP組成物中の総イオン化可能な窒素原子対組成物中に存在するペイロード中の総負電荷のモル比を指し得る。

20

【0240】

いくつかの実施形態では、LNPは、約50%～約70%、約70%～約90%、または約90%～約100%の範囲の平均カプセル化効率で形成される。いくつかの実施形態では、LNPは、約75%～約98%の範囲の平均カプセル化効率で形成される。

【0241】

別の態様では、本明細書で提供される組成物を含む脂質ナノ粒子(LNP)が本明細書で提供される。本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子(LNP)組成物」または「ナノ粒子組成物」は、1つ以上の記載の脂質を含む組成物である。LNP組成物は、通常、マイクロメートルオーダー以下であり、脂質二重層を含んでもよい。ナノ粒子組成物は、脂質ナノ粒子(LNP)、リポソーム（例えば、脂質小胞）、及びリポプレックスを含む。いくつかの実施形態では、LNPは、1000nm、500nm、250nm、200nm、150nm、100nm、75nm、50nm、または25nm未満の直径を有する任意の粒子を指す。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、サイズが、1～1000nm、1～500nm、1～250nm、25～200nm、40～100nm、50～100nm、50～90nm、50～80nm、50～70nm、55～95nm、55～80nm、55～75nm、60～100nm、60～90nm、60～80nm、60～70nm、25～100nm、25～80nm、または40～80nmの範囲であってよい。

30

【0242】

いくつかの実施形態では、LNPは、カチオン性、アニオン性、または中性脂質から作製され得る。いくつかの実施形態では、LNPは、トランスフェクション活性及びナノ粒子の安定性を高めるヘルパー脂質として、融合性リン脂質1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)または膜成分コレステロールなどの中性脂質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、LNPは、疎水性脂質、親水性脂質、または疎水性脂質及び親水性脂質の両方を含んでもよい。当該技術分野で既知の任意の脂質または脂質の組み合わせを、LNPを生成するために、使用することができる。LNPを生成するために使用される脂質の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：DOTMA (N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)、DOSPA (N,N-ジメチル-N-([2-スぺルミンカルボキサミド] エチル)-2,3-ビス(ジオレイルオキシ)-1-プロパンイミニウム五塩酸塩)、DOTAP (1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン)、DMRIE (N-(2-ヒドロキシエチル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ-1-プロパンアミニウムブロミド)、DC-コレステロール

40

50

(3β-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル] コレステロール)、DOTAP-コレステロール、GAP-DMORIE-DPyPE、及びGL67A-DOPE-DMPE(,2-ビス(ジメチルホスフィノ)エタン)-ポリエチレングリコール(PEG)。カチオン性脂質の例としては、98N12-5、C12-200、DLin-KC2-DMA(KC2)、DLin-MC3-DMA(MC3)、XTC、MD1、及び7C1が挙げられるが、これらに限定されない。中性脂質の例としては、DPPC、DPPC(ジパルミトイルホスファチジルコリン)、POPC(1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン)、DOPE、及びSM(スフィンゴミエリン)が挙げられるが、これらに限定されない。PEG修飾脂質の例としては、PEG-DMG(ジミリスチルグリセロール)、PEG-CerC14、及びPEG-CerC20が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、脂質は、LNPを生成するために、任意の数のモル比で組み合わせられ得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、LNPを生成するために、広範囲のモル比で脂質(複数可)と組み合わせられ得る。

10

【0243】

「置換された」という用語は、別途指示のない限り、所与の構造における1つ以上の水素ラジカルの、限定されないが以下を含む特定の置換基のラジカルとの交換を指す：ハロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロシクリル、チオール、アルキルチオ、オキソ、チオキシ、アリールチオ、アルキルチオアルキル、アリールチオアルシル(arylthioalkyl)、アルキルスルホニル、アルキルスルホニルアルキル、アリールスルホニルアルキル、アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アイルアミノカルボニル(aiylaminocarbonyl)、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ハロアルキル、アミノ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アルキルアミノ、アリールアミノ、アルキルアミノアルキル、アイルアミノアルキル(aiylaminoalkyl)、アミノアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、アミノカルボニルアルキル、アシル、アラルコキシカルボニル(aralkoxycarbonyl)、カルボン酸、スルホン酸、スルホニル、ホスホン酸、アリール、ヘテロアリール、複素環式基、及び脂肪族基。置換基は、さらに置換されていてもよいことが理解される。例示的な置換基としては、アミノ、アルキルアミノなどが挙げられる。

20

【0244】

本明細書で使用される「置換基」という用語は、指定された原子位置で置換されている、コア分子の原子上の位置可変要素を意味し、指定された原子上の1つ以上の水素が置き換わっており、但し、指定された原子の通常の原子価を超えず、置換により安定した化合物が得られる。置換基及び/または可変要素の組み合わせは、そのような組み合わせにより安定な化合物が得られる場合にのみ許可される。当業者は、本明細書に記載または表示されるように満たされていないと思われる原子価を有する任意の炭素及びヘテロ原子は、記載または表示される原子価を満たすのに十分な数の水素原子(複数可)を有すると想定されることに留意すべきである。特定の場合には、結合点として二重結合(例えば、「オキソ」または「=O」)を有する1つ以上の置換基が、置換基群内で本明細書に記載、表示、または列挙され得、その構造は、式(1)のコア構造への結合点として単結合のみを示し得る。当業者であれば、単結合のみが示されていても、二重結合がそれらの置換基について意図されていることを理解するであろう。

30

40

【0245】

「アルキル」という用語は、1~20個の炭素原子を有し、単結合で分子の残部に結合している直鎖状または分枝状の炭化水素鎖ラジカルを指す。最大10個の炭素原子を含むアルキルは、C₁-C₁₀アルキルと表現され、同様に、例えば、最大6個の炭素原子を含むアルキルは、C₁-C₆アルキルである。他の数の炭素原子を含むアルキル(及び本明細書で定義される他の部分)も同様に表される。アルキル基としては、C₁-C₁₀アルキル、C₁-C₉アルキル、C₁-C₈アルキル、C₁-C₇アルキル、C₁-C₆アルキル、C₁-C₅アルキル、C₁-C₄アルキル、C₁-C₃アルキル、C₁-C₂アルキル、C₂-C₈アルキル、C₃-C₈アルキル、及びC₄-C₈アルキルが挙げられるが、これらに限定されない。代表的なアルキル基とし

50

ては、メチル、エチル、*n*-プロピル、1-メチルエチル (*i*-プロピル)、*n*-ブチル、*i*-ブチル、*s*-ブチル、*n*-ペンチル、1,1-ジメチルエチル (*t*-ブチル)、3-メチルヘキシル、2-メチルヘキシル、1-エチル-プロピルなどが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アルキルは、メチルまたはエチルである。いくつかの実施形態では、アルキルは、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ または $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ である。本明細書において別途具体的な記載のない限り、アルキル基は、以下に記載のように任意に置換されていてもよい。「アルキレン」または「アルキレン鎖」は、分子の残部をラジカル基に連結する直鎖状または分枝状の二価炭化水素鎖を指す。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、または $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-\text{CH}_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ である。いくつかの実施形態では、アルキレンは、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ である。

10

【0246】

「アルケニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合が存在する一種のアルキル基を指す。一実施形態では、アルケニル基は、式 $-\text{C}(\text{R})=\text{CR}^2$ を有し、Rは、アルケニル基の残部を指し、これは、同じであっても、異なってもよい。いくつかの実施形態では、Rは、Hまたはアルキルである。いくつかの実施形態では、アルケニルは、エテニル（すなわち、ビニル）、プロベニル（すなわち、アリル）、ブテニル、ペンテニル、ペンタジエニルなどから選択される。アルケニル基の非限定例としては、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ 、及び $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ が挙げられる。

20

【0247】

「シクロアルキル」という用語は、環を形成する原子（すなわち、骨格原子）のそれぞれが炭素原子である、単環式または多環式の非芳香族ラジカルを指す。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、飽和または部分的に不飽和である。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、スピロ環状化合物または架橋化合物である。いくつかの実施形態では、シクロアルキルは、芳香環と縮合している（この場合、シクロアルキルが、非芳香環炭素原子を介して結合している）。シクロアルキル基は、3~10個の環原子を有する基を含む。代表的なシクロアルキルとしては、3~10個の炭素原子、3~8個の炭素原子、3~6個の炭素原子、または3~5個の炭素原子を有するシクロアルキルが挙げられるが、これらに限定されない。単環式シクロアルキルラジカルとしては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが挙げられる。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、またはシクロヘキシルである。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロペンテニルまたはシクロヘキセニルである。いくつかの実施形態では、単環式シクロアルキルは、シクロペンテニルである。多環式ラジカルとしては、例えば、アダマンチル、1,2-ジヒドロナフタレニル、1,4-ジヒドロナフタレニル、テトラニル、デカリニル、3,4-ジヒドロナフタレニル-1(2H)-オン、スピロ[2.2]ペンチル、ノルボルミル、及びビシクル[1.1.1]ペンチルが挙げられる。本明細書で別途具体的に記載されない限り、シクロアルキル基は、任意に置換されていてもよい。構造に応じて、シクロアルキル基は、一価または二価（すなわち、シクロアルキレン基）であり得る。

30

40

【0248】

「複素環」または「複素環式」という用語は、窒素、酸素、及び硫黄から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含むヘテロ芳香環（ヘテロアリールとしても知られる）及びヘテロシクロアルキル（ヘテロ脂環式基としても知られる）を指し、各複素環式基は、環系に3~12原子を有する。但し、いずれの環も、2つの隣接するOまたはS原子を含有しない。「ヘテロシクリル」は、複素環式化合物の任意の環原子から水素原子を除去することにより形成される一価の基である。いくつかの実施形態では、複素環は、単環式、二環式、多環式、スピロ環式、または架橋化合物である。非芳香族複素環基（ヘテロシクロアルキルとしても知られる）は、環系に3~12個の原子を有する環を含み、芳香族複素環

50

基は、環系に5～12個の原子を有する環を含む。複素環基は、ベンゾ縮合環系を含む。非芳香族複素環基の例は、以下である：ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、オキサゾリジノニル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、チオキサニル、ピペラジニル、アジリジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモピペリジニル、オキセパニル、チエパニル、オキサゼピニル、ジアゼピニル、チアゼピニル、1,2,3,6-テトラヒドロピリジニル、ピロリン-2-イル、ピロリン-3-イル、インドリニル、2H-ピラニル、4Hピラニル、ジオキサニル、1,3-ジオキサラニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、3-アザビシクロ [3.1.0] ヘキサニル1,3-アザビシクロ [4.1.0] ヘプタニル、3h-インドリル、インドリン-2-オニル、イソインドリン-1-オニル、イソインドリン-1,3-ジオニル、3,4-ジヒドロイソキノリン-1(2H)-オニル、3,4-ジヒドロキノリン-2(1H)-オニル、イソインドリン-1,3-ジチオニル、ベンゾ [d] オキサゾール-2(3H)-オニル、1H-ベンゾ [d] イミダゾール-2(3H)-オニル、ベンゾ [d] チアゾール-2(3H)-オニル、及びキノリジニル。芳香族複素環基の例は、以下である：ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フチル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、キノリニル、イソキノリニル、インドリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、シンノリニル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、イソインドリル、プテリジニル、プリニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フラズアニル(furazanyl)、ベンゾフラズアニル(benzofurazanyl)、ベンゾチオフェニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、及びフロピリジニル。上述の基は、可能な場合、C結合（またはC連結）またはN結合のいずれかである。例えば、ピロールに由来する基は、ピロール-1-イル（N結合）またはピロール-3-イル（C結合）の両方を含む。さらに、イミダゾールから誘導される基は、イミダゾール-1-イルもしくはイミダゾール-3-イル（双方ともにN結合）またはイミダゾール-2-イル、イミダゾール-4-イルもしくはイミダゾール-5-イル（全てC結合）を含む。複素環基は、ベンゾ縮合環系を含む。非芳香族複素環は、ピロリジン-2-オンなどの1つまたは2つのオキソ(=O)部分で任意に置換されている。いくつかの実施形態では、二環式複素環の2つの環のうちの少なくとも1つが芳香族である。いくつかの実施形態では、二環式複素環の両方の環が芳香族である。

10

20

30

40

50

【0249】

「ヘテロシクロアルキル」という用語は、窒素、酸素、及び硫黄から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含むシクロアルキル基を指す。本明細書において別途具体的な記載のない限り、ヘテロシクロアルキルラジカルは、縮合（アリアルもしくはヘテロイル環と縮合する場合、ヘテロシクロアルキルは、非芳香族環原子を介して結合している）または架橋の環系が含まれ得る単環式または二環式系であってよい。ヘテロシクロアルキルラジカル内の窒素、炭素、または硫黄原子は、任意に酸化されていてもよい。窒素原子は、任意に4級化されていてもよい。ヘテロシクロアルキルラジカルは、部分的または完全に飽和している。ヘテロシクロアルキルラジカルの例としては、以下が含まれるが、これらに限定されない：ジオキサラニル、チエニル [1,3] ジチアニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、デカヒドロキノリル、デカヒドロイソキノリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、オクタヒドロインドリル、オクタヒドロイソインドリル、2-オキソピペラジニル、2-オキソピペリジニル、2-オキソピロリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、ピラゾリジニル、キヌクリジニル、チアゾリジニル、テトラヒドロフリル、トリチアニル、テトラヒドロピラニル、チオモルホリニル、チアモルホリニル、1-オキソチオモルホリニル、1,1-ジオキソ-チオモルホリニル。ヘテロシクロアルキルという用語は、限定されないが、単糖、二糖、及びオリゴ糖を含む、全ての

環形態の炭水化物も含む。別途記載のない限り、ヘテロシクロアルキルは、環内に2～12個の炭素を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2～10個の炭素を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2～10個の炭素、及び、1または2個のN原子を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2～10個の炭素、及び、3または4個のN原子を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2～12個の炭素、0～2個のN原子、0～2個のO原子、0～2個のP原子、及び0～1個のS原子を有する。いくつかの実施形態では、ヘテロシクロアルキルは、環内に2～12個の炭素、1～3個のN原子、0～1個のO原子、及び0～1個のS原子を有する。ヘテロシクロアルキルの炭素原子数に言及する場合、ヘテロシクロアルキルの炭素原子数は、ヘテロシクロアルキルを構成する（ヘテロ原子を含む）原子総数（すなわち、ヘテロシクロアルキル環の骨格原子）と同じではないことが理解される。本明細書において別途具体的な記載のない限り、ヘテロシクロアルキル基は、任意に置換されていてもよい。本明細書で使用される場合、「ヘテロシクロアルキレン」という用語は、二価のヘテロシクロアルキル基を指し得る。

10

【0250】

「ヘテロアリアル」という用語は、窒素、酸素、及び硫黄から選択される1つ以上の環ヘテロ原子を含むアリアル基を指す。ヘテロアリアルは、単環式または二環式である。単環式ヘテロアリアルの実例としては、以下が挙げられる：ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、ピリダジニル、トリアジニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、インドリジン、インドール、ベンゾフラン、ベンゾチオフエン、インダゾール、ベンゾイミダゾール、プリン、キノリジン、キノリン、イソキノリン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、1,8-ナフチリジン、及びプテリジン。単環式ヘテロアリアルの実例としては、以下が挙げられる：ピリジニル、イミダゾリル、ピリミジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、ピリダジニル、トリアジニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、及びフラザニル。二環式ヘテロアリアルの実例としては、以下が挙げられる：インドリジン、インドール、ベンゾフラン、ベンゾチオフエン、インダゾール、ベンゾイミダゾール、プリン、キノリジン、キノリン、イソキノリン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、1,8-ナフチリジン、及びプテリジン。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルは、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、チアゾリル、チエニル、チアジアゾリル、またはフリルである。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルは、環内に0～6個のN原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルは、環内に1～4個のN原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルは、環内に4～6個のN原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルは、環内に0～4個のN原子、0～1個のO原子、0～1個のP原子、及び0～1個のS原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルは、環内に1～4個のN原子、0～1個のO原子、及び0～1個のS原子を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアルは、C₁-C₉ヘテロアリアルである。いくつかの実施形態では、単環式ヘテロアリアルは、C₁-C₅ヘテロアリアルである。いくつかの実施形態では、単環式ヘテロアリアルは、5員または6員のヘテロアリアルである。いくつかの実施形態では、二環式ヘテロアリアルは、C₆-C₉ヘテロアリアルである。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアル基は、部分的に還元されて、本明細書に定義されるヘテロシクロアルキル基を形成する。いくつかの実施形態では、ヘテロアリアル基は、完全に還元されて、本明細書に定義されるヘテロシクロアルキル基を形成する。

20

30

40

【0251】

本明細書で使用される場合、アミノ脂質は、pH範囲4～14でプロトン化可能（またはイオン化可能）である少なくとも1つの1級、2級、または3級アミン部分を含有し得る。いくつかの実施形態では、アミン部分（複数可）は、アミノ脂質の親水性頭部基として機

50

能する。核酸-脂質ナノ粒子製剤中のアミノ脂質（または複数のアミノ脂質）のアミン部分（複数可）の大部分が、生理的pHでプロトン化される場合、ナノ粒子は、カチオン性脂質ナノ粒子（cLNP）と呼ぶことができる。核酸-脂質ナノ粒子製剤中のアミノ脂質（または複数のアミノ脂質）のアミン部分（複数可）のほとんどが、生理的pHではプロトン化されないが、酸性pH、例えば、エンドソームpHではプロトン化することができる場合、イオン化可能脂質ナノ粒子（iLNP）と呼ぶことができる。cLNPを構成するアミノ脂質は、一般に、カチオン性アミノ脂質（cLipid）と呼ぶことができる。iLNPを構成するアミノ脂質を、イオン化可能アミノ脂質（iLipid）と呼ぶことができる。アミノ脂質は、生理学的pHで、iLipidまたはcLipidであり得る。

【0252】

本明細書で使用される場合、LNP組成物または製剤は、通常、マイクロメートルオーダー以下のサイズであり、脂質二重層を含んでもよい。ナノ粒子組成物は、脂質ナノ粒子（LNP）、リポソーム（脂質小胞）、及びリポプレックスナノ粒子組成物（脂質二重層を有する直径500nm以下のリポソーム）を包含する。本明細書に記載のLNPは、約1nm～約2500nm、約10nm～約1500nm、約20nm～約1000nm、約30nm～約150nm、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、約70nm～約100nm、約80nm～約100nm、約90nm～約100nm、約70～約90nm、約80nm～約90nm、または約70nm～約80nmの平均直径を有し得る。本明細書に記載のLNPは、約30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm、150nm、またはそれ以上の平均直径を有し得る。本明細書に記載のLNPは、実質的に無毒であり得る。

【0253】

本明細書で使用される場合、「リン脂質」は、リン酸部分、及び不飽和脂肪酸鎖などの1つ以上の炭素鎖を含む脂質を指し得る。リン脂質は、1つ以上の多重（例えば、二重または三重）結合を含んでもよい。いくつかの実施形態では、リン脂質は、膜への融合を促進し得る。例えば、カチオン性リン脂質は、膜（例えば、細胞膜または細胞内膜）の1つ以上の負荷電リン脂質と相互作用し得る。リン脂質の膜への融合は、LNPの1つ以上の要素が膜を通過すること（すなわち、1つ以上の要素の細胞への送達）を可能にし得る。

【0254】

ペイロード

本明細書に記載のLNPは、1つ以上の治療薬または薬剤物質などのペイロードを目的の標的細胞または器官に送達するように設計することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のLNPは、本明細書に記載の塩基エディターシステムの1つ以上の構成成分を封入する。例えば、LNPは、ガイドRNA、ガイドRNAをコードする核酸、ガイドRNAをコードするベクター、塩基エディター融合タンパク質、塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸、プログラム可能なDNA結合ドメイン、プログラム可能なDNA結合ドメインをコードする核酸、デアミナーゼ、デアミナーゼをコードする核酸、またはそれらの全てもしくは任意の組み合わせのうちの1つ以上を封入し得る。いくつかの実施形態では、核酸は、DNAである。いくつかの実施形態では、核酸は、RNA、例えば、mRNA及び/またはガイドRNAである。いくつかの実施形態では、該核酸（複数可）は、化学的に修飾されている。

【0255】

いくつかの実施形態では、ペイロードは、1つ以上の核酸（すなわち、1つ以上の核酸分子実体）を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、一本鎖核酸である。いくつかの実施形態では、一本鎖核酸は、DNAである。いくつかの実施形態では、一本鎖核酸は、RNAである。いくつかの実施形態では、核酸は、二本鎖核酸である。いくつかの実施形態では、二本鎖核酸は、DNAである。いくつかの実施形態では、二本鎖核酸は、DNA-RNAハイブリッドである。いくつかの

実施形態では、核酸は、メッセンジャーRNA (mRNA)、マイクロRNA、非対称干渉RNA (aiRNA)、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、またはダイサー基質dsRNAである。いくつかの実施形態では、一本鎖核酸は、2次構造、例えば、1つ以上のステムループを形成する。いくつかの他の実施形態では、一本鎖核酸は、分子内に1つ以上のステムループ及び一本鎖領域を含む。

【0256】

キット

本明細書に開示の治療薬または薬剤物質は、本明細書に記載のキットの一部であることが本明細書で企図される。従って、本開示の一態様は、状態を処置または予防するための、本明細書に提供される単一ガイドRNA、本明細書に提供される塩基エディターシステム及び複合体、本明細書に提供される組成物、ならびに/または本明細書に提供される脂質ナノ粒子製剤を含む組成物を含むキットに関する。キットは、さらに、状態を処置または予防するための1つ以上の追加の治療レジメンまたは薬剤を含み得る。

10

【0257】

特定の実施形態では、本明細書に記載の1つ以上の方法で使用されるキット及び製造物品も本明細書で開示されている。そのようなキットは、1つ以上の容器、例えば、バイアル、チューブなどを受け入れるように区画化されているキャリア、パッケージ、または容器が含まれ、容器(複数可)のそれぞれは、本明細書に記載の方法で使用されるべき別個の要素の1つを含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、注射器、及び試験管が挙げられる。一実施形態では、容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成される。

20

【0258】

本明細書で提供される製造物品は、包装材料を含有する。医薬包装材料の例としては、ブリスターパック、ボトル、チューブ、バッグ、容器、ボトル、ならびに、選択された製剤と意図された投与及び処置様式に適した任意の包装材料が挙げられるが、これらに限定されない。

【0259】

例えば、容器(複数可)は、本明細書に記載の組成物を含み、任意に、さらに、本明細書に開示の治療レジメンまたは薬剤を含む。そのようなキットは、任意に、本明細書に記載の方法におけるその使用に関する識別用の説明書またはラベルまたは使用説明書を含む。

30

【0260】

キットは、通常、内容物及び/または使用説明書を記載したラベルと、使用説明書が記載された添付文書を含む。通常、説明書一式も含まれるであろう。

【0261】

実施形態では、ラベルは、容器上にあるか、または容器に付随している。一実施形態では、ラベルを形成する文字、数字、または他の文字が容器自体に取り付けられるか、成形されるか、またはエッチングされる場合、ラベルは容器上にあり；ラベルは、容器を保持する入れ物またはキャリア内に存在する場合、例えば、添付文書として容器に伴われる。一実施形態では、内容物が、特定の治療用途に使用されるべきであることを示すためにラベルが使用される。ラベルには、本明細書に記載の方法などにおける内容物の使用説明書も示す。

40

【0262】

投与

当業者は、限定されないが、疾患または障害の重症度、以前の処置、対象の一般的特徴(対象の健康状態、性別、体重及び/または年齢、ならびに存在する他の疾患を含む)を含む特定の要素が、対象を効果的に処置するために必要な投薬量及び投与頻度に影響を及ぼし得ることを理解するであろう。さらに、治療有効量の組成物による対象の処置は、単一の処置を含み得るか、または、好ましくは、一連の処置を含み得る。処置に使用される本開示の組成物の有効投薬量は、特定の処置の過程で増加または減少し得ることも理解されるであろう。投薬量の変化が、本明細書に記載の診断アッセイの結果から生じるまたは

50

明らかになることがある。治療上有効な投薬量は、一般に、投与時の患者の状態に依存する。正確な量は、日常的な実験により決定することができるが、最終的には、臨床医の判断、例えば、疾患の徴候について患者を監視し、それに応じて処置を調整することにより決まることがある。

【0263】

投与頻度は、治療の過程にわたって決定及び調整され得、必ずしもではないが、一般に、疾患の処置及び/または抑制及び/または改善及び/または遅延に基づくものである。あるいは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの徐放性連続放出製剤が適切であり得る。持続放出を達成するための様々な製剤及びデバイスが、当該技術分野で既知である。いくつかの実施形態では、投薬量は、毎日、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、または6日毎である。いくつかの実施形態では、投与頻度は、週1回、2週に1回、4週に1回、5週に1回、6週に1回、7週に1回、8週に1回、9週に1回、もしくは10週に1回、または月1回、2ヶ月に1回、もしくは3ヶ月に1回、またはそれ以上の間隔である。この治療の進行は、従来の手法及びアッセイにより容易に監視される。

10

【0264】

投与レジメン（本明細書に開示の組成物を含む）は、経時的に変動し得る。いくつかの実施形態では、正常体重の成人対象の場合、約0.01~1000mg/kgの範囲の用量が投与されることが企図される。いくつかの実施形態では、用量は、1~200mgである。いくつかの実施形態では、用量は、0.03mg/kg~3mg/kgまたはそれらの間の任意の量であってよい。特定の投薬レジメン、すなわち、用量、タイミング、及び反復は、特定の対象及びその対象の病歴、ならびにポリペプチドまたはポリヌクレオチドの特性（例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの半減期、及び当該技術分野に周知の他の考慮点）に依存するであろう。

20

【0265】

本明細書に記載の組成物の好適な治療用量は、用いられる特定の薬剤（またはその組成物）、製剤及び投与経路、疾患の種類及び重症度、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが予防目的で投与されるか治療目的で投与されるか、以前の治療法、対象の臨床の病歴及びアンタゴニストに対する応答、ならびに主治医の判断に依存するであろう。通常は、臨床医は、所望の結果を達成する用量に到達するまで、ポリペプチドを投与することになる。

30

【0266】

1つ以上の組成物の投与は、例えば、レシピエントの生理学的状態、投与の目的が治療であるか予防であるか、及び専門家に既知の他の要因に応じて、連続的または断続的であり得る。組成物の投与は、予め選択された期間にわたって本質的に連続的であっても、例えば、疾患の発症前、発症中、または発症後のいずれかに、一連の間隔をあけた投与であってもよい。

【0267】

本明細書に記載されている本開示の方法及び組成物（その実施形態を含む）は、哺乳動物に同時投与することができる1つ以上の追加の治療レジメンまたは薬剤または処置と共に投与することができる。「同時投与する」は、1つ以上の追加の治療薬の効果を増強するのに十分近い時間で、1つ以上の追加の治療レジメンまたは薬剤または処置及び本開示の組成物を投与すること（または逆もまた同様）を意味する。この点に関しては、本明細書に記載されている本開示の組成物は、1つ以上の追加の治療レジメンまたは薬剤または処置と同時に、異なる時間に、または全く異なる治療スケジュールで投与することができる（例えば、第1の処置は、毎日であり得るが、追加の処置は毎週である）。例えば、実施形態では、第2の治療レジメンまたは薬剤または処置は、本開示の組成物と同時に、その前に、またはその後に投与される。

40

【0268】

実施形態では、塩基エディター融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド及びガイドRNAが対象に投与される。実施形態では、塩基エディター融合タンパク質をコードす

50

るポリヌクレオチドは、mRNAである。実施形態では、組み合わされた塩基エディター融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド及びガイドRNAの用量は、0.01mg/kg～10mg/kg、例えば、0.5mg/kg～5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kgなどである。実施形態では、そのような量の塩基エディター融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド及びガイドRNAを含むLNPが、対象に投与される。実施形態では、対象は、霊長類である。実施形態では、対象は、非ヒト霊長類である。実施形態では、非ヒト霊長類は、カニクイザルである。

【0269】

実施形態では、ガイドRNA及び塩基エディター融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、カニクイザルなどの非ヒト霊長類に投与すると、次世代配列決定で測定されるところにより、全肝細胞の20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、または60%以上の塩基変化が生じる。実施形態では、そのような塩基の変化の割合は、対象に0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、または3mg/kgのガイドRNA及び塩基エディター融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを合わせた用量を投与する時に得られる。実施形態では、そのような用量は、LNPで投与される。実施形態では、そのような投与は、血清中TTRレベルの低減をもたらす。

10

【0270】

本発明は、以下の実施例で説明される。特定の例、材料、量、及び手順は、本明細書に記載の本発明の範囲及び趣旨に従って広く解釈されるべきであることが理解されるべきである。

20

【実施例】

【0271】

実施例1

TTR遺伝子のアデニン塩基編集のガイド

この実施例では、ABE8.8（及びABE7.10などのStreptococcus pyogenes Cas9を含有する他のABEバリエーション、またはNGG PAMを使用し得る別のCasタンパク質）に、1)開始コドン破壊させるか、または、2)編集ウィンドウ内（DNAの20ntプロトスペーサー領域のおよそ4～7位）で、A→G編集を介して、スプライス部位（ドナーもしくはアクセプター）を破壊させるgRNA配列を同定した。ヒトTTR遺伝子全体にわたって、5つの配列を同定した（表1）。プロトスペーサー配列のそれぞれと一致し、別途、100ntの標準的なStreptococcus pyogenes CRISPR gRNA配列に適合するgRNAを合成し、各gRNA分子は、最小限の化学修飾を有する（表1に指定）。様々な希釈率（2500、1250、625ng/RNA/mL）を使用して、gRNAのそれぞれを、MessengerMax試薬（Lipofectamine）を介して、初代ヒト肝細胞に、等量のin vitro転写ABE8.8 mRNA（分子量比1:1）と共に同時トランスフェクトして、様々な濃度の被験物質における編集活性を評価した。

30

40

50

【表 1】

表1. TTRガイド

gRNA ID	種	プロトスペーサー(5'-3')	gRNA配列(5'-3')
GA457	ヒト	GCCATCCT GCCAAGA ATGAG (配 列番号24)	gs cs cs AUCCUGCCAAGAAUGAGGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCU U sususu (配列番号11)
GA519	カニクイザル	GCCATCCT GCCAAGA ACGAG (配 列番号28)	gs cs cs AUCCUGCCAAGAACGAG g UUUUAGagcu aGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUUAucAAc uuGaaaaagugGcaccgagucggugcu u susus (配列番号 16)
GA458	カニクイザル	GCCATCCT GCCAAGA ACGAG (配 列番号28)	gs cs cs AUCCUGCCAAGAACGAGGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCU U sususu (配列番号29)
GA459	ヒト	GCAACTTA CCCAGAG GCAA (配 列番号25)	gs cs as ACUUACCCAGAGGCAAAGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCU U sususu (配列番号13)
GA460	ヒト / カニクイザル	TATAGGAA AACCAGTG AGTC (配 列番号26)	us as us AGGAAAACCAGUGAGUCGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCU U sususu (配列番号14)
GA520	ヒト / カニクイザル	TATAGGAA AACCAGTG AGTC (配 列番号26)	us as us AGGAAAACCAGUGAGUC g UUUUAGagc uaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGUccGUUAuc AAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcu u susus (配 列番号17)
GA461	ヒト / カニクイザル	TACTCACC TCTGCATG CTCA (配 列番号27)	us as cs UCACCUCUGCAUGCUCAGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCU U sususu (配列番号15)
	配列内の文字：-A：アデノシン；C：シチジン；G：グアノシン；U：ウリジン；a：2'-O-メチルアデノシン；c：2'-O-メチルシチジン；g：2'-O-メチルグアノシン；u：2'-O-メチルウリジン；及びs：ホスホロチオエート(PS)主鎖結合。gRNA配列中の太字は、プロトスペーサーに相当するスペーサー配列を示す。GA460及びGA520は、同じプロトスペーサー配列を有するが、gRNA配列に異なる化学修飾がある。		

【0272】

対応するカニクイザルTTR遺伝子配列の直交するプロトスペーサー配列では、各gRNAは、また、5000、2500、1250、625、312.5、及び156.25ng/RNA/mLの、等量のABE8.8 mRNA（分子量比1:1）で初代カニクイザル肝細胞にトランスフェクトした。使用したABE8.8（MA004）のmRNA及び対応するアミノ酸の配列を、以下の表11に示す。トランスフェクションの3日後、ゲノムDNAを肝細胞から採取し、標的スプライス部位の周囲で生成されたPCRアンプリコンの次世代シーケンシングを使用して、塩基編集について評価した。いくつかの部位は、高い編集効率を示した。特に、GA457（GA458は、カニクイザルの同等物）、GA460、及びGA461は、ヒト及びカニクイザル

の両方の初代肝細胞において高い編集活性を示した。図5A～5C、図6、及び表2～3を参照のこと。

【表2】

表2. ヒト初代肝細胞における編集活性

		ヒト肝細胞-編集率(%)					
gRNA ID	プロトスペーサー(5'-3')	2500、 rep 1	2500、 rep 2	1250、 rep 1	1250、 rep 2	625、 rep 1	625、 rep 2
GA457	GCCATCCTGCCAAGA ATGAG (配列番号24)	33.96	31.31	26.49	24.86	17.24	15.39
GA459	GCAACTTACCCAGAG GCAAA (配列番号25)	8.5	8.69	5.46	6.15	3.79	3.89
GA460	TATAGGAAAACCACT GAGTC (配列番号26)	47.61	47.79	38.33	35.8	23.77	22.27
GA461	TACTCACCTCTGCAT GCTCA (配列番号27)	40.42	39.43	32.82	32.38	21.81	22.31

10

20

【表3】

表3. カニクイザル初代肝細胞における編集活性

		カニクイザル肝細胞-編集率(%)					
gRNA ID	プロトスペーサー(5'-3')	5000	2500	1250	625	312.5	156.25
GA458	GCCATCCTGCC AAGAACGAG (配列番号28)	35.91	27.25	22.74	16.07	10.65	6.06
GA460	TATAGGAAAAC CAGTGAGTC (配 列番号26)	40.16	38.25	31.71	18.44	11.22	1.62
GA461	TACTCACCTCT GCATGCTCA (配 列番号27)	37.53	29.8	19.46	13.16	7.45	0.07

30

40

【0273】

表2及び3に提示される結果は、本明細書に提供される教示に従って達成され得る結果を代表するものであると理解されるべきである。本発明によるTTR遺伝子を編集するための組成物は、表2または表3に記載の活性と、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または100%以上異なる編集活性を生じ得る。いくつかの実施形態では、組成物は、表2または表3に記載の活性の100%以内、90%以内、80%以内、70%以内、60%以内、50%以内、40%以内、30%以上以内、20%以上以内、または10%以内の編集活性を提供する。

【0274】

50

実施例 2

オフターゲット分析

in vivoでヒト肝臓におけるTTRをノックダウンする塩基編集療法の安全性を確立することを目的として、初代ヒト肝細胞でのオフターゲット変異導入解析が評価される。PCT/US19/27788 (“Highly Sensitive in vitro Assays to Define Substrate Preferences and Sites of Nucleic-Acid Binding, Modifying, and Cleaving Agents”) に詳述されているONE-seq手順に従って、ヒト肝細胞におけるオフターゲット編集を評価した。ONE-seq手順を用いたオフターゲット分析の簡略化されたフローチャートが図7に示される。In vitroでの生化学アッセイONE-seqを使用して、オフターゲット部位候補のリストを作成し、ABE8.8塩基エディタータンパク質及び3つのプロトスペーサーガイド配列(GA457、GA460、及びGA461)のそれぞれを含むリボヌクレオタンパク質の性質を決定し、ライブラリー内のオリゴヌクレオチドを切断した。GA457、GA460、及びGA461に対して生成されたライブラリーのONE-seq解析の結果を、記載のオフターゲット部位の候補と共に表8～10に示す。

10

20

30

40

50

【0275】

ONE-seqの方法論は、以下の通りである：ONE-seqライブラリーの設計は、オンターゲットと配列相同性を有する参照ゲノム内の部位をコンピューターで同定することから始まる。ヒトONE-seqライブラリーの場合、参照ヒトゲノム(GRCh38、Ensemblv98、染色体ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-98/fasta/homo_sapiens/dna/Homo_sapiens.GRCh38.dna.chromosome.{1-22,X,Y,MT}.fa及びftp://ftp.ensembl.org/pub/release-98/fasta/homo_sapiens/dna/Homo_sapiens.GRCh38.dna.nonchromosomal.fa)は、Cas-Designer v1.2 (http://www.rgenome.net/cas-designer/) を使用して、上記プロトスペーサーに対する最大6ミスマッチを有する潜在的なオフターゲット部位、ならびに、最大4つのミスマッチ及び最大2つのDNAまたはRNAバルジを有する部位について検索した。

【0276】

最大6個のミスマッチがあり、バルジがない部位は、X<ミスマッチ数><バルジ数>コードを使用して参照される。従って、オンターゲット部位には、X00のラベルが付けられ；オンターゲットとの1つのミスマッチがあり、バルジがない部位には、X10のラベルが付けられる、などとなる。DNAバルジのある部位は、DNA<ミスマッチ数><バルジ数>という同様の命名法で呼ばれる。従って、オンターゲットに対して4つのミスマッチ及び2つのDNAバルジがある部位は、DNA42のラベルが付けられる。RNAバルジにも同じ命名法が使用されるが、これらは、RNA<ミスマッチ数><バルジ数>としてコードされる。

【0277】

同定されたプロトスペーサー配列を、それぞれの参照ゲノムからの隣接配列の両側で10ヌクレオチド(nt)伸長した（これらの領域は、本明細書ではゲノムコンテキストと呼ばれる）。次に、これらの拡張配列は、異なるヌクレオチド組成及び配列長の6つの事前定義された定常領域；14nt部位特異的バーコードの2コピー（中央のプロトスペーサー配列の両側に1つずつ）；及び、2つの異なる11ntの固有分子識別子(UMI)（中央のプロトスペーサー配列の両側に1つずつ）を含む追加の配列により、最大で最終長さ約200ntまでパディングされた。UMIは、PCR増幅によるバイアスを補正するために使用され、バーコードは、分析中に各部位を明確に同定を可能にする。バーコードは、配列にCCもGGも含有しない668,420個のバーコードの初期リストから選択され、各バーコードは、他の任意のバーコードから2のハミング距離を有する。最終ライブラリーの設計には、カスタムPythonスクリプトを使用した。

【0278】

最終的なオリゴヌクレオチドライブラリーは、商業ベンダー(Agilent Technologies)で合成される。各ライブラリーはPCR増幅され、1.25×AMPure XPビーズ精製(Beckman Coulter)にかけられる。CutSmart緩衝液(New England Biolabs)中で

25℃で10分間インキュベートした後、769nMの組み換えABE8.8-mタンパク質及び1.54μMのgRNAを含むRNPを100ngの精製ライブラリーと混合し、37℃で8時間インキュベートする。RNP用量は、それが過飽和用量、すなわち、生化学的アッセイにおいて最大量のオンターゲット編集を達成する用量を超える用量であることを実証する分析から導出される。

【0279】

プロテイナーゼK (New England Biolabs)を加えて、37℃、45分間で反応を停止させ、続いて、2x AMPure XPビーズ精製を行う。次に、反応物をEndoV (New England Biolabs)と共に37℃で30分間、Klenow Fragment (New England Biolabs)と共に37℃で30分間、NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix (New England Biolabs)と共に20℃で30分間、続いて65℃で30分間、連続してインキュベートし、各インキュベーション後に2x AMPure XPビーズ精製を行った。反応物をアニーリングしたアダプターオリゴヌクレオチド二本鎖と20℃で1時間ライゲーションして、切断されたライブラリー産物のPCR増幅を促進し、続いて、2x AMPure XPビーズ精製を行う。ライゲーション反応物のサイズ選択を、PippinHTシステム (Sage Sciences) で実施して、3%のアガロースゲルカセット上で150~200bpのDNAを単離し、続いて、2ラウンドのPCR増幅を行って、バーコード付きライブラリーを生成し、これは、上述のように、Illumina MiSeqシステムでペアエンドシーケンシングを受ける。

【0280】

ONE-seq実験では、2つの切断産物が得られる。PROTO側は、切断位置の上流のオリゴヌクレオチドの一部が含まれ、PAM側は、切断位置の下流のオリゴヌクレオチドの一部を含む。ABE実験では、PROTO側のみが、編集活性(A→G置換)の情報を与え、従って、この側のみがシーケンシングされる。

【0281】

ペアエンドリードは、カスタムNexteraアダプター (PrefixPE/1: 5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' (配列番号30); PrefixPE/2: 5'-GTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3' (配列番号31); ファイルで指定されている通り) 及びパラメーター"ILLUMINACLIP:NEB_custom.fa:2:30:10:1:true LEADING:0 TRAILING:0 SLIDINGWINDOW:4:30 MINLEN:36"で、trimmomatic v 0.39 (Bolger et al., 2014)を用いて、シーケンシングアダプターをトリミングした。シーケンシング品質が低い実験(VOL014)の場合、これらのパラメーターを、"ILLUMINACLIP NEB_custom.fa:2:30:10:1:true LEADING:2 TRAILING:0 SLIDINGWINDOW:30:30 MINLEN:36"に設定した。次に、パラメーター「最大ミスマッチ密度=0.25 最大オーバーラップ=160」を用いるFLASH v1.2.11 (Magoc and Salzberg, 2011)を使用して、リードをマージした。各部位に固有の定常配列、バーコード、及びプロトスペーサー配列について、マージされたリードをスキャンして、編集ウィンドウでA→G置換の証拠のあるものにフィルタリングした(プロトスペーサーの最もPAM遠位の1~10位として定義)。重複したリードを破棄した。

【0282】

各部位について、編集済みリードの総数を、オンターゲット部位に割り当てられた編集済みリードの総数に正規化し、この比率は、部位のONE-seqスコアを定義する。部位を、ONE-seqスコアでランク付けし、スコアが0.001以上の部位を検証のために選択した。0.001以上のスコアには、オンターゲット部位の編集と比較して、生化学アッセイにおける編集活性が1000分の1まで低い部位が含まれる。この閾値は、細胞内で、100%オンターゲット編集がある場合、1/1000分未満の編集活性が、0.1%未満のオフターゲット編集に変換される(NGSによる編集検出の下限を下回る)という前提に基づいている。配列数が多いオリゴヌクレオチドは、in vitroでのCas9/gRNA切断の傾向が高いこと、従って、細胞におけるオフターゲット変異導入の可能性が高いことを反映している。

【0283】

10

20

30

40

50

ヒト初代肝細胞におけるオフターゲット編集について、いくつかのオフターゲット部位候補を分析した。表4は、MessengerMax試薬（Lipofectamine）により、初代ヒト肝細胞に、gRNA及び等量のin vitroで転写されたABE8.8 mRNA（分子量比1：1）で同時トランスフェクトされた細胞から、ガイドRNA GA457の47個のオフターゲット部位候補を検証した結果を示す。オンターゲット部位は、高い編集効率を示すが、全てのオフターゲット部位は、編集をほとんどから全く示さない（正味編集は0.4%未満）。

【表4-1】

表4. ヒト初代肝細胞における47個の潜在的なオフターゲット候補部位に対するGA457の検証

GA457		配列番号	%編集-ヒト初代肝細胞		
ID	配列(5'-3')		処置済み	未処置	正味
オンターゲット	GCCATCCTGCCAAGAATGAG	24	54.21	0.11	54.1
OT1	GCCATCCTACCAGGAATGAA	32	0.28	0.13	0.15
OT2	GCCATCTTGCCAAGAAAAAG	33	0.12	0.09	0.03
OT3	GCCATACCTGCCATGAATGAG	34	0.2	0.19	0.01
OT4	GCCATCCTGACAGGAATGAG	35	0.24	0.38	-0.14
OT5	ACCATCCTGCAAAGAATGAT	36	0.18	0.24	-0.06
OT6	GCCATCCAATAAGAATGAG	37	0.69	0.32	0.37
OT7	GCCATCCTGACAAGTATGAG	38	0.29	0.22	0.07
OT8	CCATACCTGCCAAGAATGAA	39	0.18	0.15	0.03
OT9	TGCATCCTGCCAAAAATGGG	40	0.06	0.08	-0.02
OT10	TGCATCCTGCCAAGAAGAAG	41	0.06	0.08	-0.02
OT11	GCCATCCTCCAAGAATGCT	42	0.13	0.13	0
OT12	GCCATCTGCAAGAAGGAG	43	0.11	0.19	-0.08
OT13	GCCATCCTATCAAGAATAAA	44	0.22	0.2	0.02
OT14	TCCATCCTGTAAGAATGAG	45	0.03	0.05	-0.02
OT15	GGCCATCTGCCAAGAAGGAT	46	0.12	0.13	-0.01
OT16	ACCATCCTGCCAGCAATGTG	47	0.17	0.12	0.05
OT17	TCCATCCTACTAAGAATGAG	48	0.11	0.13	-0.02
OT18	GGTATCCTGCCAAGAATGGA	49	0.09	0.1	-0.01
OT19	TCCATCCTGCCAAGAATTGC	50	0.14	0.07	0.07
OT20	GCCATCTGCAAGAATGAG	51	0.15	0.18	-0.03
OT21	GCCATCCTGCAAATATGAG	52	0.04	0.07	-0.03
OT22	ACCATCCTGTCAAGAATCAA	53	0.2	0.15	0.05
OT23	GCCATACTAACAAGAATGAG	54	0.25	0.23	0.02
OT24	GTGATCCTGCCAGGAATAAG	55	0.08	0.11	-0.03
OT25	GCCATCAAGCAAGAATGAG	56	0.3	0.27	0.03
OT26	GCCATCCTCACAAGTATGAG	57	0.19	0.22	-0.03
OT27	ACCATCCAGCAAGAATGAG	58	0.43	0.32	0.11
OT28	GCCATATGCCAAAAAGGAG	59	0.24	0.24	0
OT29	GACATCCTGTCAAGGATCAG	60	0.21	0.16	0.05
OT30	GCCATAGCCAAAAATGAA	61	0.18	0.27	-0.09
OT31	GCCATAAGCCAAAGAATGAC	62	0.09	0	0.09

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

OT32	GCCATCCTAACAAGTATGAG	63	0.25	0.45	-0.2
OT33	CATATCCTGCCAGAATGAG	64	0.15	0.21	-0.06
OT34	TACATCCTACCAAGGAATCA G	65	0.29	0.26	0.03
OT35	CCCATCCTGCCAAGAAGTGT	66	0.08	0.06	0.02
OT36	GCCATCCTACAAAAATGAG	67	0.16	0.21	-0.05
OT37	GTCATCCTGCCAGGAATGAA	68	0.09	0.07	0.02
OT38	GCCATATCTGCCAAGAATGC G	69	0.16	0.16	0
OT39	TCCATCCTGTCAAGAATGTG	70	0.05	0.04	0.01
OT40	TCCATCCTCCAGAATGAG	71	0.07	0.08	-0.01
OT41	GCCATGCTGCCAAGAATGAT	72	0.15	0.16	-0.01
OT42	GCTATCCTGCCAGAATGAG	73	0.07	0.07	0
OT43	TGCATCCTGACAAGAAATAG	74	0.34	0.24	0.1
OT44	TCCATAGCCAAGAATGAG	75	0.43	0.27	0.16
OT45	ACCATCTGTCAAGAATGAG	76	0.26	0.21	0.05
OT46	GCCATCCCGCCAGGAATTAT	77	0.08	0.07	0.01
OT47	ACCATCCTTCCAAGAAGATG	78	0.14	0.12	0.02

【0284】

GA459、GA460、及びGA461も、それぞれ表5、6、及び7に示されるように、オフターゲット編集について同様に評価された。各ガイドのオンターゲット部位が、対照群と比較して処置群で高い編集効率を示すが、オフターゲット部位候補でのオフターゲット編集はほとんどから全く観察されない。

【表 5】

表5. ヒト初代肝細胞の6つの潜在的なオフターゲット候補部位に対するGA459の検証

GA459		合計編集率(%)-ヒト初代肝細胞				
ID	配列(5'-3')	処置 rep 1	処置 rep 2	未処置 rep 1	未処置 rep 2	未処置 rep 3
オン タ ー ゲ ッ ト	GCAACTTACCCAGAG GCAAA (配列番号25)	14.17	14.29	0.67	0.57	0.73
OT1	ACAAATTACCCAGAGG AAAA (配列番号79)	1.19	1.25	1.31	1.28	1.27
OT3	TCAACTTACCCAGAGT CAAA (配列番号80)	0.98	0.82	0.63	0.68	0.8
OT4	GCAACTTGCCCAGAG GCACA (配列番号81)	0.92	1.07	0.87	0.99	0.79
OT5	GCAACATACCCAGTGG CAAA (配列番号82)	1.07	0.91	0.87	0.86	0.92
OT6	GCAGCCTACCCAGAG GCAAA (配列番号83)	1.02	1.1	0.97	1	1.05
OT7	GCAACTCCCCCAGAG GCAAA (配列番号84)	1.45	1.4	1.25	1.13	1.37

【表 6】

表6. ヒト初代肝細胞の3つの潜在的なオフターゲット候補部位に対するGA460の検証

GA460		合計編集率(%)-ヒト初代肝細胞				
ID	配列(5'-3')	処置 rep 1	処置 rep 2	未処置 rep 1	未処置 rep 2	未処置 rep 3
オン タ ー ゲ ッ ト	TATAGGAAAACCACT GAGTC (配列番号26)	76.4	74.3	1.54	1.17	1.41
OT1	TAGAGGAAAACCACT CAGTC (配列番号85)	1.44	1.6	1.51	1.35	1.61
OT2	CATAGGAAAACCACT GAGTT (配列番号86)	5.67	6.6	1.18	0.98	1.24
OT3	TAAAGGAAAACCACT GGGTC (配列番号87)	1.26	1.29	1.31	1.02	1.53

【表 7】

表7. ヒト初代肝細胞の4つの潜在的なオフターゲット候補部位に対するGA461の検証

GA461		合計編集率(%)-ヒト初代肝細胞				
ID	配列(5'-3')	処置 rep 1	処置 rep 2	未処置 rep 1	未処置 rep 2	未処置 rep 3
オン ター ゲッ ト	TACTCACCTCTGCATGCTC A (配列番号27)	ND	58.9	0.39	0.37	0.35
OT1	TACACAACCTGTGCATGCTC A (配列番号88)	0.93	0.95	0.89	0.86	0.82
OT2	TATTCACCTCTGCATGCTCT (配列番号89)	0.17	0.18	0.23	0.16	0.2
OT3	TACTTACCTCTGCTTGCTCA (配列番号90)	0.28	0.35	0.28	0.23	0.34
OT4	TACACACCTCTACATGCTC A (配列番号91)	0.67	0.94	0.75	0.62	ND

【0285】

表8は、GA457ガイドを用いるオフターゲット編集のいくつかの結果を提供する。

【0286】

表9は、GA460ガイドを用いるオフターゲット編集のいくつかの結果を提供する。

【0287】

表10は、GA461ガイドを用いるオフターゲット編集のいくつかの結果を提供する。

【0288】

表4、6、7、8、9、及び10に提示される結果は、本明細書に提供される教示に従って達成され得る結果を代表するものであると理解されるべきである。本発明によるTTR遺伝子を編集するための組成物は、表4、6、7、8、9、もしくは10に記載の、または、GA457、460、もしくは461に関して考察された活性とは異なる総オフターゲット編集活性を生じ得る。例えば、組成物は、表4、6、7、8、9、または10に記載の、またはGA457、460、もしくは461に関して考察された1つ以上のオフターゲット部位について、表4、6、7、8、9、もしくは10に記載の、またはGA457、460、もしくは461に関して考察された活性と、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または100%以上異なる総オフターゲット編集活性を生じ得る。いくつかの実施形態では、組成物は、表4、6、7、8、9、もしくは10に記載の、またはGA457、460、もしくは461に関して考察された1つ以上の部位について、表4、6、7、8、9、もしくは10に記載の、またはGA457、460、もしくは461に関して考察された活性の100%以内、90%以内、80%以内、70%以内、60%以内、50%以内、40%以内、30%以上以内、20%以上以内、または10%以内である総オフターゲット編集活性を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、表4、6、7、8、9、もしくは10に記載の、またはGA457、460、もしくは461に関して考察された1つ以上の部位について、表4、6、7、8、9、もしくは10に記載の、またはGA457、460もしくは461に関して考察された活性以下のオフターゲット編集活性を生じる。いくつかの実施形態では、組成物は、表4、6、7、8、9、もしくは10に記載の、またはGA457、460、も

しくは461に関して考察された1つ以上の部位について、オフターゲット編集活性を生じない。

【表 8】

表8. いくつかのGA457候補オフターゲット部位

染色体	位置	配列(5'-3')	配列番号	アラインメント
1	214915487	TGCATCCTGCCAAAAATGGGGAG	92	X50
2	162088240	GCCATCTTGCCAAGAAAAAGGGG	161	X30
3	143033429	AACATCCTGCAAGAATAAGAAG	255	RNA41
4	148246005	GCCATCCAATAAGAATGAGTGG	314	RNA31
5	171975758	GTCATCCTGCCAAAATAAGGAGG	381	X60
6	11558428	CCCATACAGCCAAGAATGAGAAA	443	X50
7	136711066	TCCATCCTACTAAGAATGAGGAG	490	X40
8	64649745	ACCATCCTGACAAGTGTGAGGCA	601	X60
9	13461786	GTGATCCTGCCAGGAATAAGGAG	602	X50
10	84701101	GCCACCCTCCAAGGATCTGAGG	682	RNA41
11	36962784	GCCATACTAACAAGAATGAGGTG	683	X40
12	18423002	GCCATCCTCAAGAATGGGAAA	774	RNA32
13	109466404	ACCATCCTGTCAAGAATCAAGAG	775	X50
14	43842189	GCCAACCTGACAAATGTGAGG	842	RNA32
15	38417527	ACCATCCTTCCAAGAAGATGGGG	843	X50
16	19426632	GCCATCCAGCCAAGCAAGAAGGG	890	X40
17	42774058	GTCATCACTGCCAAGAACAAGAG G	891	DNA31
18	6852692	GCCATCCTGTAAGAATAAGGAT	941	RNA41
19	55221349	ACCATCCTGCCAGCAATGTGAGG	942	X40
20	56309168	TCCATCCTGAAGAATGAATAG	986	RNA32
21	40793316	GCCATATCTGCCAAGAATGCGGAG	987	DNA31
22	34535097	GATATCCTCACAAGAATGAGTGA	1009	X50
X	54383781	GCTCTACTGCCAAGAAAGTGG	1068	RNA32
Y	6961334	GCCATCCACCAAGAAAGCGGAG	331	RNA41

【0289】

GA457オフターゲット部位の追加例は、2022年3月21日に出願された米国仮特許出願第63/322,182号に提示される。GA457のオフターゲット部位は、配列番号92～1073のいずれか1つを含んでもよい。

10

20

30

40

50

【表 9】

表9. いくつかのGA460候補オフターゲット部位

染色体	位置	配列	配列 番号	アラインメン ト
1	114689517	TATAAGAAAACCAGTGTCTCTGG	1074	X30
2	165173430	TATAGTGAACCAGTGAGGCAGG	1280	RNA31
3	56975861	TGTAGAAAAACCAGTGAATAAGA	1525	X50
4	175627437	GATAGGAAAACCATGAGGGGGT	1892	RNA41
5	115033087	TATAGGAAACCAATGAGTGCTG	1893	RNA31
6	132497708	TATAGGTAAACCAGAGTAGGC	2232	RNA32
7	40539970	AGTAGGAAAACCAGTATATAGGG	2233	X60
8	77342779	AATAGGAAAACCATTTTCAGG	2494	RNA32
9	73825991	AATAGGAAAACCAGTAAAATAGG	2495	X50
10	112702031	CATACGAAGTCCATGAGTCAGG	2724	RNA41
11	60264073	ATATGGAAAACCAGAGAATCAGG	2725	X60
12	103497054	GATAGAAACACCATGAATCAGG	2957	RNA41
13	31477698	TATATGAAACCAGTAAGTTTGG	2958	RNA31
14	91758013	TATAGGTGTAAACCAGTGTGCCTA G	3137	DNA42
15	28238271	TATAGGAGAAACAGTGAATAGGA	3138	X50
16	74819495	AAAATGTAAACCAGTAAGCCCGG	3289	X60
17	44943044	TGTAGGAAGAACCAGTGGATCGG G	3290	DNA31
18	1915908	AAAAGGAAAGCCAGTGACCTGG	3410	RNA41
19	44246762	AAATAGAAAACCAGTAAGTCATG	3411	X60
20	24558049	TATAGGAAAACAGGAACTCTGG	3517	RNA31
21	13185396	TATAATAAAACCAGTGATAAGGG	3518	X50
22	38987774	TGTAGGAAAACATATGATCAGG	3574	RNA41
X	134161037	AATAGGATAACCAGTCAGTAGGG	3575	X40
Y	15254846	TATAACATAACCAATAGGTCAGG	3725	X60

【0290】

GA460オフターゲット部位の追加例は、2022年3月21日に出願された米国仮特許出願第63/322,182号に提示される。GA460のオフターゲット部位は、配列番号1074～3725のいずれか1つを含んでもよい。

10

20

30

40

50

【表 10】

表10. いくつかのGA461候補オフターゲット部位

染色体	位置	配列(5'-3')	配列 番号	アラインメント
1	110474222	TACTCACCTCTACATGCTCAGTG	3726	X20
2	136311439	TACAGCACCTCTGCATTGCCAGGG	4071	DNA41
3	159697502	TATTCACCTCTGCATCTCCAGGG	4072	X40
4	3846305	CTCTCACCTCTGCATGACAAGC	4326	RNA41
5	174698295	TACTCACAATGCATGCTAAAGG	4327	RNA31
6	31933576	TACTCACCTCTGCCTTCCTTTGT	4551	X60
7	53373361	TTATCACCTCTGCATGTTTCAGGG	4552	RNA31
8	77161406	TACTGACCTTTCCATCTCACTG	4760	RNA41
9	101247864	TACTCACTCAGCATGTTTCAGAG	4761	RNA31
10	4684859	GAATAACCTCTGATGGTCAAGG	4945	RNA41
11	85210644	TATTCACCTCTGCATGCTCTGAG	4946	X30
12	117261587	TATTCAGCAATGCATGTCAAGG	5116	RNA41
13	94452599	TACTTACCTTACATGTTCAAGG	5117	RNA31
14	64054638	TACTCAACTCTGCTGCTATAGC	5243	RNA41
15	95108931	TACTCAACTCTGCTGCTCTAGG	4450	RNA21
16	56094894	TACTAACCTTGCCAGCTGAGGG	5360	RNA41
17	71161191	TGCTCACCCACATGCTCATGG	5361	RNA31
18	3284286	TTTTCTACTCTGCATAATCATGG	5473	X60
19	45241812	ACCTCACCTCTGCCTGCTCTGGG	5474	X40
20	13122061	TACTCAACTGCATTCTCAGGG	5580	RNA22
21	45735600	CACTCACACTACATGCTCTTGG	5581	RNA41
22	20392740	TCCACACCTCTCGGCAAGCTGAGG G	5645	DNA42
X	39842774	TATATACCTCTGCATGTTTCAGAG	5646	X50
Y	20738820	TAGACACATAAGCATGCTCACAG	5741	X60

【0291】

GA461オフターゲット部位の追加例は、2022年3月21日に出願された米国仮特許出願第63/322,182号に提示される。GA461のオフターゲット部位は、配列番号3726～5745のいずれか1つを含んでもよい。

10

20

30

40

50

【表 11 - 1】

表11. ABEバリエント配列

MA004 mRNA及びタンパク質配列		
領域	配列	
全配列	mRNA	Au'GAGCGAGGu'GGAGu'u'CAGCCACGAGu'ACu'GGAu'GCGGCA CGCCCu'GACCCu'GGCCAAGCGGGCCCGGGACGAGCGGGAGGu' GCCCGu'GGGCGCCGu'GGu'GGu'GGu'GAACAACCGGGu'GAu'CG GCGAGGGGu'GGAACCGGGCCAu'CGGCCu'GCACGACCCACCG CCCACGCCGAGAu'CAu'GGCCCu'GCGGCAGGGCGGCCu'GGu'G Au'GCAGAACu'ACCGGGu'GAu'CGACGCCACCCu'Gu'ACGu'GAC Cu'u'CGAGCCCu'GCGu'GAu'Gu'GCGCCGGCGCCAu'GAu'CCACA GCCGGAu'CGGCCGGGu'GGu'Gu'u'CGGCGu'GCGGAACGCCAAG ACCGGCGCCCGCGCAGCCu'GAu'GGACGu'GGu'GCACCACCC GGCAu'GAACCACCGGGu'GGAGAu'CACCGAGGGCAu'CCu'GGC CGACGAGu'GCGCCGCCCu'GGu'Gu'GCCGGu'u'Cu'u'CCGGAu'GC CCGGGCGGGu'Gu'u'CAACGCCCAGAAGAAGGCCCAGAGCAGC ACCGACAGGAAu'AAGAGAGAAAAGAAGAGu'AAGAAGAAu' Au'AAGAGCCACCAGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCAGCAGCGGC AGCGAGACACCCGGCACCAGCGAGAGCGCCACCCCGAGAGC AGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCAGCGACAAGAAGu'ACAGCAu' CGGCCu'GGCCAu'CGGCACCAACAGCGu'GGGGu'GGGCCGu'GAu 'CACCGACGAGu'ACAAGGu'GCCCAGCAAGAAGu'u'CAAGGu'GC u'GGGCAACACCGACCGGCACAGCAu'CAAGAAGAACCu'GAu'C GGCGCCCu'GGu'Gu'u'CGACAGCGCGAGACAGCCGAGGCCACC CGGGu'GAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGu'ACACCGGCGGAAG AACCGGAu'Cu'GGu'ACCu'GCAGGAGAu'Cu'u'CAGCAACGAGAu' GGCCAAGGu'GGACGACAGCu'u'Cu'u'CCACCGGGu'GGAGGAGA GGu'u'CCu'GGu'GGAGGAGGACAAGAAGCAGAGCGGCACCCC Au'Cu'u'CGGCAACu'CGu'GGACGAGGu'GGCCu'ACCACGAGAA Gu'ACCCACCAu'Cu'ACCACCu'GCGGAAGAAGCu'GGu'GGACA GCACCGACAAGGCCGACCu'GCGGGu'GAu'Cu'ACCu'GGCCCu'G GCCCACAu'GAu'CAAGu'u'CCGGGGCCACu'u'CCu'GAu'CGAGGG CGACCu'GAACCCCGACAACAGCGACGu'GGACAAGCu'Gu'u'CAu 'CCAGCu'GGu'GCAGACCu'ACAACCAGCu'Gu'u'CGAGGAGAACC CCAu'CAACGCCAGCGGCGu'GGACGCCAAGGCCAu'CCu'GAGCG CCGGGu'GAGCAAGAGCCGGCGGGu'GGAGAACCu'GAu'CGCC CAGCu'GCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCu'Gu'u'CGGCAACCu' GAu'CGCCCu'GAGCCu'GGGCCu'GACCCCAACu'u'CAAGAGCA ACu'u'CGACCu'GGCCGAGGACGCCAAGCu'GCAGCu'GAGCAAG GACACCu'ACGACGACGACCu'GGACAACCu'GGu'GGCCAGAu' CGGCGACCAGu'ACGCCGAC

10

20

30

40

50

0

20

30

40

50

【表 1 1 - 3】

	GGCCGGGACAu'Gu'ACGu'GGACCAGGAGCu'GGACAu'CAACCG GCu'GAGCGACu'ACGACGu'GGACCACAu'CGu'GCCCCAGAGCu' u'CCu'GAAGGACGACAGCAu'CGACAACAAGGu'GCu'GACCCGG AGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGu'GCCCAGCGAG GAGGu'GGu'GAAGAAGAu'GAAGAACu'ACu'GGCGGCAGCu'GCu 'GAACGCCAAGCu'GAu'CACCCAGCGGAAGu'u'CGACAACCu'GA CCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCu'GAGCGAGCu'GGACAAGGCC GGCu'u'CAu'CAAGCGGCAGCu'GGu'GGAGACACGGCAGAu'CAC CAAGCACGu'GGCCCAGAu'CCu'GGACAGCCGGAu'GAACACCA AGu'ACGACGAGAACGACAAGCu'GAu'CCGGGAGGu'GAAGGu'G Au'CACCCu'CAAGAGCAAGCu'GGu'GAGCGACu'u'CCGGAAGGA Cu'u'CCAGu'u'Cu'ACAAGGu'GCGGGAGAu'CAACAACu'ACCACC ACGCCCACGACGCCu'ACCu'GAACGCCGu'GGu'GGGCACCGCCC u'GAu'CAAGAAGu'ACCCCAAGCu'GGAGAGCGAGu'u'CGu'Gu'AC GGCGACu'ACAAGGu'Gu'ACGACGu'GCGGAAGAu'GAu'CGCCAA GAGCGAGCAGGAGAu'CGGCAAGGCCACCGCCAAGu'ACu'u'Cu' u'Cu'ACAGCAACAu'CAu'GAACu'u'Cu'u'CAAGACCGAGAu'CACC Cu'GGCCAACGGCGAGAu'CCGGAAGCGGCCCCu'GAu'CGAGAC AAACGGCGAGACAGGCGAGAu'CGu'Gu'GGGACAAGGGCCGGG ACu'u'CGCCACCGu'GCGGAAGGu'GCu'GAGCAu'GCCCCAGGu'G AACAu'CGu'GAAGAAGACCGAGGu'GCAGACCGGCGGCu'u'CAG CAAGGAGAGCAu'CCu'GCCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCu'GAu 'CGCCCGGAAGAAGGACu'GGGACCCCAAGAAGu'ACGGCGGCu' u' CGAC AGCCCCACCGu'GGCCu'ACAGCGu'GCu'GGu'GGu'GGCC AAGGu'GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCu'CAAGAGCGu'GAA GGAGCu'GCu'GGGCAu'CACCAu'CAu'GGAGCGGAGCAGCu'u'CG AGAAGAACCCCAu'CGACu'u'CCu'GGAGGCCAAGGGCu'ACAAG GAGGu'GAAGAAGGACCu'GAu'CAu'CAAGCu'GCCCCAAGu'ACAG CCu'Gu'u'CGAGCu'GGAGAACGGCCGGAAGCGGAu'GCu'GGCCA GCGCCGGCGAGCu'GCAGAAGGGCAACGAGCu'GGCCCu'GCCCCA GCAAGu'ACGu'GAACu'u'CCu'Gu'ACCu'GGCCAGCCACu'ACGAG AAGCu'GAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCu' Gu'u'CGu'GGAGCAGCACAAGCACu'ACCu'GGACGAGAu'CAu'CG AGCAGAu'CAGCGAGu'u'CAGCAAGCGGGu'GAu'CCu'GGCCGAC GCCAACCu'GGACAAGGu'GCu'GAGCGCCu'ACAACAAGCACCG GGACAAGCCCAu'CCGGGAGCAGGCCGAGAACAu'CAu'CCACCu 'Gu'u'CACCCu'GACCAACCu'GGGCGCCCCCGCCGCCu'u'CAAGu' ACu'u'CGACACCACCAu'CGACCGGAAGCGGu'ACACCAGCACCA AGGAGGu'GCu'GGACGCCACCCu'GAu'CCACCAGAGCAu'CACC GGCCu'Gu'ACGAGACACGGAu'CGACC
--	---

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 4】

		u'GAGCCAGCu'GGGCGGCGACGAGGGCGCCGACAAGCGGACCG CCGACGGCAGCGAGu'u'CGAGAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGG u'Gu'GAGCGGCCGCu'u'AAu'u'AAGCu'GCCu'u'Cu'GCGGGGCu'u'G CCu'u'Cu'GGCCAu'GCCCu'u'Cu'u'Cu'Cu'CCCu'u'GCACCu'Gu'ACCu 'Cu'u'GGu'Cu'u'u'GA Au'AAAGCCu'GAGu'AGGAAGu'Cu'AGA (配列 番号5746)
タンパク質		MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNRRVIGEG WNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVM CAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITE GILADECAALLCRFFRMPRRVFNAQKKAQSSTDSSGSSGGSSGSET PGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPS KKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRR KNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNI VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGH FLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS RLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED AKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILR VNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFD QSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLL RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTR IPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIE RMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKP AFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV EDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDRE MIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQS GKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLH EHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIAMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYL YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND KLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYF FYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR KVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKVKSKKLKSVKELLGITIMERSSE KNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLENGRKRMLASAGELQ KGNELALPSKYVNFLYLASHYEKCLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYL DEIIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAY

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 5】

		NKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTK EVLDATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGDEGADKRTADGSEFESPKK KRV (配列番号5747)
5' UTR	mRNA	AGGAAAu'AAGAGAGAAAAGAAGAGu'AAGAAGAAAu'Au'AAG AGCCACC (配列番号5748)
TadA	mRNA	Au'GAGCGAGGu'GGAGu'u'CAGCCACGAGu'ACu'GGAu'GCGGCA CGCCCu'GACCCu'GGCCAAGCGGGCCCGGGACGAGCGGGAGGu' GCCCCu'GGGCGCCGu'GCu'GGu'GCu'GAACAACCGGGu'GAu'CG GCGAGGGCu'GGAACCGGGCCAu'CGGCCu'GCACGACCCACCG CCCACGCCGAGAu'CAu'GGCCCu'GCGGCAGGGCGGCCu'GGu'G Au'GCAGAAcu'ACCGGCu'GAu'CGACGCCACCCu'Gu'ACGu'GAC Cu'u'CGAGCCCu'GCGu'GAu'Gu'GCGCCGGCGCCAu'GAu'CCACA GCCGGAu'CGGCCGGGu'GGu'Gu'u'CGCGGu'GCCGAACGCCAAG ACCGGCGCCGCCGGCAGCCu'GAu'GGACGu'GCu'GCACCACCCC GGCAu'GAACCACCGGGu'GGAGAu'CACCGAGGGCAu'CCu'GGC CGACGAGu'GCGCCGCCCu'GCu'Gu'GCCGGu'u'Cu'u'CCGGAu'GC CCCGGCGGGu'Gu'u'CAACGCCCAGAAGAAGGCCCAGAGCAGC ACCGAC (配列番号5749)
	タンパク質	MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGE GWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPC VMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRV EITEGILADECAALLCRFFRMPRRVFNAQKKAQSSTD (配列番号 5750)
TadA と Cas9 ニ ッ カー ゼ 間 の リンカ ー	mRNA	AGCGGCGGCAGCAGCGGGCGGCAGCAGCGGCAGCGAGACACCC GGCACCAGCGAGAGCGCCACCCCGAGAGCAGCGGCGGCAGC AGCGGCGGCAGC (配列番号5751)
	タンパク質	SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS (配列番号5752)
Cas9 ニ ッ カー ゼ	mRNA	GACAAGAAGu'ACAGCAu'CGGCCu'GGCCAu'CGGCACCAACAG CGu'GGGCu'GGGCCGu'GAu'CACCGACGAGu'ACAAGGu'GCCCA GCAAGAAGu'u'CAAGGu'GCu'GGGCAACACCGACCGGCACAGC Au'CAAGAAGAACCu'GAu'CGGCGCCCu'GCu'Gu'u'CGACAGCGG CGAGACAGCCGAGGCCACCCGGCu'GAAGCGGACCGCCCGGCG GCGGu'ACACCCGGCGGAAGAACCGGAu'Cu'GCu'ACCu'GCAGG AGAu'Cu'u'CAGCAACGAGAu'GGCCAAGGu'GGACGACAGCu'u'C u'u'CCACCGGCu'GGAGGAGAGCu'u'CCu'GGu'GGAGGAGGACAA GAAGCACGAGCGGCACCCCAu'Cu'u'CGGCAACAu'CGu'GGACG AGGu'GGCCu'ACCACGAGAAGu'ACCCACCAu'Cu'ACCACCu'G CGGAAGAAGCu'GGu'GGACAGCACCGACAAGGCCGACCu'GCG GCu'GAu'Cu'ACCu'GGCCCu'GGCCACAu'GAu'CAAGu'u'CCGGG GCCACu'u'CCu'GAu'

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 6】

	CGAGGGCGACCu'GAACCCCGACAACAGCGACGu'GGACAAGCu' Gu'u'CAu'CCAGCu'GGu'GCAGACCu'ACAACCAGCu'Gu'u'CGAGGA GAACCCCAu'CAACGCCAGCGGCGu'GGACGCCAAGGCCAu'CCu' GAGCGCCCGGCu'GAGCAAGAGCCGGCGGCu'GGAGAACCu'GAu' CGCCCAGCu'GCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCu'Gu'u'CGGCAA CCu'GAu'CGCCCu'GAGCCu'GGGCCu'GACCCCAACu'u'CAAGAG CAACu'u'CGACCu'GGCCGAGGACGCCAAGCu'GCAGCu'GAGCAA GGACACCu'ACGACGACGACCu'GGACAACCu'GCu'GGCCCAGAu' CGGCGACCAGu'ACGCCGACCu'Gu'u'CCu'GGCCGCCAAGAACCu' GAGCGACGCCAu'CCu'GCu'GAGCGACAu'CCu'GCGGGu'GAACAC CGAGAu'CACCAAGGCCCCCu'GAGCGCCAGCAu'GAu'CAAGCG Gu'ACGACGAGCACCACCAGGACCu'GACCCu'GCu'GAAGGCCCu' GGu'GCGGCAGCAGCu'GCCCCGAGAAGu'ACAAGGAGAu'Cu'u'Cu'u' CGACCAGAGCAAGAACGGCu'ACGCCGGCu'ACAu'CGACGGCGG CGCCAGCCAGGAGGAGu'u'Cu'ACAAGu'u'CAu'CAAGCCCAu'CCu' GGAGAAGAu'GGACGGCACCGAGGAGCu'GCu'GGu'GAAGCu'GAA CCGGGAGGACCu'GCu'GCGGAAGCAGCGGACCu'u'CGACAACGG CAGCAu'CCCCACCAGAu'CCACCu'GGGCGAGCu'GCACGCCAu'C Cu'GCGGCGGCAGGAGGACu'u'Cu'ACCCCu'u'CCu'GAAGGACAAC CGGGAGAAGAu'CGAGAAGAu'CCu'GACCu'u'CCGGAu'CCCu'AC u'ACGu'GGGCCCCCu'GGCCCGGGGCAACAGCCGGu'u'CGCCu'GG Au'GACCCGCAAGAGCGAGGAGACAAu'CACCCCu'GGAACu'u'C GAGGAGGu'GGu'GGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCu'u'CAu'C GAGCGGAu'GACCAACu'u'CGACAAGAACCu'GCCCCAACGAGAAG Gu'GCu'GCCCCAAGCACAGCCu'GCu'Gu'ACGAGu'ACu'u'CACCGu'G u'ACAACGAGCu'GACCAAGGu'GAAGu'ACGu'GACCGAGGGCAu'G CGGAAGCCCGCCu'u'CCu'GAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAu'C Gu'GGACCu'GCu'Gu'u'CAAGACCAACCGGAAGGu'GACCGu'GAAG CAGCu'GAAGGAGGACu'ACu'u'CAAGAAGAu'CGAGu'GCu'u'CGA CAGCGu'GGAGAu'CAGCGGCGu'GGAGGACCGGu'u'CAACGCCAG CCu'GGGCACCu'ACCACGACCu'GCu'GAAGAu'CAu'CAAGGACAA GGACu'u'CCu'GGACAACGAGGAGAACGAGGACAu'CCu'GGAGGA CAu'CGu'GCu'GACCCu'GACCCu'Gu'u'CGAGGACCGGGAGAu'GAu' CGAGGAGCGGCu'GAAGACCu'ACGCCACCu'Gu'u'CGACGACAA GGu'GAu'GAAGCAGCu'GAAGCGGCGGCGGu'ACACCGGCu'GGGG CCGGCu'GAGCCGGAAGCu'GAu'CAACGGCAu'CCGGGACAAGCA GAGCGGCAAGACCAu'CCu'GGACu'u'CCu'CAAGAGCGACGGCu'u' CGCCAAC<u>CGG</u>AACu'u'CAu'GCAGCu'GAu'CCACGACGACAGCCu' GACCu'u'CAAGGAGGACAu'CCAGAAGGCCAG	10 20 30 40 50
--	--	---

【表 1 1 - 7】

	Gu'GAGCGGCCAGGGCGACAGCCu'GCACGAGCACAu'CGCCAAC Cu'GGCCGGCAGCCCCGCCAu'CAAGAAGGGCAu'CCu'GCAGACC Gu'GAAGGu'GGu'GGACGAGCu'GGu'GAAGGu'GAu'GGGCCGGC ACAAGCCCGAGAACAu'CGu'GAu'CGAGAu'GGCCCGGGAGAAC CAGACCACCCAGAAGGGGCCAGAAGAAGAGCCGGGAGCGGAu'G AAGCGGAu'CGAGGAGGGCAu'CAAGGAGCu'GGGCAGCCAGAu' CCu'GAAGGAGCACCCCGu'GGAGAACACCCAGCu'GCAGAACG AGAAGCu'Gu'ACCu'Gu'ACu'ACCu'GCAGAACGGCCCGGGACAu'G u'ACGu'GGACCAGGAGCu'GGACAu'CAACCGGCu'GAGCGACu'A CGACGu'GGACCACAu'CGu'GCCCCAGAGCu'u'CCu'GAAGGACG ACAGCAu'CGACAACAAGGu'GGu'GACCCGGAGCGACAAGAAG CGGGGCAAGAGCGACAACGu'GCCCAGCGAGGAGGu'GGu'GAA GAAGAu'GAAGAACu'ACu'GGCGGCAGCu'GGu'GAACGCCAAGC u'GAu'CACCCAGCGGAAGu'u'CGACAACCu'GACCAAGGCCGAG CGGGGCGGCCu'GAGCGAGCu'GGACAAGGCCGGCu'u'CAu'CAA GCGGCAGCu'GGu'GGAGACACGGCAGAu'CACCAAGCACGu'GG CCCAGAu'CCu'GGACAGCCGGAu'GAACACCAAGu'ACGACGAG AACGACAAGCu'GAu'CCGGGAGGu'GAAGGu'GAu'CACCCu'CAA GAGCAAGCu'GGu'GAGCGACu'u'CCGGAAGGACu'u'CCAGu'u'Cu' ACAAGGu'GCGGGAGAu'CAACAACu'ACCACCAGCCCCACGACG CCu'ACCu'GAACGCCGu'GGu'GGGCACCGCCCu'GAu'CAAGAAG u'ACCCCAAGCu'GGAGAGCGAGu'u'CGu'Gu'ACGGCGACu'ACAA GGu'Gu'ACGACGu'GCGGAAGAu'GAu'CGCCAAGAGCGAGCAGG AGAu'CGGCAAGGCCACCGCCAAGu'ACu'u'Cu'u'Cu'ACAGCAAC Au'CAu'GAACu'u'Cu'u'CAAGACCGAGAu'CACCCu'GGCCAACGG CGAGAu'CCGGAAGCGGCCCCu'GAu'CGAGACAAACGGCGAGA CAGGCGAGAu'CGu'Gu'GGGACAAGGGCCGGGACu'u'CGCCACC Gu'GCGGAAGGu'GGu'GAGCAu'GCCCCAGGu'GAACAu'CGu'GAA GAAGACCGAGGu'GCAGACCGGCGGCu'u'CAGCAAGGAGAGCA u'CCu'GCCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCu'GAu'CGCCCGGAAG AAGGACu'GGGACCCCAAGAAGu'ACGGCGGCu'u'CGACAGCCC CACCGu'GGCCu'ACAGCGu'GGu'GGu'GGu'GGCCAAGGu'GGAGA AGGGCAAGAGCAAGAAGCu'CAAGAGCGu'GAAGGAGCu'GGu'G GGCAu'CACCAu'CAu'GGAGCGGAGCAGCu'u'CGAGAAGAACCC CAu'CGACu'u'CCu'GGAGGCCAAGGGCu'ACAAGGAGGu'GAAGA AGGACCu'GAu'CAu'CAAGCu'GCCCCAAGu'ACAGCCu'Gu'u'CGAG Cu'GGAGAACGGCCGGAAGCGGAu'GGu'GGCCAGCGCCGGCGA GGu'GCAGAAGGGCAACGAGCu'GGCCCu'GCCCAGCAAGu'ACGu 'GAACu'u'CCu'Gu'ACCu'GGCCAGCCACu'ACGAGAAGCu'GAAGG GCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCu'	10
		20
		30
		40

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

【表 11-9】

		DANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFD TTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDL SQLGGD (配列番号5754)
Cas9 ニッカーゼとNLS間のリンカー	mRNA	GAGGGCGCCGAC (配列番号5755)
	タンパク質	EGAD (配列番号5756)
核局在化配列(NLS)	mRNA	AAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGu'u'CGAGAGCCCCAAGAAG AAGCGGAAGGu'Gu'GA (配列番号5757)
	タンパク質	KRTADGSEFESPKKKRKV (配列番号5758)
3' UTR	mRNA	GCGGCCGGu'u'AAu'u'AAGCu'GCCu'u'Cu'GCGGGGGu'u'GCCu'u'Cu'GGCCAu'GCCCu'u'Cu'u'Cu'Cu'CCCu'u'GCACCu'Gu'ACCu'Cu'u'GGu'Cu'u'u'GAAu'AAAGCCu'GAGu'AGGAAGu'Cu'AGA (配列番号5759)
nCas9構成成分のアミノ酸位置691及び1135における変異と、それらの対応するヌクレオチド配列は、太字及び下線で示される。 u' : N ¹ -メチルプソイドウリジン 5' UTRの最初のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾を有する。		

10

20

【0292】

他のABEバリエーションが、ヒトTTR遺伝子を編集するために用いられ得る。そのようなABEバリエーションの例は、2021年4月9日に出版され、BASE EDITING OF PCSK9 AND METHODS OF USING SAME FOR TREATMENT OF DISEASEと題され、Verve Therapeutics, Inc.が出版人として指定される国際特許出願第PCT/US21/26729号に記載されている。

30

【0293】

実施例 3

TTR遺伝子のin vivo非ヒト霊長類(NHP)塩基編集

この実施例では、上記のヒトGA457及びGA460 sgRNAに対応するNHPサロゲートsgRNA (GA519及びGA520)を調製し、上述のABE8.8 mRNAと共に製剤化し、脂質ナノ粒子(LNP)にカプセル化し、NHPに静脈内投与した。この研究は、2つの異なる態様を含んでいた。

【0294】

NHPのin vivo研究の最初の態様は、LNP1及びLNP2の評価を含み、これらは、LNP2がGA520及びABE8.8 mRNAをカプセル化するように製剤化されるが、LNP1がGA519及びABE8.8 mRNAをカプセル化するように製剤化されるという点でのみ異なっていた。研究の2番目の態様は、第3のLNP (LNP3) の製剤化及び評価を含んでいた。LNP1と同様に、GA519及びABE8.8 mRNAをカプセル化するように、LNP3を製剤化した。しかし、LNP3は、LNP3がGalNAc部分成分を含んでいたという点で、LNP1とは異なっていた。研究の各態様では、以下でさらに詳細に説明され、添付の図に示されるように、塩基編集効率、TTRタンパク質発現、安全性プロファイル、及び薬物動態を、NHPの注入後に複数回評価した。

40

【0295】

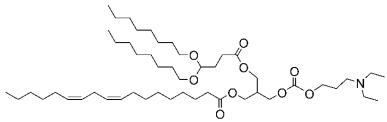
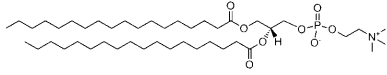
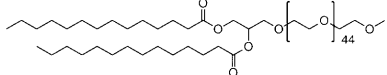
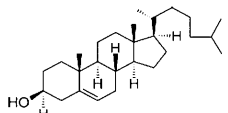
50

パートA：非GalNAc LNPを使用したGA519及びGA520のin vivo NHP評価
LNPの調製

NHP研究のこの最初の態様では、2つのLNP（LNP1及びLNP2）を製剤化し、LNP1にGA519及びABE8.8 mRNAをカプセル化して、LNP2は、GA520及びABE8.8 mRNAをカプセル化した。それぞれのLNPの成分は、以下の表12に記載されるように、且つそれに示される比率で、イオン化可能アミノ脂質（iLipid）、中性ヘルパー脂質、PEG脂質、及びステロール脂質で構成される。

【表 1 2】

表12. LNP1/LNP2構成成分

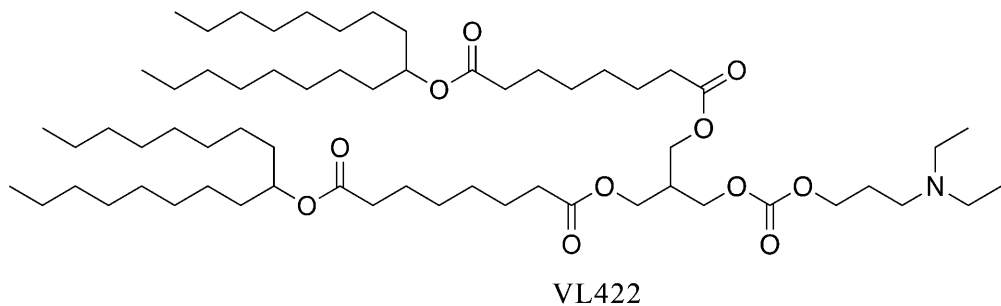
LNP構成成分	脂質の名称	脂質の構造	モル %
アミノ脂質 (iLipid)	3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-((((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエノアート*		50
中性ヘルパー脂質	1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)		9
PEG脂質	1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000 (PEG ₂₀₀₀ -DMG)		3
ステロール脂質	コレステロール		38

*国際公開特許出願第WO2021/178725A1号に記載

【0 2 9 6】

表12の脂質は、記載のクラスの他の好適な脂質と置き換えられ得ると理解すべきである。いくつかの実施形態では、例えば、LNPは、国際公開特許出願第WO2022/060871A1号に記載のアミノ脂質VL422を含む。例えば、アミノ脂質は、VL422、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であってよい：

【化 1 7】



【0 2 9 7】

さらに、表12の脂質のモル%が調整され得ること、及び表12に含まれるモル%が、LNPの賦形剤の目標の割合であり、それは所与のバッチで製剤化された全てのLNPの総モル%を表すことが意図され、及びバッチ内の特定のLNPが、様々なモル%を有し得ることは理解されるべきである。従って、本明細書では、表12に記載のLNP構成成分の1つ以上または全てのモル%は、例えば、±1~5%、±5~10%、または±10%~20%調整され得ることが企図される。本明細書では、さらに、所望の目標賦形剤パーセンテージに従って製剤化されたLNPの所与のバッチにおいて製剤化された特定のLNPに関して、表12に記載のLNP構成成分の1つ以上または全てのモル%が、例えば、±1~5%、±5~10%、または±10%~20%、またはさらに±20%超の範囲で、目標モル%とは異なり得ることが企図される。さらに、非脂質構成成分を含む追加のLNP構成成分が、表12に記載のLNP構成成分に加えられ得ると理解すべきである。表13に示されるように、LNP1は、sgRNA GA519と共に製剤化され、LNP2は、GA520と共に製剤化され、これらは、それぞれ、上述のsgRNA GA457及びGA460に対応する。GA519及びGA520は化学合成され、GA519及びGA520の配列及び化学修飾は表13に示される。

10

【表13】

表13. GA519及びGA520 TTR遺伝子標的ガイド

LNP	gRNA ID	種	プロトスペーサー(5'-3')	同等のヒト gRNA	gRNA配列(5'-3')
1	GA519	カニクイザル	GCCATCCTG CCAAGAACG AG (配列番号 28)	GA457	gscscsAUCCUGCCAAGAA CGAGgUUUUAGagcuaGaa auagcaaGUUaAaAuAaggcua GUccGUUAucAAcuuGaaaaa gugGcaccgagucggugcuususu s (配列番号16)
2	GA520	カニクイザル	TATAGGAAA ACCAGTGAG TC (配列番号 26)	GA460	usasusAGGAAAACCAGU GAGUCgUUUUAGagcuaGa aaauagcaaGUUaAaAuAaggcu aGUccGUUAucAAcuuGaaaa agugGcaccgagucggugcuus us (配列番号17)

20

30

配列内の文字：A= アデノシン；C= シチジン；G= グアノシン；U= ウリジン；
a= 2'-O-メチルアデノシン；c= 2'-O-メチルシチジン；g= 2'-O-メチルグアノシン；
u= 2'-O-メチルウリジン；s= ホスホロチオエート(PS)主鎖結合。C= NHPでヒト
TTR配列と異なるヌクレオチド。gRNA配列中の太字は、プロトスペーサーに対応
するスペーサー配列を示す。

40

【0298】

特に、GA457と比較して、GA519は、参照カニクイザルゲノム (macFas5) のエクソン1の50,681,581~50,681,603位でハイブリダイズし、50,681,584位のアデノシンを編集し、これにより、メチオニンアミノ酸をスレオニンアミノ酸に変換することにより、全長TTRタンパク質配列の破壊がもたらされ、タンパク質翻訳が阻害される (図8)。GA519は、ヒトGA457 gRNAのカニクイザルサロゲートであり、上述されたように、図4のようなヒトTTR遺伝子座の類似領域にマッピングする。カニクイザルGA519 gRNAは、プロトスペーサーの17位の単一ヌクレオチドだけGA457とは異なり、表13

50

のプロトスペーサー列で下線で強調表示されている。さらに、GA519及びGA457は、GA519のtracr領域が化学修飾を組み込むという点で互いに異なる（表13に詳述）。化学修飾は、in vivoでの安定性の改善のために設計されるか、または改善が可能である。

【0299】

同様に、GA460と比較して、GA520は、参照カニクイザルゲノム（macFas5）のエクソン3の50,678,305～50,678,327位でハイブリダイズし、50,678,324位のアデノシンを編集し、これにより、切断型非機能的TTRタンパク質を生成するスプライシングアクセプター破壊が生じる（図9）。GA520のプロトスペーサー領域は、ヒトGA460と同一であり、上述されたように、図4のようなヒトTTR遺伝子座の類似領域にマッピングする。GA520及びGA460は、tracr領域が異なり、上の表に詳述されているように、in vivoでの安定性の改善のために設計されるかまたは改善が可能である化学修飾を組み込む。

10

【0300】

参考のために、塩基編集の標的ヌクレオチドは、図8及び9で太字で強調表示されている。図8及び図9は、上述されるように、TTR遺伝子に対するGA519及びGA520のスペーサーの位置も同定する。

【0301】

ABE8.8 mRNAと、GA519及びGA520をsgRNA：mRNAの重量比1：1で使用して、それぞれ、LNP1及びLNP2を製剤化した。換言すれば、LNPを、mRNAと等重量のガイドRNAと共に製剤化した。0.2ミクロンのフィルターを使用して、sgRNA及びABE8.8 mRNAをカプセル化する、得られたLNPを濾過し、-80℃で凍結した。製剤化されたLNPの物理的特性が表14にまとめられる。

20

【表14】

表14. LNP1/LNP2の特性評価

LNP	平均LNPサイズ(nm)	PDI	RNAの捕捉(%)
1	68.6	0.022	95.7
2	68.6	0.029	96.2

30

PDIは、多分散性指数である

当業者は、表14に記載の平均LNPサイズ、PDI及びRNA捕捉値が測定誤差または精度の影響を受けることを理解するであろう。表14に記載のLNPサイズ、PDI及びRNA捕捉値は、±1～5%、±5～10%、または±10%～20%変動し得ることも本明細書において企図される。

【0302】

NHP研究設計

研究のこの態様では、カンボジア起源の雌のカニクイザルを、研究動物として使用した。デキサメタゾンならびにH1及びH2抗ヒスタミン薬を含む前投薬レジメンを、-1日目（投与の約24時間前）及び1日目（投与前）、被験物質の用量の投与の30～60分前に、全ての動物に投与した。単回IV注入により研究の1日目に、3匹のサルにLNP1を投与し、3匹のサルにLNP2を、3mg/kg（動物の体重）の合わせたsgRNA及びmRNAの用量レベル及び6mL/kgの用量体積で投与した（n=3/群）。

40

【0303】

バイオマーカー、サイトカイン、血漿中iLipid及びPEG脂質薬物動態、ならびに血清安全性パラメーターを評価するために、ベースライン測定のための投与前と、投与後1～15日目の様々な時点で、全ての動物から血液試料を採取した。

【0304】

16日目に、全ての動物で、剖検を実施した。TTR遺伝子編集を評価するために、肝生

50

検試料を収集した。

【0305】

編集効率の分析

上述のような方法を使用して動物の肝臓から抽出されたゲノムDNAに由来するTTR標的部位での標的ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)アンプリコンの次世代シーケンシング(NGS)により、肝臓における遺伝子編集の量を評価した(Musunuru et al, Nature 593, no. 7859 (May 2021): 429-34. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03534-y>)。編集パーセントは、標的アデニンに非参照対立遺伝子を含む全てのリードのパーセントとして報告された。

【0306】

図10は、LNP2と比較したLNP1のTTR編集効率を示す。特に、図10に示されるように、平均肝臓TTR編集効率は、LNP2(29%)と比較して、LNP1(52%)で処置されたNHPの方が高い。

【0307】

血清中のTTRタンパク質発現の定量化

TTRタンパク質分析のために、注入前の-10、-7、-5日目ならびにLNP注入後の7及び14日目に、全ての動物から、血清を収集した。2つの方法を使用して、血清中TTRを定量した。図11に提示されるその分析から得られたデータを用いるカスタムTTRサンドイッチELISAを使用して、TTRタンパク質レベルを最初に定量した。-10、-7、及び-5日目の値を平均して、ベースライン値を取得した。特に、LNP1で処置された動物は、LNP2で処置された動物(14日目でベースラインから3%の変化)と比較した場合、より大きな肝臓TTR編集を示し、また、より大きな血漿中TTR低減(14日目でベースラインから-63%の変化)を示した。液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)を使用して、血清から収集されたTTRタンパク質も定量した、各試料時点から4つの固有の血清中TTRペプチドフラグメントを定量し、結果の平均が報告される。LC-MSを使用したLC-MS血清中TTR定量分析を図12に示し、特に、LNP2(14日目でベースラインから-21%の変化)と比較した場合、LNP1がより大きな血漿中TTR低減(14日目でベースラインから-73%の変化)も示したという点で、ELISA定量化から得られたデータと一致していた。

【0308】

従って、図10、11、及び12に示されるように、NHPへのLNP1及びLNP2の注入は、肝臓におけるTTR遺伝子の編集をもたらし、LNP1は、LNP2よりも大きな編集を示した。LNP1 NHPのより大きな編集は、血清中の血清TTR濃度の低減の相応の増加に対応した。

【0309】

安全性分析

安全性分析のために、注入前の-10日目、-7日目、-5日目、ならびにLNP注入の6、24、48、96、168、240、及び336時間後に、全ての動物から血清を収集し、特に、肝酵素及びサイトカインレベルの変化の観察に向けた。血清化学パラメーターを、Beckman Coulter AU680分析装置で血清試料から直接測定した。-10、-7、及び-5日目の値を平均して、ベースライン値を取得した。LNP1及びLNP2投与動物は双方ともに、注入終了の48時間後でピークに達し、注入終了の168時間後でベースラインレベルに戻った一過性のアラニンアミノトランスフェラーゼ上昇を示した(図13A)。図13Bに示されるように、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼレベルも、LNP1及びLNP2処置の両方によって上昇し、注入終了の6時間後にピークに達し、注入終了の96時間後でベースラインレベルに戻った。図14Aに示される血清中乳酸デヒドロゲナーゼ濃度及び図14Bに示されるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ濃度も、LNP1またはLNP2のいずれかの投与後に短時間上昇し、注入終了の96~168時間後でベースラインレベルに戻ることも判明した。LNP1またはLNP2のいずれの注入によっても、図15Aに示されるγ-グルタミルトランスフェラーゼの血清中濃度、及び図15Bに示されるアルカリホスファターゼの血清中濃度は変化しなかった。さらに、図16に示されるように、LNP1及びLNP2処置

は、血清中総ビリルビン濃度に影響を与えなかった。図17に示されるように、LNP1及びLNP2が投与された動物は、それぞれ、血清クレアチンキナーゼ濃度の上昇も示した。これは、いずれの場合も、注入終了の6時間でピークに達し、168時間後までにベースラインレベルに完全に戻った。

【0310】

血清サイトカイン分析のために、処置前-10、-7、-5日目、ならびにLNP注入の24、168、及び336時間後に、全ての動物から血清を収集した。マルチプレックスサンドイッチイムノアッセイを使用して、サイトカインを測定した。4つのサイトカイン（MCP-1、IL-6、IP-10、IL-1RA）が、Meso Scale Diagnostics (Rockville, MD)のU-PLEXバイオマーカー群1（サル）アッセイを使用して、血清試料から同時に定量される。-10、-7、及び-5日目の値を平均して、ベースライン値を取得した。図18に示されるように、LNP1及びLNP2が投与された動物は双方ともに、血清中IL-6濃度の上昇を示し、同様の程度で、注入終了の6時間でピークに到達し、24時間後までにベースラインに戻った。図18にさらに示されるように、LNP1及びLNP2が投与された動物は双方ともに、血清中IL-1RAの増加を示し、6時間でピークに到達し、336時間までに完全にベースラインに戻った。また、図18に示されるように、LNP1もLNP2も、血清中MCP-1濃度または血清中IP-10濃度に測定可能な有意な影響を及ぼさなかった。

10

【0311】

全体として、上述のパラメーターの分析は、サルへのLNP1及びLNP2のいずれかの注入により、肝酵素及びサイトカインが一時的に増加する（これは、急速に消失する）ことを示した。

20

【0312】

薬物動態(PK)の評価

血漿中PK分析ならびにLNP1及びLNP2を構成するiLipid及びPEG脂質賦形剤の濃度の決定のために、血液試料を採取した（K₂EDTA）。注入終了後、LNP注入の0.25、2、6、24、48、96、168、240、及び336時間後に血漿試料を収集した。適格なLC-MSアッセイを使用して、iLipid及びPEG脂質の濃度を測定した。これは、図19Aに示される。脂質が定量限界を下回った時点は、図には含まれていない。図19Aに示されるように、LNP1及びLNP2が投与された動物の血清中iLipid濃度は、LNP注入の96時間後で定量下限（LLOQ）に近づくまで連続的に減少した。同様に、図19Bに示されるように、LNP1及びLNP2が投与された動物の血清中PEG脂質濃度も急速に低下し、注入終了の24時間後でLLOQに達した。

30

【0313】

パートB：GalNAc LNPを用いた、GA519のin vivo NHP評価

GA519のさらなる評価では、同じGA519及びABE8.8 mRNAを1：1の重量比でカプセル化するように、追加のLNP（LNP3）を製剤化し、上述のように、NHPに静脈内投与した。LNP3は、以下でより詳細に記載されるように、追加のGalNAcリガンド賦形剤と共に製剤化されたという点で、LNP1とは異なる。

【0314】

LNPの調製

研究のこの態様のために製剤化されたGalNAc LNP（LNP3）は、LNP1/LNP2に関して記載される同じiLipid、中性ヘルパー脂質、PEG脂質、及びステロール脂質で構成されていたが、LNP1/LNP2とは異なり、LNP3はGalNAcコンジュゲート脂質も含む。LNP3の各構成成分のモル比が表15に記載される。

40

【表 1 5】

表15. LNP3構成成分

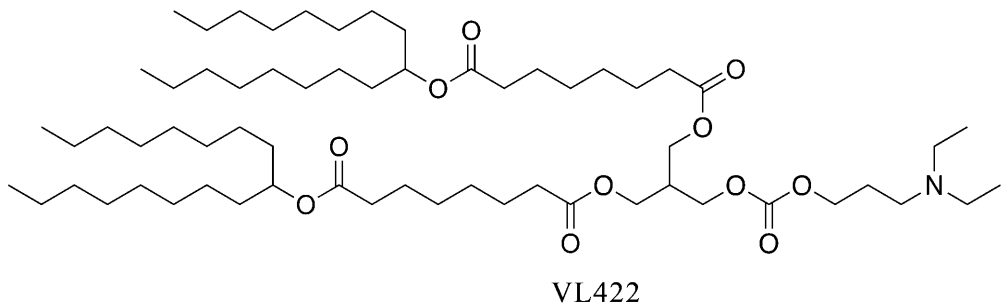
LNP 構 成 成 分	脂質の名称	脂質の構造	モル%
アミノ 脂 質 (iLipid)	3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタ ノイル)オキシ)-2-((((3-(ジエチル アミノ)プロポキシ)カルボニル) オキシ)メチル)プロピル(9Z,12Z)- オクタデカ-9,12-ジエノアート*		50
中 性 ヘ ル パー 脂質	1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ- 3-ホスホコリン(DSPC)		9
PEG 脂 質	1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ- 3-メトキシポリエチレングリコー ル-2000 (PEG ₂₀₀₀ -DMG)		3
ステロ ール 脂 質	コレステロール		37.95
GalNAc 脂質	N ² -(PEG-DSG)-N ⁶ -((C5-GalNAc)ア ミド)-Lys-[ビス((C5-GalNAc)プロ ピルアミド)]アミド または DSG-PEG-Lys- ト リ ス (GalNAc)*		0.05

*国際公開特許出願第WO2021/178725A1号に記載

【 0 3 1 5】

表15の脂質は、記載のクラスの他の好適な脂質と置き換えられ得ると理解すべきである。例えば、アミノ脂質は、以下のアミノ脂質またはその塩であってよい：

【化 1 8】



【 0 3 1 6】

さらに、表13の脂質のモル%が調整され得ること、及び表13に含まれるモル%が、LNPの賦形剤の目標割合であり、所与のバッチで製剤化された全てのLNPの総モル%を表すことが意図され、及びバッチ内の特定のLNPが、様々なモル%を有し得ることは理解されるべきである。従って、本明細書では、表13に記載のLNP構成成分の1つ以上または全てのモル%は、例えば、±1～5%、±5～10%、または±10%～20%調整され得ること

が企図される。本明細書では、さらに、所望の目標賦形剤パーセンテージに従って製剤化されたLNPの所与のバッチにおいて製剤化された特定のLNPに関して、表13に記載のLNP構成成分の1つ以上または全てのモル%が、例えば、 $\pm 1 \sim 5\%$ 、 $\pm 5 \sim 10\%$ 、または $\pm 10\% \sim 20\%$ 、またはさらに $\pm 20\%$ 超の範囲で、目標モル%とは異なり得ることが企図される。さらに、非脂質構成成分を含む追加のLNP構成成分が、表13に記載のLNP構成成分に加えられ得ると理解すべきである。

【0317】

LNP3を製剤化する際、GA519 sgRNA及びABE8.8 mRNA（重量比1：1）と共にインライン混合する前に、GalNAc脂質を、表15に参照される他のLNP賦形剤と予め混合して、LNP3を形成した。Rajeev et al., WO2021178725は、GalNAc脂質の合成及び特性評価の記載を含む。LNP1/LNP2と同様に、0.2ミクロンのフィルターを使用して、得られたGalNAc-LNP、LNP3を濾過し、 -80°C で凍結した。製剤化されたLNP3の物理的特性が表16にまとめられる。

【表16】

表16. LNP3の特性評価。

LNP	平均LNPサイズ(nm)	PDI	RNAの捕捉
3	61.92	0.055	98.7

【0318】

当業者は、表16に記載の平均LNPサイズ、PDI及びRNA捕捉値が測定誤差または精度の影響を受けることを理解するであろう。表16に記載のLNPサイズ、PDI及びRNA捕捉値は、 $\pm 1 \sim 5\%$ 、 $\pm 5 \sim 10\%$ 、または $\pm 10\% \sim 20\%$ 変動し得ることも本明細書において企図される。

【0319】

NHP研究設計

研究のこの態様では、カンボジア起源の雄のカニクイザルを使用した。デキサメタゾンならびにH1及びH2抗ヒスタミン薬を含む前投薬レジメンを、-1日目（投与の約24時間前）及び1日目（投与前）、被験物質の用量の投与の30～60分前に、全ての動物に投与した。以下の用量レベルで3匹のサルの2群にIV注入により、LNP3投与製剤を研究の1日目に1回投与した：(i)3匹のサルの第1群について、 2 mg/kg （動物の体重）のsgRNA及びmRNAの組み合わせ、ならびに、 6 mL/kg の用量体積（ $n=3/\text{群}$ ）、ならびに、(ii)3匹のサルの第2群について、 3 mg/kg （動物の体重）のsgRNA及びmRNAの組み合わせ、ならびに、 6 mL/kg の用量体積（ $n=3/\text{群}$ ）。

【0320】

バイオマーカー、血漿中iLipid、及びPEG薬物動態、ならびに血清安全性パラメータを評価するために、ベースライン測定のための投与前と、注入後1日目～35日目の様々な時点で、全ての動物から血液試料を収集した。

36日目に、剖検を実施した。肝臓におけるTTR遺伝子編集を評価するために、全ての動物から、肝臓組織試料を収集した。

【0321】

編集効率の分析

上述のように肝臓から抽出されたゲノムDNAに由来するTTR標的部位での標的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）アンプリコンの次世代シーケンシング（NGS）により、肝臓における遺伝子編集の量を評価した（Musunuru et al., Nature 593, no. 7859 (May 2021): 429-34. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03534-y>）。編集パーセントは、標的アデニンに非参照対立遺伝子を含む全てのリードのパーセントとして報告された。

【0322】

図20に記載されるように、LNP3は、3mg/kgが投与されたサル（63%）と比較して、2mg/kgが投与されたサル（60%）で同様のレベルの肝臓TTR編集効率をもたらした。

【0323】

血清中のTTRタンパク質発現の定量化

TTRタンパク質分析のために、注入前-10、-7、-5日目ならびに注入終了の7、14、21、28、及び35日後に血清を収集した。血清中TTRは、最初に、図21に提示されたその分析から得られたデータを用いるカスタムTTRサンドイッチELISAを使用して定量化された。-10、-7、及び-5日目の値を平均して、ベースライン値を取得した。図21に示されるように、LNP3が投与された動物の両群は、投与後の最初の時点（7日目）で血清中TTRタンパク質の顕著な低減を示した。これらの低減は、研究期間中維持され、28日目に、2mg/kg及び3mg/kgのサル群について、それぞれ、ベースラインから-84%及び-91%変化の最大低減に達した。また、ELISAの結果を確認するために、TTRタンパク質をLC-MSで定量し、各時点で、血清中の4つの固有のTTRペプチドフラグメントを定量し、4つの結果の平均が報告される。図22に示されるLC-MS血清中TTR定量化は、TTRが、7日目の動物への注入後の最初の時点で低減し、35日目の剖検まで維持されたことを確認した。2mg/kgのLNP3が投与された動物では、TTRタンパク質の最大低減は、35日目に到達し（ベースラインからの変化-82%）、一方、TTRタンパク質の3mg/kgの群の最大は、28日目に到達した（ベースラインからの変化-87%）。

【0324】

従って、上記のように及び上述の参照図に示されるように、2mg/kg及び3mg/kgのLNP3が投与されたNHPの両方は、顕著な比較的迅速な肝臓TTR遺伝子編集及びタンパク質の血清中TTR濃度の対応する低減をもたらした。

【0325】

安全性分析

安全性分析用のために、注入前の-10、-7、-5日目、ならびに注入終了後の6、24、48、96、168、336時間、21日目、28日目、及び35日目に、試験動物のそれぞれから血清を収集し、特に、肝酵素及びサイトカインレベルの変化の観察に向けた。血清化学パラメーターを、Beckman Coulter AU680分析装置で血清試料から直接測定した。-10、-7、及び-5日目の値を平均して、ベースライン値を取得した。LNP3が投与された動物は、図23Aに示されるように、用量依存的な一過性のアラニンアミノトランスフェラーゼの上昇を示し、これは、注入終了の24～48時間後でピークに達し、注入終了の336時間後でベースラインレベルに戻った。図23Bに示されるように、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼレベルは、2mg/kg及び3mg/kgのLNP3用量の両方で同程度に上昇し、注入終了の6時間後にピークに達し、注入終了の168時間後でベースラインレベルに戻った。図24Aに示されるように、2mg/kg及び3mg/kgのLNP3用量は双方ともに、血清中乳酸デヒドロゲナーゼ濃度を上昇させ、これは、注入終了の168時間後までにベースラインレベルに戻った。図24Bに示されるように、LNP3は、また、用量依存的にグルタミン酸デヒドロゲナーゼ濃度を上昇させ、24時間でピークに達し、注入終了の336時間後でベースラインレベルに戻った。図25A及び25Bで示されたγ-グルタミルトランスフェラーゼ及びアルカリホスファターゼの血清中濃度は、それぞれ、いずれのLNP用量でも有意な変化はなかった。さらに、図26に示されるように、LNP3処置は、血清中総ビリルビン濃度に有意な影響を与えなかった。図27に示されるように、LNP3は、血清中クレアチンキナーゼ濃度を上昇させ、注入終了の6時間後でピークに達し、その後、注入終了後168時間までにベースラインレベルに戻った。

【0326】

in vivoでのNHP研究のこの態様における上述の安全性パラメーターの分析は、用量の両方のLNP3が、対象の投与後の2週間以内で急速に解消した肝酵素の一時的な増加を生じさせたことを、それらが示したという点で、研究の以前の態様と一致していた。

【0327】

薬物動態(PK)の評価

血漿中PK分析ならびにLNP3を構成するイオン化可能アミノ脂質(iLipid)及びPEG脂質の濃度の決定のために、全ての動物から血液試料を採取した(K₂EDTA)。注入終了後、LNP3注入の0.25、2、6、24、48、96、168、240、及び336時間後に血漿試料を収集した。適格なLC-MSアッセイを使用して、iLipid及びPEG脂質の濃度を測定した。図28Aに示されるように、用量依存性のiLipid血漿中曝露が観察され、注入終了の96時間後までにLLOQを下回った。図28Bに示されるように、PEG脂質の用量依存的な血漿中曝露も観察され、注入終了の24時間後までにLLOQに達した。

【0328】

本明細書で引用される、全ての特許、特許出願、及び出版物、ならびに電子的に利用可能な資料の完全な開示(例えば、GenBank及びRefSeqへのヌクレオチド配列の提出、ならびに、例えば、SwissProt、PIR、PRF、PDBにおけるアミノ酸配列の提出、ならびにGenBank及びRefSeqにおける注釈付きコード領域からの翻訳を含む)が参照により組み込まれる。

10

【0329】

本出願の開示及び参照により本明細書に組み込まれる文書の開示(複数可)間に矛盾が存在する場合には、本出願の開示が、優先されるものとする。上述の詳細な説明及び実施例は、理解を明確にするためにのみ示される。そこから不必要な制限を理解すべきではない。本発明は、図示され説明された正確な詳細に限定されるものではなく、当業者にとって明らかな変形形態は、特許請求の範囲により規定される本発明の範囲内に含まれる。

20

【0330】

他の実施形態

上述の説明から、本明細書に記載の開示に対する変形形態及び修正は、それを様々な使用法及び条件に適用するために行われ得ることは明らかであろう。そのような実施形態も、以下の特許請求の範囲内にある。

【0331】

本明細書における変数の任意の定義における要素のリストの記載は、任意の単一要素または記載された要素の組み合わせ(もしくは部分組み合わせ)としてのその変数の定義を含む。本明細書の実施形態の詳述は、任意の単一の実施形態、実施形態の任意の部分として、または他の任意の実施形態もしくはその任意の部分と組み合わせ、その実施形態を含む。

30

【0332】

本明細書に記載されているように、本開示は、遺伝子における核酸塩基の変化をもたらすための塩基編集システムの特定制の実施形態及び実施例、ならびにそのような塩基編集システム、設計、及びそれらの修正を含む組成物を含む、疾患を処置するためにそれらを使用する方法;ならびに、記載の条件下で、疾患を処置するための、ならびに哺乳動物細胞への活性薬のin vivo及びin vitro送達のための医薬組成物として含む、上述のものの合成、製造、使用、及び有効性について個別に、及び組み合わせで記載する特定制の実施例及び実施形態を含むことが理解されるであろう。

【0333】

特定制の実施例及び多数の実施形態は、上述のものの態様及び態様の組み合わせを説明するために提供されているが、例示的または開示された実施形態の任意の態様またはそれらの組み合わせは、制限なく別の実施形態を構成するために、そこから除外され得ること、ならびに、そのようないずれの実施形態も、別個の独立した請求項を構成し得ると考えられることが認識及び理解されるべきである。同様に、1つ以上の実施形態の任意の態様または態様の組み合わせは、また、1つ以上の実施形態の任意の態様または態様の組み合わせと共に含まれるか、または組み合わせられ得ること、ならびに、本明細書では、それらのそのような組み合わせ全てが、本開示の範囲内にあり、制限なく別個の独立した請求項として提示することができることが企図されることが、認識及び理解されるべきである。従って、ある請求項に提示された任意の特徴が、別の請求項に含まれ得ること;ある請求項

40

50

に提示された任意の特徴が、その特徴のない請求項を構成する請求項から削除され得ること；及び、ある請求項に提示された任意の特徴が、別の請求項の任意の特徴と組み合わせられ得ること、が認識されるべきであり、これらのそれぞれが、本明細書で企図される。以下に列挙された条項は、上述の実施形態及び実施例の態様及び態様の組み合わせのさらなる例示的な例である。

【0334】

以下が、列挙された条項の例である：

1. 単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸であって、前記ポリヌクレオチドが、ゲノム内のNGGプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に隣接するトランスサイレチン(TTR)をコードする遺伝子内の標的プロトスペーサー配列と相同である約17～約23ヌクレオチドを含む5'-スペーサー配列を含み、前記単離ポリヌクレオチドが、塩基エディターシステムに前記TTR遺伝子における核酸塩基の変化を生じさせるように指示するガイドポリヌクレオチドとして機能する、前記単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。 10
2. 前記5'スペーサーの3'に、さらにtracrRNAドメインを含み、前記tracrRNAが、塩基エディタータンパク質に結合するように構成されている、条項1に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。
3. 前記プロトスペーサー配列が、前記TTR遺伝子の開始コドンまたはスプライス部位を含む、条項1または2に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。
4. 前記TTR遺伝子にもたらされた前記核酸塩基の変化が、開始コドンの破壊またはイントロンエクソンスプライス部位の破壊を含む、先行条項のいずれか1項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。 20
5. 前記TTR遺伝子にもたらされた前記核酸塩基の変化が、イントロンエクソンスプライス部位の破壊を含む、先行条項のいずれか1項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。
6. 前記単離ポリヌクレオチド、または前記それをコードする核酸にコードされるポリヌクレオチドが、下記と、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%同一であるスペーサー配列を含む、先行条項のいずれか1項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸： 30
 - 5'-GCCAUCCUGCCAAGAAUGAG-3' (配列番号1) (GA457)、
 - 5'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3' (配列番号2) (GA519)、
 - 5'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3' (配列番号2) (GA458)、
 - 5'-GCAACUUACCCAGAGGCCAAA-3' (配列番号3) (GA459)、
 - 5'-UAUAGGAAAACCAGUGAGUC-3' (配列番号4) (GA460/GA520)、または
 - 5'-UACUCACCUCUGCAUGCUC-3' (配列番号5) (GA461)。
7. 前記単離ポリヌクレオチドまたは前記それをコードする核酸にコードされるポリヌクレオチドが、以下の配列の1つを有するスペーサー配列を含む、条項6に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸： 40
 - 5'-GCCAUCCUGCCAAGAAUGAG-3' (配列番号1) (GA457)、
 - 5'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3' (配列番号2) (GA519)、
 - 5'-GCCAUCCUGCCAAGAACGAG-3' (配列番号2) (GA458)、
 - 5'-GCAACUUACCCAGAGGCCAAA-3' (配列番号3) (GA459)、
 - 5'-UAUAGGAAAACCAGUGAGUC-3' (配列番号4) (GA460/GA520)、または
 - 5'-UACUCACCUCUGCAUGCUC-3' (配列番号5) (GA461)。
8. 前記単離ポリヌクレオチド、または前記それをコードする核酸にコードされたポリヌクレオチドが、ガイドRNAを含む、先行条項のいずれか1項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸。
9. 先行条項のいずれか1項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸を含む、組成物。
10. 先行条項のいずれか1項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸 50

と、塩基エディター融合タンパク質をコードする核酸を含む、組成物。

11. 前記塩基エディター融合タンパク質が、プログラム可能なDNA結合ドメイン及びデアミナーゼを含む、条項10に記載の組成物。

12. 前記デアミナーゼが、シトシンデアミナーゼまたはアデニンデアミナーゼを含む、条項11に記載の組成物。

13. 前記プログラム可能なDNA結合ドメインが、触媒作用が損なわれたCas9タンパク質を含む、条項10～12のいずれか1項に記載の組成物。

14. 前記触媒作用が損なわれたCas9タンパク質が、触媒作用が損なわれたStreptococcus pyogenes Cas9タンパク質を含む、条項13に記載の組成物。

15. 前記デアミナーゼが、ABE8.8を含む、条項11～14のいずれか1項に記載の組成物。

16. 前記デアミナーゼが、表11のMA004 mRNA配列を含むmRNAにコードされる、条項11～14のいずれか1項に記載の組成物。

17. 前記デアミナーゼが、表11に示されるMA004 mRNAと95%以上の配列同一性を有する配列を含むmRNAにコードされる、条項11～14のいずれか1項に記載の組成物。

18. 前記デアミナーゼが、表11に示されるMA004 mRNAと96%以上の配列同一性を有する配列を含むmRNAにコードされる、条項11～14のいずれか1項に記載の組成物。

19. 前記デアミナーゼが、表11に示されるMA004 mRNAと97%以上の配列同一性を有する配列を含むmRNAにコードされる、条項11～14のいずれか1項に記載の組成物。

20. 前記デアミナーゼが、表11に示されるMA004 mRNAと98%以上の配列同一性を有する配列を含むmRNAにコードされる、条項11～14のいずれか1項に記載の組成物。

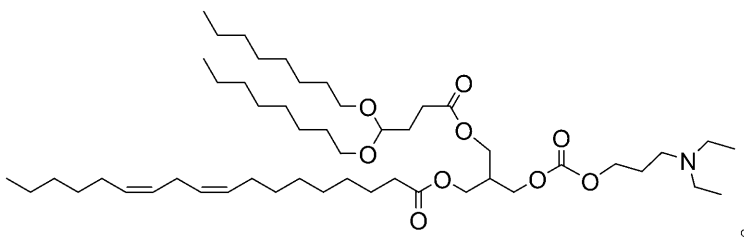
21. 前記デアミナーゼが、表11に示されるMA004 mRNAと99%以上の配列同一性を有する配列を含むmRNAにコードされる、条項11～14のいずれか1項に記載の組成物。

22. 条項1～8のいずれか1項に記載の単離ポリヌクレオチドもしくはそれをコードする核酸、または条項9～21のいずれか1項に記載の組成物を含む、医薬組成物。

23. 請求項1～8のいずれか1項に記載の単離ポリヌクレオチドまたはそれをコードする核酸、条項9～21のいずれか1項に記載の組成物、または条項22に記載の医薬組成物を含む、脂質ナノ粒子(LNP)。

24. 以下の構造を有するアミノ脂質、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を含む、条項23に記載のLNP：

【化19】



25. 以下の構造を有するアミノ脂質、またはその薬学的に許容される塩もしくは薬学的に許容される溶媒和物を含む、条項23に記載のLNP：

10

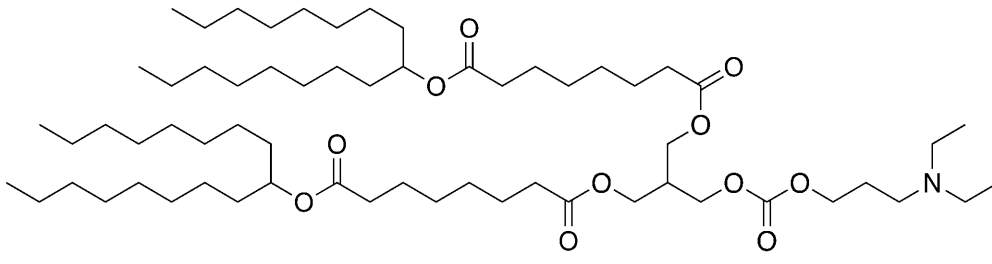
20

30

40

50

【化 2 0】



10

26. さらに、中性ヘルパー脂質、PEG脂質、及びステロール脂質を含む、条項24または25に記載のLNP。

27. 表12に記載の構成成分を含む、条項24または25に記載のLNP。

28. 表12に記載の構成成分が、表12に記載のモルパーセント(モル%)の10%~20%以内のモル%でLNP中に存在する、条項27に記載のLNP。

29. 表12に記載の構成成分が、表12に記載のモルパーセント(モル%)の5%~10%以内のモル%でLNP中に存在する、条項27に記載のLNP。

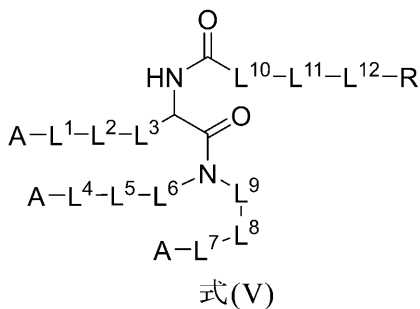
30. 表12に記載の構成成分が、表12に記載のモルパーセント(モル%)の1%~5%以内のモル%でLNP中に存在する、条項27に記載のLNP。

31. 表12に記載の構成成分が、表12に記載のモルパーセント(モル%)でLNP中に存在する、条項27に記載のLNP。

20

32. 前記LNPが、式(V)の化合物を含む受容体標的化コンジュゲートを含む、条項27~31のいずれか1項に記載のLNP：

【化 2 1】

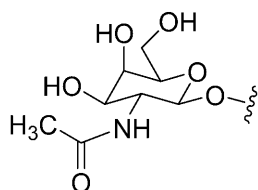


30

(式中、

複数のAは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)または

【化 2 2】

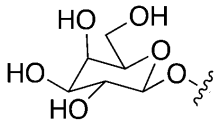


40

または

50

【化 2 3】



またはその誘導体であり、

各 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 L^6 、 L^7 、 L^8 、 L^9 、 L^{10} 、及び L^{12} は、独立して、置換もしくは非置換 C_1 - C_{12} アルキレン、置換もしくは非置換 C_1 - C_{12} ヘテロアルキレン、置換もしくは非置換 C_2 - C_{12} アルケニレン、置換もしくは非置換 C_2 - C_{12} アルキニレン、 $-(CH_2CH_2O)_m-$ 、 $-(OCH_2CH_2)_m-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S(=O)(=NR^1)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=N-OR^1)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)C(=O)-$ 、 $-C(=O)NR^1-$ 、 $-NR^1C(=O)-$ 、 $-OC(=O)NR^1-$ 、 $-NR^1C(=O)O-$ 、 $-NR^1C(=O)NR^1-$ 、 $-C(=O)NR^1C(=O)-$ 、 $-S(=O)_2NR^1-$ 、 $-NR^1S(=O)_2-$ 、 $-NR^1-$ 、または $-N(OR^1)-$ であり、

L^{11} は、置換もしくは非置換 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 、置換もしくは非置換 $-(OCH_2CH_2)_n-$ 、または置換もしくは非置換 $-(CH_2)_n-$ であり、

各 R^1 は、独立して、H、または置換もしくは非置換 C_1 - C_6 アルキルであり、

Rは、脂質であり、

mは、1~10から選択される整数であり、

nは、1~200から選択される整数である）。

33. 条項23~32のいずれか1項に記載のLNPを含む、医薬組成物。

34. 細胞内のTTR遺伝子に1つ以上の核酸塩基の変化を生じさせる方法であって、前記方法が、前記細胞を、条項1~8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドもしくは核酸、条項9~21のいずれか1項に記載の組成物、請求項22もしくは33に記載の医薬組成物、または条項23~32のいずれか1項に記載のLNPと接触させることを含む、前記方法。

35. 前記TTR遺伝子の1つ以上の対立遺伝子が、サイレンシングされる、条項34に記載の方法。

36. 対象においてトランスサイレチン(TTR)遺伝子に1つ以上の核酸塩基の変化を生じさせる方法であって、前記方法が、条項1~8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたは核酸、条項9~21のいずれか1項に記載の組成物、条項22もしくは33に記載の医薬組成物、または条項23~32のいずれか1項に記載の脂質ナノ粒子を前記対象に投与することを含む、前記方法。

37. 前記塩基の変化が、次世代シーケンシングで測定された場合、前記対象における肝細胞全体の25%以上で生じる、条項36に記載の方法。

38. 前記塩基の変化が、次世代シーケンシングで測定された場合、前記対象における肝細胞全体の40%以上で生じる、条項36に記載の方法。

39. 前記塩基の変化が、次世代シーケンシングで測定された場合、前記対象における肝細胞全体の50%以上で生じる、条項36に記載の方法。

40. 前記塩基の変化が、血清中TTRレベルの低下をもたらす、条項36~39のいずれか1項に記載の方法。

41. 前記TTR遺伝子の1つ以上の対立遺伝子が、サイレンシングされる、条項36~40のいずれか1項に記載の方法。

42. 前記対象が、非ヒト霊長類である、条項36~41のいずれか1項に記載の方法。

43. 前記対象が、ヒトである、条項36~41のいずれか1項に記載の方法。

44. 前記ポリヌクレオチドもしくは核酸、前記組成物、前記医薬組成物、または前記LNPが投与される前記対象が、それを必要とする対象である、条項43に記載の方法。

45. 前記ポリヌクレオチドもしくは核酸、前記組成物、前記医薬組成物、または前記LNPを投与することが、治療有効量の前記ポリヌクレオチド、前記組成物、前記医薬組成物、または前記LNPを投与することを含む、条項44に記載の方法。

46. 前記対象が、前記TTR遺伝子における1つ以上の変異による遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス(hATTR)に罹患しているか、またはそのリスクがある、条項45に記載の方法。

47. 前記対象が、心筋症(hATTR-CM)及び/または多発性神経障害(hATTR-PN)に罹患しているか、またはそのリスクがある、条項46に記載の方法。

48. 前記対象が、前記TTR遺伝子の野生型対立遺伝子(ATTRwt)を特徴とする老人性心アミロイドーシスに罹患しているか、またはそのリスクがある、条項45に記載の方法。

49. 前記ポリヌクレオチドもしくは核酸、前記組成物、前記医薬組成物、または前記LNPが、静脈内投与される、条項36～48のいずれか1項に記載の方法。

50. TTR遺伝子を編集するための組成物であって、

(a)編集ウィンドウを有する塩基エディタータンパク質をコードするmRNA、及び

(b)前記塩基エディタータンパク質の結合足場として機能するtracr配列と、前記塩基エディタータンパク質を前記TTR遺伝子上のプロトスペーサー配列に導くように機能するスペーサー配列を含むガイドRNA、を含み、

前記スペーサー配列が、前記TTR遺伝子のスプライス部位または開始コドンに対して、少なくとも部分的に相補的である、前記組成物。

51. 前記塩基エディタータンパク質が、シチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼを含む、条項50に記載の組成物。

52. 前記塩基エディタータンパク質が、ニックアーゼ及びシチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼを含む融合タンパク質を含む、条項50に記載の組成物。

53. 前記塩基エディタータンパク質が、D10AニックアーゼCas9及びシチジンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼを含む融合タンパク質を含む、条項50に記載の組成物。

54. 前記シチジンデアミナーゼが、デオキシシチジンデアミナーゼである、条項51～53のいずれか1項に記載の組成物。

55. 前記アデノシンデアミナーゼが、デオキシアデノシンデアミナーゼである、条項51～53のいずれか1項に記載の組成物。

56. 前記塩基エディタータンパク質が、アデニン塩基エディターABE8.8を含む融合タンパク質を含む、条項50に記載の組成物。

57. 前記スペーサー配列が、表1から選択されるプロトスペーサー配列と相同である、条項60～56のいずれか1項に記載の組成物。

58. 前記スペーサー配列が、以下の表から選択される、条項50～56のいずれか1項に記載の組成物：

【表17】

gRNAスペーサー配列(5'-3')
gscscsAUCCUGCCAAGAAUGAG (配列番号6)
gscscsAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号7)
gscsasACUUACCCAGAGGCAAA (配列番号8)
usasusAGGAAAACCAGUGAGUC (配列番号9)
usascsUCACCUCUGCAUGCUC (配列番号10)
gscscsAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号7)

（式中、Aは、アデノシンであり；Cは、シチジンであり；Gは、グアノシンであり；Uは、ウリジンであり；aは、2'-O-メチルアデノシンであり；cは、2'-O-メチルシチジンであり；gは、2'-O-メチルグアノシンであり、uは、2'-O-メチルウリジンであり；sは、ホスホロチオエート(PS)主鎖結合である）。

59. 前記スペーサー配列が、以下の表に提示されるスペーサー配列と80%を超える配列同一性を有する、条項50～56のいずれか1項に記載の組成物：

【表 1 8】

gRNAスペーサー配列(5'-3')
GCCAUCCUGCCAAGAAUGAG (配列番号1)
GCCAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号2)
GCAACUUACCCAGAGGCAAA (配列番号3)
UAUAGGAAAACCAGUGAGUC (配列番号4)
UACUCACCUCUGCAUGCUC (配列番号5)
GCCAUCCUGCCAAGAACGAG (配列番号2)

10

20

（式中、Aは、修飾または未修飾アデノシンであり；Cは、修飾または未修飾シチジンであり；Gは、修飾または未修飾グアノシンであり；Uは、修飾または未修飾ウリジンである）。

60. 前記ガイドRNAが、以下の表から選択される、条項50～56のいずれか1項に記載の組成物：

30

40

50

【表 19】

ガイドRNA配列(5'-3')	
gscscsAUCCUGCCAAGAAUGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu (配 列番号11)	
AUCCUGCCAAGAACGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu (配 列 番 号12)	10
gscsasACUUACCCAGAGGCAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu (配 列番号13)	
usasusAGGAAAACCAGUGAGUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu (配列番号14)	
usascsUCACCUCUGCAUGCUCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUsususu (配 列番号15)	20
gscscsAUCCUGCCAAGAACGAGgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaGU ccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcuususus (配列番号16)	
usasusAGGAAAACCAGUGAGUCgUUUUAGagcuaGaaauagcaaGUUaAaAuAaggcuaG UccGUUAucAAcuuGaaaaagugGcaccgagucggugcuususus (配列番号17)	

(式中、Aは、アデノシンであり；Cは、シチジンであり；Gは、グアノシンであり；Uは、
ウリジンであり；aは、2'-O-メチルアデノシンであり；cは、2'-O-メチルシチジンで
あり；gは、2'-O-メチルグアノシンであり、uは、2'-O-メチルウリジンであり；sは、
ホスホロチオエート(PS)主鎖結合であり；太字は、スペーサー配列を表す)。

61. 前記スペーサー配列が、以下の表から選択されるガイドRNA配列と80%を超える配
列同一性を有する、条項50～60のいずれか1項に記載の組成物：

10

20

30

40

50

【表 2 0】

gRNA配列(5'-3')	
GCCAUCCUGCCAAGAAUGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列 番号18)	10
GCCAUCCUGCCAAGAACGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列 番号19)	
GCAACUUACCCAGAGGCAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列 番号20)	
UAUAGGAAAACCAGUGAGUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列 番号21)	20
UACUCACCUCUGCAUGCUCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列 番号22)	
GCCAUCCUGCCAAGAACGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列 番号19)	

62. 前記組成物が、GA459を除いた表2に記載の編集活性の50%以内の編集活性を生じさせることが可能であるか、または表3に記載の編集活性の50%以内の編集活性を生じさせることが可能である、条項50～61のいずれか1項に記載の組成物。
63. 前記組成物が、表4、6、7、8、9、もしくは10に記載の1つ以上の潜在的なオフターゲット部位において、総オフターゲット編集活性の50%以内、または観察されたオフターゲット編集活性以下を生じさせることが可能であるか、またはオフターゲット編集活性を生じさせないことが可能である、条項50～62のいずれか1項に記載の組成物。
64. 前記組成物が、脂質ナノ粒子内にカプセル化されている、条項50～63のいずれか1項に記載の組成物。
65. 前記組成物が、対象にin vivoで投与される、条項50～64のいずれか1項に記載の組成物。

【0335】

本開示を精査することにより、関連する条項の1項または1群に提示される1つ以上の態様または特徴は、また、他の条項に含まれても、他の条項の1つ以上の態様または特徴と組み合わせられてもよいことが考えられることが理解されるであろう。

【図 4 - 2】

tttttttcttctgactttcatttgacttttccgtgcaatttccagtgcccttttcttgctgaagt
+-----+
aaaaaagaagactgaaagttaactgaaaaggcagctaaaagtcacgggaaaaagacgacattca
+-----+
aaattttaaatattatgtcaatagggtcacagaggccaacagacaggcaaggatgggttatgagaaa
+-----+
ttaaaatttataatacagttatccagtgctccgttgctgtccgttccataccaatactcttt
+-----+
aacattttccctaanaaaaaatagaagacagcattttgatgaagaatttttttccctaactttgtgagt
+-----+
ttgtaagggtattttgtttaatcttctgtcgtaaactactttctaaaaaaggattgaacactca
+-----+
ttgtttacataaaaaacacttacaaaaatfagtcaaatcaaaaataacatggagtcattttactttaaga
+-----+
aacaaatgtatttttgtgaatgttttaatcagttagttttatgtacctcagtaaatgaatttct
+-----+
attccttacgttttaaaaaaagactttgaatatggaatacaactaagtgccatcaacttaagt
+-----+
taaggaaatgcaaatttttatttcacagactttataccttagttggattcacaggtagttgaattca
+-----+
gtccaatttaattccatcaactggattaaaaaactgtgggtacatatataccacgggataataactca
+-----+
caggttaaatfaggtagttgacctaattttttgacaccatgtatataatgggtgccctattatgagt
+-----+
gccataaaaaagaatgaattcatgtcttctgcagcaacatggatggaattggaggccattaacct
+-----+
cggtaatttttcttactttagtcagagaagcgtcgtgtacctaccttaacctcgggttaattgga
+-----+
aagtgaaataactcaaaaaacagaagtcatttgagaccagccttaccacatggagaaggcccat
+-----+
ttcaccttattgagttttgtcttccagttaacctctggtcggaatgggtgtacctcttcggggtta
+-----+
ctctactaaaaataaaaaatagccgggtgtgggtgggtgcatgctgtaatccagctactccggga
+-----+
gaggtgatttttatatttaactgggccacacccacagtcacggacattagggtcgatgagccct
+-----+
ggctgaggcaggagaatcgcttgaacctgggaggcggagggttgcggtgagccgagatctccact
+-----+
ccgactccgtctctcttagcgaaacttgagccctccgctccaaagccacttcggcttagagtggtta
+-----+
tgcactccagcctgggcaacaagagtgaaactctgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaacggt
+-----+
acgtgaggtcgggaccgttgtcttccactttgagacagagtttttttttttttttttttggca
+-----+
atgtttccacttataaagtggaaagctaaacagtggggtacagtgggcatacagagtggaataatag
+-----+
tacaagagtgaatatccacttcgattttgtcaccactgtgcaccgttaigtctcactctattatc
+-----+
acactggggactccaaaaggtgagaaggggagagaagaagttaagattgaaaaattaccctttgggt
+-----+
tgtgacccctgaggtttccactctccctctcttttcaattccttaactttttaatggagaacca
+-----+

【図 4 - 4】

atcaatccatcttatttctcttgggtgaatttcaaattaaatatagccataagttactttaata
+-----+
tagttaggtagaataaagagaaccacttfaagtttaatttaattcgggtatctatgaattta
+-----+
catccatagctgaacacatcagagttgaattacagttcaagatttatttacatttttttcttc
+-----+
gtaggtagcggacttgtgtagttccacttaagtgcaggtcttaataaattgaaaaaaagaa
+-----+
tgaggcaaaatcacatagcatgaattgaccaattttaagttacatttgcctaagttttgaagaa
+-----+
actccgcttagtgtatcgctactttagtgggttaaaattcacatgtaaacgattcaaaacttctt
+-----+
tgcatacccggtgaacccaacccctttcaagatgtgaaatgacattgacccagaaaaatccc
+-----+
acgtatgtgggcacatttggtttggggaagttctcaactttactgggtactggggtcttttagg
+-----+
aataccttctctgtcaggccctatctctatctctgagaggcaatgacttttttatttaaat
+-----+
ttatggagaaggacaggtccggatagtagatagagactccgttactgaaaaataaatttaaa
+-----+
tttttagttttgctctctcagaactttataaaatggagtcataatagttggactctggaatag
+-----+
aaaaatcaaaacggagaggattctgaaatatatttaacctcagttatctacacctgagacctatc
+-----+
acctctatcactcagcataaatttttgagattcaatcaggttgggtgtaccagtaacacattctt
+-----+
tgaaatagttgagtcgtattaaaaaacttcaagttagatccaacacacatgggtcattgtgttaaga
+-----+
ttttgtagaaaaaanaactatttttgcattggaatgcagtagcgttctattgtataattatgtcnaa
+-----+
aaaaactctttctttgataaaacgttaccttagctcattcgcaagataacatttaatacaggtt
+-----+
attgtttttccattctcatatttgatggacacccagactgtcttcagttttgtgttatcaaaaatg
+-----+
taacaaaagggtaaagatttaactacctgtgggtctgacagaagtcaaaacacaaatagttttac
+-----+
aagctactataaacattcatgttcaagccttgggtgccatatgttttcaattgtcttggggcaaat
+-----+
ttcgatgatatttgaatgacaagttcgggaaccacgggtatcaaaaagttaacgagaccctgtta
+-----+
acctaaattgctgggtcatgggttaaatgtatgtgtagacattttttagaagcttttttttttt
+-----+
tggatttaacgaccacgtaccccatttacatacacactctgtaaaaaatcttcgaaaaaanaaaaa
+-----+
ttaacaaaaatgcccaggctatacttaccatgctttttctctcctagtttgccaattttattattta
+-----+
aatgtgttttacggtccgatgatgaattgacgaaaaaagaggatcaaacggttaaatataaat
+-----+
tttattttattttttcttgagacaaggtctcactctgttgcccaggctggagtgcaatggccaca
+-----+
aaataaataaataaaaanaactctgttccagagtggagacaacgggtccgacctcacgtcacgggtg
+-----+

【図 4 - 5】

atcaatccatcttatttctcttgggtgaatttcaaattaaatatagccataagttactttaata
+-----+
tagttaggtagaataaagagaaccacttfaagtttaatttaattcgggtatctatgaattta
+-----+
catccatagctgaacacatcagagttgaattacagttcaagatttatttacatttttttcttc
+-----+
gtaggtagcggacttgtgtagttccacttaagtgcaggtcttaataaattgaaaaaaagaa
+-----+
tgaggcaaaatcacatagcatgaattgaccaattttaagttacatttgcctaagttttgaagaa
+-----+
actccgcttagtgtatcgctactttagtgggttaaaattcacatgtaaacgattcaaaacttctt
+-----+
tgcatacccggtgaacccaacccctttcaagatgtgaaatgacattgacccagaaaaatccc
+-----+
acgtatgtgggcacatttggtttggggaagttctcaactttactgggtactggggtcttttagg
+-----+
aataccttctctgtcaggccctatctctatctctgagaggcaatgacttttttatttaaat
+-----+
ttatggagaaggacaggtccggatagtagatagagactccgttactgaaaaataaatttaaa
+-----+
tttttagttttgctctctcagaactttataaaatggagtcataatagttggactctggaatag
+-----+
aaaaatcaaaacggagaggattctgaaatatatttaacctcagttatctacacctgagacctatc
+-----+
acctctatcactcagcataaatttttgagattcaatcaggttgggtgtaccagtaacacattctt
+-----+
tgaaatagttgagtcgtattaaaaaacttcaagttagatccaacacacatgggtcattgtgttaaga
+-----+
ttttgtagaaaaaanaactatttttgcattggaatgcagtagcgttctattgtataattatgtcnaa
+-----+
aaaaactctttctttgataaaacgttaccttagctcattcgcaagataacatttaatacaggtt
+-----+
attgtttttccattctcatatttgatggacacccagactgtcttcagttttgtgttatcaaaaatg
+-----+
taacaaaagggtaaagatttaactacctgtgggtctgacagaagtcaaaacacaaatagttttac
+-----+
aagctactataaacattcatgttcaagccttgggtgccatatgttttcaattgtcttggggcaaat
+-----+
ttcgatgatatttgaatgacaagttcgggaaccacgggtatcaaaaagttaacgagaccctgtta
+-----+
acctaaattgctgggtcatgggttaaatgtatgtgtagacattttttagaagcttttttttttt
+-----+
tggatttaacgaccacgtaccccatttacatacacactctgtaaaaaatcttcgaaaaaanaaaaa
+-----+
ttaacaaaaatgcccaggctatacttaccatgctttttctctcctagtttgccaattttattattta
+-----+
aatgtgttttacggtccgatgatgaattgacgaaaaaagaggatcaaacggttaaatataaat
+-----+
tttattttattttttcttgagacaaggtctcactctgttgcccaggctggagtgcaatggccaca
+-----+
aaataaataaataaaaanaactctgttccagagtggagacaacgggtccgacctcacgtcacgggtg
+-----+

【図 4 - 3】

910
+-----+
acaacgttccactgttccgggtatgggtacactaaaaagcctagatgtaacgttatgcnaatccga
+-----+
975
+-----+
tgttgcaagtgaacaggccactaccatgtgatttttccggtatctacattgacaatacgttaggt
+-----+
1820
+-----+
gcatgtaaaaaatctgcagccgggcttgggttcatgcctgtaatcccatcactttgggagcc
+-----+
1885
+-----+
cgtaactttgttagacgtcggccgaaccaccaagtacggacattagggtagtgaaacctccgg
+-----+
1040
+-----+
aaggcagcaggatttcttgagccaggagttctagaccagcctgggcaacatagtgagacctg
+-----+
1885
+-----+
ttccgtctccttaacgaactcgggtctctaaagatcgggtcggaacctgtgtactcacttcgga
+-----+
1105
+-----+
ctttacaaaaattttaagaatttaggtggccatgggtgggtgacacctcgggtctcagctgcttgg
+-----+
1950
+-----+
gaaatgttttaaaattctttaatccaccgtaccaccacattgtagcgcagagtcgacgaacc
+-----+
1170
+-----+
cgccgtgacatgggaagatcactagagccaggaaatcaaggctgcagttgctcatgactgtgcc
+-----+
2015
+-----+
cgccgactgtacccctctagtgatctcgggtcttaagttccgacgtcacacggtactgacacgg
+-----+
1235
+-----+
actgtactccagccagatgacaagaactatgcttttaaaaaatgaaaatttaaaaaatcctgcac
+-----+
2080
+-----+
tgacatgaggtcgggtctactgtttctgatacgaatttttttacttttaaaatttttaggacgtg
+-----+
1300
+-----+
ttgtacccttgaatataaaaaatagaacagaaacataaataataaataaataaataaataaataa
+-----+
2145
+-----+
aacatggggactttatataatttttatcttctgtctttgtattttattattttttagcgttaagaaa
+-----+
1365
+-----+
acacataaaaaaataaaagtaagacttgaatttagacgattccagaaaaattgtgtacatgtt
+-----+
2210
+-----+
tgtgtattttgtttattttcatttcatgaactttaatcgtcaaggctctttaaacactgtacaa
+-----+
1430
+-----+
tgttccccatacaatttgggtactttgggtctcctttatgaaactgtgaaagctccgagccaaaa
+-----+
2275
+-----+
acaaagggatgttaaacatgaaccagaggaaatccttgacacttccgaggtcgggtttc
+-----+
1495
+-----+
tttgtctttcttcatcttctgcatcttttagtacctatcacatgctttatataatgacacgtg
+-----+
2340
+-----+
aaacagaaagaagttaagaacgtagaatcatgtatagttgtacgaataataactgtgcacgtac
+-----+
1560
+-----+
actatttgtttgtaattggaatgggtatatacatatttcaatagacatttcccaacattctattgg
+-----+
2405
+-----+
tgtataacaacaataaacttaccatatagtataaagttatctgttaaaaggggtgtgaagttaac
+-----+
1625
+-----+
aaaaactttcacacacatagcaaaactgaaagaattttcagtgaaacttgaatttctaccacca
+-----+
2470
+-----+
ttttgaaaagtgtgtatcgtttgacttcttaaaagtcactgtgaaacttaaaagtgtgtgt
+-----+
1690
+-----+
gatttactatttaatttttacgttctttagtttattacatatctatccatgtctgtatccattg
+-----+
2535
+-----+
ctaaagtataattataaaatgacaagaatcaataatgtatagataggtacagacataggtaac
+-----+

【図 4 - 5】

atcatagctcactgcagccctcaatctccagacctcaagtgatccttctgcctctgcctccagagt
+-----+
2500
+-----+
tagttcagtagtgcgtcggagttagagggctgagttcactaggagacggagacggaggtctca
+-----+
2665
+-----+
agatgggacccacagggcagccacacatcaagctatttttttatattttttgttagagatgggg
+-----+
3510
+-----+
tctacctggtgtccgtgcgtgggttagttcgatataaaaaatatataaaaaacatctctacccc
+-----+
2730
+-----+
atttgcattgtggccaggctgggtttgaaactcctgggtcctcaagtgatcctcccaactcggcctc
+-----+
3575
+-----+
taaacgatacacccggtccgacccaaacttgaggacccgagttcactaggaggggttgagccgag
+-----+
2795
+-----+
ccaaagtgtcgtgacgtgcccctggactagcttgcctaatttaaaagaaatccctgagtaagagcac
+-----+
3640
+-----+
gggttcacgacaggtgacgggacgtgacgaacggttaaaattctcttagggactcattctcgtg
+-----+
2860
+-----+
ccaaagtcgctgaatgccttccactcactcggaaattcagagcatcggaggtcttccattc
+-----+
3705
+-----+
gggttcagggcacttcgggaagtgaggtgagccttaagattcgttaggtccttagaaggtag
+-----+
2925
+-----+
catatgatacacacctaccacacactcaacacacagctgactggatgagagaggtactgaacct
+-----+
3770
+-----+
gtatactatgttgggattggtgtgtgagttggtgtgactgactgactactctctccatgacttga
+-----+
2990
+-----+
aaaagtggccactcgcaggttcttagaagcccaagagatagactgttcaaaagatctgggacaaa
+-----+
3835
+-----+
ttttaccggtagacgtccaacagatctcgggttctctatctgacaagttcttagaccgggtgt
+-----+
3055
+-----+
tgggtagacaagaataatcagttccagctaacctccctcttatttaattagaatgagacactgg
+-----+
3900
+-----+
acctactgtttcttatttagtcaggctgattgagggaagaataaataaatttaacctctgtgacc
+-----+
3120
+-----+
aaagagacatttagttaaaagtggacacagaaaggaaaaagacacaaagcaaaagcattcttcaga
+-----+
3965
+-----+
ttctctcgttaaatcaatttccactgtgtcttctcttctctcgtgtgtcgttctcgtagaaggtct
+-----+
3185
+-----+
tttctttgagagcagctaaaattgattggttaaaagacatcgggaattcatgcttttctaaaggaa
+-----+
4030
+-----+
aaagaacctctcgtcgtatttaactaccaatttctctgtacgcttttaagtacgaagaagattctt
+-----+
3250
+-----+
tgagctcttttaggagtttctcttgcacaaagagaataaaaaatccacataaattcggaggact
+-----+
4095
+-----+
actcgaagaatctcgaagagacgtttgttctcttatttttaagggtgtattagacctcgtga
+-----+
3315
+-----+
ctaaggaaaggttagaaaaatccatgttcttgctagtacaggacttagagcttaaaaaattagaga
+-----+
4160
+-----+
gattccttccatctttttaggtacaagaacgatcatgtcttgaacttcagaatttttaactctt
+-----+
3380
+-----+
aattcgtttaagatttatagttttaaataatagaanaaatccaccacactgatccacattgagaag
+-----+
4225
+-----+
ttaagcaaatctaaatatcagaatttttaactctttttaggtgggtgagctaggtgttaactcttc
+-----+

10

20

30

40

50

【図 4－6】

ctggaatgaaataaaaaataagataaattgattaaaaggaataatccctcaatattccacccctg
gaccttactttattttttattcttatactaatfttccctataaaggaggtataaaggtagggac
catccccgacccgtctgcgtctccctctactctcatacatactccagtaataatttggccaaaagt
gtaggggcttggcgagcgcagaggggagatgagagtatgtatgaggtcatataaacgggtttca
agaagccagggggttagaaaaaagaaataggataaaccaagacaaactatcaaggaaagtaaaagga
tcttcgggtccccaattcttttcttattctatttgggtctgtttgatagttcccttcatittct
acatagaggccaacaaaatcctcatgtctcttctccctctcctcgacatagccctgataactag
tgtatctcgtttgttttagggagtacagagaaaagggggaggagctgtatcgggactattgatc
ggaggaagagcatctgtaccgggtgcattccttgaacattccaatgacccgacccatggaaga
cctcctctctgtagacgatggcccacgtaggagacttgaagggttactgggctgggtacccttct
gaacaaaattcttcagccagcttctaggattcttactcaagagaggtctaaaattatgaaaga
cttgggttaagaagtcgggtcgaagatcctagatggagttctctcagaattttaatactttct
tatgtataaaggatgttgcactatgttgtttatcatgtaaaaattgtaaacagcaggttatt
atacatatatttctacaaacgatgatcaacaaatagtagtatttttaacatttgtctccaataa
ggtagagttctctaaaatgagctgtggccgggtgtgtgtgtctacacctgtaatccagcact
ccatctcaaggaaagtttactctgacacccggccacacccagcaggttgagacattagggtcgtga
ttggaggcccaagatgggaggattaccgtaggtcaggagttcaagattagcctagccacacaggt
aaccttcgggttctaccctcctaatggaactccagctcctcaagttctaatcggatcggttgtgcc
gaaccccatctctactaaaaatacaaaaagttagccatgtgtgtggcggatgccgttaatccc
cttggggtagagatgatttttatgttttcaatcgttacacacccagccttaccgacattagggt
agctactgaggtggctgaggcagagaatgtctgaactcgggagggcggagcttgcaagtgcg
tcgatgactccacgcactcgtctctttaaagaaacttgagccctcgcctcgaacgtctactcggc
agatcacgccaactcctctccagcctaggttaacagagcagagactccatctcaaaaaaaaaaaaa
tctagtccggtgaggagaggtcggatccattgtctcgcctctgaggtagagtttttttttttt
aaagaaaaaaatcagctctgtcagtgctacatgtggatttaatgaagcattgaaagttacaaccc
ttcttttttttagtcgagacacgtcacgatgtacacctaatctactcgttaacttcaatgttggg

【図 4－8】

ccagctgattagcattcttttttagtcaaaaagtcagagttatcaaaaggcacggccacagctc
ggctgactaatcgttaagaaaaaatcagtttcttagtctcaatagtttccgtgcgggttgctgag
tgaggcttacaggcnaatgaaaaggtcagacaaaagtctgttctgttttgttgtcttttttttt
acttcgaatgtccgtttacctttccagctctgtttcagcgacaagcaaaacaacagaaaaaaa
tcttcagagcaaaaacaaagtttcttttgtttatttgggttataaaaactcataagattcttgcaag
aggaaagtcctgtttgttcaaaaagaacaataaaaccaaattttttgagttctagaacagctc
agaacagatcctggatttggtgggaagggtccccagcttgctcagtagagcttctcagtttttctat
tcttgtctaggacctaacaccccttccagggttgaacagagtcactctcgaagagtcaaaaagata
ctctacagaaatctacatcagcccataaataagatcggctatgaatgtcttgaagttctctacaa
gagatgtcttagatgtagtcgggtattactcttagccgatactctacgaacttcagagatgtt
aaaaattaatgtacaatagattttccacagtggaagcaataaacagcaataatttgcataatagtg
tttttaataacatgttatctaaaagtggtcaccctcgtttatgtcgttatataacgttatctac
aggaaaacacatttacaatcacaaagagaattaaaagaagcttgagagaccaactagtccaatcc
tcttttgttaaatgttagtgtttctcttaatttctctcgaactctctgggtgatcagggttagg
tcccattaggacatccctccgacaggtgaaggagggaagggggccactagggtatcattcttgtt
agggtaatcctgtatgaggggctgggtcactttctcctctccccgggtgatccatagtgaagaaca
tatccactccagggtttcacagcatctgtatcaggaaagttctttcttaagtttccactggagtcct
ataggtaggggtcccaaggtcgttagacatagtccttcaagaaagaattcaaaagtacccctaggg
tcttgtactatttccagctaatctctcttgtactctctataaaaaggacatcaatctttctt
agaacgatgataaaggctcgattagagaagaacattgagaagttattctcctagtttagaagaaga
aagagctatcttagtcttgttgatgtcgttaatgaattcatgaagaccttctctctccaggt
ttctcgatagaatacagancgaactacagcattactttaagtactcttggaagaagaagaggtcca
tcaatttttaaatccactgggctggcagcagagctggaacttctaaagtcctgaacatagaaga
agttaaaaaattaggtagcccgaccgtcgtcctgaactgaaagattcaggacttgtatctttct
tttataacacagcccttggctgcaaggagcttatgttttctatgggttaagtagattttaaga
aaatatttgtcgggaaccgcagcttctcgaatacaaaaagtaccctattctatctacaaatttct

【図 4－9】

tttttggttaattgcaagggaacctggaatagatctaccacacatgctatcgacctttctaaactt
aaaaccattaacgttcccttggaccttattctagatgggtggtagatagactggaagaattgaa
gtgtgtcagttgcaagggttatttgggtccaccttttttagatgagcaagccaaaggtgaggttcatgc
cacacagtcacagttccaataaacagggtgaaaaacttactcgttcggtttccactccaagtacg
aacgttggccacacctatcacacaggtaaaagcttttggacacagatggcctctgttactcaaggggtc
ttgacaccgttggataatgtgtccatttcgaaaacctgtgtcaccggagacaaatgagttcccaag
ttaccacagtcaaaagggttcttactgcaggtagttcttaagagagaaaaatcaaatgtgcatttc
aatggggtcagtttccacaagatgacgttcatcaagaattctctcttttaagtacacgtaaag
cctttggaataataataactctgaagcacagagagaacctggcacacgacaagggtgatgggtatc
ggaaaccttattattatgagactcgtgtctctcttggaccggtgtcgtgttccactaccactag
acacactagtaaaagaatccagttatgcactgggtaccttctctggcagggccctatgctgagcat
tgtgtgtatcatttcttaggtcatcgtgacccatggaagagacctgtccgggatcacgactcgtat
ttctcatatatttgtctgatttgatctctacaaacagctctagtgatcagtagtactctattatttt
aagagtattgataacagactaaactaggaggtgtgtcaggatcactagtcattgatagataaataaaa
gccccatttgatgggtgagttggagaagctatacaatatataaagctgggtgttgtctcttgg
cgggggtaaactaccacactcaacctcttctgatgtttatatatttgcacccaacacagagaaac
cctttgcatcatcagacagttcacccacgctaaagaataatgatgcgggaacagaaaaagccaa
gaaaacgtagtagtctgtcgaagtggggtcgatttcttactactgcctctgtcttttctcgtgtt
gggttaagggtcacttcagaacttcagaaaaacatttgttgcctcttccaaatttttgatttgttgg
ccaattcccgtagagctctgaaggtctttttgtaaacacagggagaaggttaaaaaccttaacacacc
gacagagaaaaggctgttttaaaaacaattcaagagccaaagacatacaaggttgtttgttcttgggt
ctgtctcttctcgacaaaattttgttaagttctcgggttctgtatgttcacaaacaagaaccaa
tttctttaaatgccttaagctatttttctatctctaaaaaaaagcagagggtagaataattccattc
aaagaaatttacgggattcgataaaaagtagagatttttttctgttcccatctttaaaggttaag
acctgtgactggcctaactctttagcgatcacttagcaactgggttaacaaatggaggttggcgaagc
tggacactgacggattagaatacgttagtgaatcgttgaccatttgtttactctcaacccgttctg
aatgtggcgacagagtgtaattgtgttaaggtcttgacattcttctgttttgaactttgcatttt
ttactaccgtcgtctcacaataacacatttcaagactgtaagaacaaaaaactttgaacgttaa
tgatctctgtccattcgagattaccctatttttccatttcaaaatttttagctatatttttgttac
actatagacaggttaagctctaatgggataaaaaggttaagtttttaaatcgataaaaaacaatg
aaaaattaatctctcatccactgtagggttggggttgggggtgggggtgggttgcaggaataatagaa
ttttaaatgaagaagtaggtgactaccccaaccccccccccccccacccacgtccttattatctt
tgggcctgccactctatgtggcaaatgagacaaaaagaacacaaactgtaccagcatccttgtat
accggacggtatgactaccgttttactctgttttctctgtgttgacatgggtcgtagggaacata
ctataaggaggagaacaaaggaataatttctcggattcaagggtatcaaaatttgaagatgcacc
gatattctcctctgttctcttatataaaggacctaaagttccatagtttttaacattctactgtg
attggttttagtaagggaacaaaaagcaaaaattggaacaaatacaacaataatatacatcacc
taaccaaatcatctcctgttttctcgtttttaccttgtttatgttgtttatatatgtagttg
tggattttagaatgtcaggagaagtgaggggactcttaaggaaatattgctcatttttctactact
acctaaaactcttaccgatcctcttcaactcccgtagaattccttatacagtagtaaaaagtgatga
ttctctctaacagttggcagctgatgatgagtagtgagtgacagtaacagtggggtatccatgc
aagagagattgtcaaccgtcgactactactcatcactcacgtcgatgtgctacccttaattggtacg
accagctccctcgtctgtatgtctgaattattcacattgttcacaaaaagggatatcatttttagccat
tgggtcagggacgacatccgactataaaggtttaacaggtgttttccctatagtaaaatcggtat
ttaacactggagaattgggaggttcaagaaggatccactcttgaccttagagccagcatttaaa
aatgttgacctcttaccctccaagttcttctcctaggttagaacctggaattctcgtctgtaaattt
ctcaggagggtcgtctacagagttcacaatttgttactctctctaagctccctctcgtcttctct
gagttctccgaccgaattctcgaaggttaacaagatgagagggattcgagggaagacagaagaga
gcaaacctgtagtcttcccgctgttcttctgaactctctcttagacacacagacaaggtctga
cgtttggcatcaagaagggtcgacgaagggaacttgagagaggattcgtgtgtcgttccagact
tgactccaattatggacttcccgcatctccagttccactccccctctcctggatcagatccatg
actgaggttaataacctgaagggtcgatgaggtcaagtgagggtgagggacactagcttaggtac

10

20

30

40

50

【図 4－1 0】

agctgttagctcctgaaactgttccacctcagaaacctctatctcaagcccagggtatggctct
+++++
tcgacaatcgaggactttgacaaggctggagctctttggagatagagttcggggtcccataccgaga
+++++
attcccatcacctctctcttccactttcttagtgatttctagaaaaacctttccctccctgctfaca
+++++
taagggtagttggagaagagaagggtgaagatcactaaagatcttttggaaaggagggaagatgt
+++++
gatgccccctaacttgcagacacccctctaagtggtctctgagatagcaacctgatctcttcacagc
+++++
ctacgggggattgaacctctgtggagattcaccaggactctatctgtgactaaggaaagtgtcg
+++++
cttgcatgaaatttaggaagccaggagtgctccagagggaacatggagatgcagagagaaacag
+++++
gaacctgactttaaatccttcgggtcctcacagggtctccggttgtacctctacgtctctcttctc
+++++
gtggctcaggggaggccttagggtcaggaaattgagtcacagagagggtggccctcatcaatagag
+++++
caccgagtcctcctcggaatcccgactcttaactcagggtctctccaccgggggagtagttatctc
+++++
gcaaaacatcaggggccttgaanaattcagcagcaagttctcagcatattgggtccaaaggacaagtgc
+++++
cgttttgtagtcctccggaactttaagtcgtcgttcagagtcgtataaccagggttctctgttccag
+++++
aattagacacatctcaagaanaagatggtgcggaacatctggggagacgctctctatttccacgca
+++++
ttaactctgtgtagagttcttcttaccagccttgttaagccctctcgagagagataaaggtgtcgt
+++++
gagaccagcatgctgggagaggccatcccaccaggagtatgggtagggtctctccctgcaccag
+++++
ctctggctgtacgacctctcgggttaggtgtgtctctatcccatccagagaggagctgggtc
+++++
aggcatatttaggaaaacaggaggagatgcaagacagcttaagttaaccagaaatgactacttt
+++++
tccgttaaatccttttgtctccctctacgtctctgtcgaaatcaattgggtcttactgatgaaa
+++++
aaaccataagaacagaaatattctgtcttggcaggtttaaatagtatccaccccgacctccag
+++++
ttcggtattctttgtcttataagaaacgaaccttcaaatctatcatagggtgggtcggaggtc
+++++
catgtgtagaatggggctctaaacagcagttacagaaagacaaatgaaggccaaatctatgcaga
+++++
gtaacctatttaccgcagagattgtcgtcgaatgtctctgttacttccgggttagatacgtct
+++++
ttgaaatacagcatgatactatcagcatgatttcaagaaagttagagtcactgtggatatactgg
+++++
aaactattgtcgtacatagattagtcgtacataaagttcttctcatctcagtgacacotatagttcc
+++++
aagaagagacggatagggtattgacctgacacaaattgtgggagaagctgggaaggcagagatct
+++++
ttcttctctgtcctatccctaactctgagctgtgttaacacctctctgaccttccgtctctaga
+++++

【図 4－1 2】

agggtttcaagaacagttctgggtgaatcaataactgttctttcaacaaggatggagagcaattga
+++++
tccaaagttcttgtcaagaccacttagttattgacaagaaggttgttcttacctctcgttaact
+++++
aaaggttggtctgacatgaaattgcagttgtggtctgcaatttcttgtattttcaaaacagacc
+++++
tttccaacgcacactgtactttaacgtcacaccgagctttaaggaaacataaaagatttgttctgg
+++++
ttaaggctccagaacattgaaacgctgtgggtgtcattcactcttacaatagccattttcttgg
+++++
aatttccgaggtcttgaactttgcgacaccacagtaagttagaatgttatcggtaaggaaacc
+++++
accgtcttctcttctggatgataaaaagcccaaatgcccaggcactggctgtcttaccatcacaca
+++++
tggcagaaggaaagacctactattttcgggttttacggttcgtgaccgacaggatggtatgtgt
+++++
tagccaggacctgacctgtgtgccaatcttggctcccagcatcagaggggaaagtgtgtgaaaggt
+++++
atcggtcctggacggaacacagggttaggaccgagggtcgtatgtctcccttcaaaccttttcca
+++++
gctgctttctccagataaaaaagaacatcttttccctctcagggttctgcagaagacagctc
+++++
cgacgaaagagggtctatttttctttaggaaaagggaaggatccgaagacgtctctgtgcag
+++++
tgggtggcgtgttgagagctgtgagagaagtgcaggaaatcacagagaagcaaaacccagccctg
+++++
accaccggcacaaactctcgacctctcttcaggtctctttagtgtctcttctgtttgggtcgggac
+++++
tgacctgtctgacattgtgagacaacctgcaaccaccactgcttgattctctctatgcagatg
+++++
actgtgacgactgtaacactctgttggacgttgggtgggtgacgaactaaggagagtacgggtctac
+++++
atcaaggcactcttgggcctgatcatattttaactattccagttttgcaagggatttactgcttt
+++++
tagtttcgggtgagaacccggactattgtaaaattgttaagggtcaaaacgttccctaaagtacgaaa
+++++
ttcgagcccaactggacttaactagagtgcacaagcaagccacttagggccacagaaaaaccca
+++++
aagcgtcgggtgacctgaattgatctcaccgggtctgttcgggtgaactccgggtgctttttgggt
+++++
agtgtctgtatgcaatctccatgctttctcggggtgacctctcatgtttctctgcagacctgc
+++++
tcacgagacatacgttagaggtacgaaggagcccgacgaggagtacaaggagcggctgagagc
+++++
catctcctggctttgctactttctgttgccagagatttgcctgaaaccttggtctctgtgactc
+++++
gtagaggaccgaacgatgaagacaacgggtctcttaaacgagacttggaaaccgaagcagctag
+++++
aatcaatcaggtttggatgtataacacaacttggccttgtcttctctcagataaagaagtc
+++++
ttagtagtccgaacotacataattgtgttgaaacgggaacaacaggaaggtcttattcttcagg
+++++

【図 4－1 1】

ggaaaggggaagtgagagtatcagagaaaactcactgtccagtctcctggaagccctggccaagt
+++++
ccttcccttccactctcatagttctcttttgagtgacaggtcaggaggacttcgggacgggttcac
+++++
tattgatcagagcttctcagagatcagggaagggaaggccaagtctgttggcgtctgaaacagg
+++++
ataactagttctcgaacgatctcttagtcccttccctccggttcacgacaaccgcgacactttgtcc
+++++
atgcagtaggggagctgggagtgtgtgggtagggaagtgtggccactgcagggtctacggccaagt
+++++
tactgtcatccctcgacctacacacctatccctcacaaccggtgacgtccagatgccggttca
+++++
ggctgtgtgttggggccaacatcagaagaagacctggacatggagaggaacagagcaaaagcggg
+++++
cggaccaccaccgggttgttagtcttcttctggacctgtaccttctcttctgtctgtttctgccc
+++++
ctggggcccaacaggcattgccatctgatagtcacgatatacagctgcaaaaggatccagagaa
+++++
gaccgggggtgtccgttaacgggtagactatcagtgctatagtcggagcgtttccctagggtctct
+++++
aaacgaccactatttctctctcgctctcaaacctcatgcaagtgtctcttttggccaactctat
+++++
tttgtgtgtgataaagagaagacggagaggttggagtacgttcacagagaaaaacgggttgagata
+++++
ttaggatccatagaggggaagggttctgaaaaacacagttctctaacatagccagaggtgactgtg
+++++
aatcctagggtatctcccttcccttaagacttttgtgtcaggatgttatcggtctccactgaac
+++++
gaaacatccagcacactgtagtacatttcaatcctgtctcaggatttatagctttaagttattac
+++++
cttgttaggtcgtgtgactcatgtaagtttaggacgaggtctcaaatatcgaaatttcaatgaatg
+++++
acatatgaacacgtggtcaggccaaatagcactggttgtaattcagagaagaacctggaaaaggtg
+++++
tgtatacttgtgcaccgtgcgggttatctgaccaccttaagttcttcttggtagacctttccac
+++++
accttggaaagtggaacccgataattttctatctaaatttttttcatgactgaacattcatcac
+++++
tgagaccttccactgggctcatataaagatagattttaaaaaaagtagctgacttgttaagttagtg
+++++
atagtagctgacgtgtaacagattctccgatgagcaataataatcatctacacatgcgtgtgc
+++++
tatcatcgactgcacatttgtctaaagggtactcgttatataatgaagtaagtgtgtacgacacg
+++++
tgtatccaacattttccccaaaccttctcttctctttagtagagagttctcaaccaggatctgcc
+++++
actatggttgtaaaaggggttggaaaggaaaggaatcatcttcaagagttggctctagacgg
+++++
accttcagttatttcacaacacagtgccggaagagaaaaattccaagcttctctgtgtgcctgcattc
+++++
tggaggtcaataagtgtttgtcaccgcttctctttaaagttcgaaggacacacggagcgttaag
+++++

【図 4－1 3】

atttctctccccatgcatccttctcaccaggtaacctcatgccaccgcttgacatgccaaagc
+++++
taaaggacgggttagctaggaaagtgggtccattggagtagcgggtcggaactgtgacgggttcg
+++++
tgggttctactctatgccaccaacctgttcccaaccacctctctctataggatataaattagatga
+++++
accagatggagtacgggtgggttggacagggttgggtgaggaggataccgtattttatctact
+++++
atggagaccacgtggaactagttccataggactgtgtatacaaaagcttcatgggaattttcttag
+++++
tacctctgggtgacccttgatcagggtatctctgacacatatgtttcgaagtaccttaaaaagatc
+++++
ggtcacacataattttcagttgaacgcagggtgattcagcgtctgcaattctagcactttgggagg
+++++
ccagttgtatataaaaagtcacttgcgtgccactaagtcggcagcttagagtctgtaaaacccctc
+++++
ccaaggcagaaggaccacttgaggccaggagttcgagaccagccagggcaatatagtgagacctt
+++++
ggctcgtcttctcgtgtgaactcgggtctcgaagcttgggtcggtccgtctatatacactctggga
+++++
gtctcaaaaatttaataaaatcaaataaaaataatttttctcctatgtaattctcttagagttga
+++++
cagagtttttaattatttagtttaatttttatataaaagaggatcacatgaaggaatctcaact
+++++
atgcatagacacaaaaagggggaagtttgaanaatcagctatagtaccaagaagaatcaatgc
+++++
tacgtatctgtgggttttcccttccaacttttttagtcgatcatcaggttctctttatgttacg
+++++
ccagagaagggaataataaccaaatctattagagtcaccagactcttctctgtgttaactctagtca
+++++
ggctctctctctattatgggttaagtaactcaggggtcgagaaggagacacaaattgagatcagt
+++++
tgtatttgtttatgtggaggtctctcagtaagttatggggcaactctgatacctgttaaaagga
+++++
acataaacaaatacacacctccagaagatgtcattcataaacccgttatgactatggacaatttct
+++++
tatatgcctttgacaaaacgattttttcttccactacatgctaaatgctgctattatcaatata
+++++
ataacagggaactgtttgtcaaaaaaagaagggtgatgtacgatttacgacagtaatagttatat
+++++
gagaatgtagttaaacttccacagtgggcacagggtgaagatttactgccatcaatttcaaacct
+++++
ctcttcatcaatttgaaaggtgtcaccggtgtccacttctcaagtgacggtagttaaagtttggga
+++++
aaacctgatctcagtcagttattataatttatagttataattaggacatccaatttgtcttgy
+++++
tttgggactagagtcagttcaataattataaatactcaattataactctgtagggtaaacagaaac
+++++
agtttgcacatcattatgcttcaaatgaaaaataagcaggtctgtgggtcctgaattttgttaa
+++++
tcaaacgtgtagtaatacgaaggtgttactttttatctgtccaagaaccacggacttaaaacaa
+++++

10

20

30

40

50

【図 4 - 1 8】

+++++
caccgatgcaagaagt++tatcattggggaagctgtcaggtggaagatttgaggagatacaaggat
+++++
gtggctacgttcttcaaatagttaaccccttcgacagttccacccttctaaactcctctatgttctcta
+++++
aaaggggataaattagtatataggagacaaagaaacaaagattggctgaagaaggcaacattatag
+++++
tttccctatttatcatatatacctctgtttcttgttctggaaccgacttcttccgttgtataatc
+++++
aaagaggttttataagaagccattcaagtgaagaanaataaaggatagactgagagccgattcttt
+++++
tttctccaaaatattcttcggtaagttcacctctttatatctctatctgactctcggctaaagaaa
+++++
gttaaagcgtgcttcttcaggcccttgctcttcccaatctttaccaatcttcagcaatgcagaggga
+++++
caatttcggcacgaaaggctcgggaacgagaagggttagaanaaggttagaagtcgttacgttctct
+++++
ggaacagagagacttcgggagacctgagattcatctgcacacccagaaaggttggtaaaagcagggtt
+++++
ccttggtctctgagacccctcggactcgaagttagagctgtgggtcttccaccatttctgtcccaa
+++++
tggacgaggtctgtctgcctcacagctcttgatccttctccacccacccctcctttgactact
+++++
accctgtccagacagacggagtgtcaggacttaggaaggaggtgggtgggagggaacctgatga
+++++
tagaggagacccagcttgtcttctacttgggacaggggtagccatggaatactaggaacaact
+++++
atctcctctgggttcgaacagaagatgaacccctgtcccatcggtaaccttatgatccttgttga
+++++
taacagttattccagcagctgcctaaggagattttctctgcaagaacagaggataatgaattct
+++++
attgtcaataaagggtcgtcgacggatctcttaaaagagacgttcttcttctctattacttaaga
+++++
cctaagaatgagagaanaatccagaggtaaacagagatgcaaacacccaaaagggtcacagtcac
+++++
ggattctctactctctttagggtctccatttgcctctacgtttgtgggttttccaggtgtcactg
+++++
aacgatagcccagcaagacagcatcgaacgacgagctcgtctgtctttagagaagaggggtgtt
+++++
ttgctatcgggtcgttctgtctgtagcttgcctgcacagacagaganaatctcttctccccaaa
+++++
ttctgagagcctctcactgcagattccctgctgacttggcagctccagcttagcgtcagaggaa
+++++
aagactctcggagagtgactcttaaggagcactagacccgtcgaggtcgagatcgcgagctctct
+++++
ggcaaatgagaccaatttccacagctcttagaagaagacacatccctctctgttatcattctc
+++++
cgggttactctggttaaaagggtcaggattcttctctgtttaggggaagacacatatgtaaag
+++++
tcttgattcactgttttcaactcaacccctgcagcctgcattgagatttgaatttcaaccccttat
+++++
agaaactaaagtgaacaaagtgagtggggagctcggacgtactctaaactttaatgttgggaata

【図 4 - 2 0】

+++++
aacctccttctcctccctgcttctatttctgtatctttgaactttatcatttgccttagacccag
+++++
ttgagggaagaggaggagcgaagttaagagcatagaaacttagaattagtaaacgagatctgggtc
+++++
tgaattctccacaagaattctctttaaagtcacaaactgaatactgagagctcccatcttccaaagt
+++++
actttagagggtgttcagaagaanaatcacgtgttgacttatgactctcgagggttaaaagggttca
+++++
gtgttgggcaatttcagtcggaaaccccaacacagccctttatgacatgccctctggtttcgagta
+++++
cacacaccgttaaaagtacgcttgggtgtgtgtcgggaataactgtacggagaccaaagctcat
+++++
tataacctttgttcttgacacacactcccaaacaggaggcttcacttgcctaaggacagatttatgt
+++++
atattgaaacaaggactgtgtgagaggttgtctccggaagtgaacgagttcctgtcaatacaga
+++++
agacactttccttgttagccaagatctaggactgcacttcacccttcaagaggggcattcgctcac
+++++
tctgtgaagggaacatcggttctagatcctgcagctgaagtgggaagttctcccgtaagcagatg
+++++
tgattgaactccctccccaagttccagcatgctctcatctatgtaggcactggcaggagaaacct
+++++
actaaactgagggaagggttcagggtcgttacgagagtagatacatccgtgacctctcttggga
+++++
cgagagcttttcttcaggacaagggaaggtagtgccttgttccctatctctgggcccagag
+++++
gctctcgaaaagaagtctcgttctccctccatcacgagaacaaaggatagagacccggagggtctc
+++++
tatgagggcacaaaggtacagcagagggtcccaactcttggcctaggcatttcagggtggtctg
+++++
atactcccggttctccatgtcgtctcccgacggttaggaaccggatccgtaaagtccaccagac
+++++
gagctgatattcatccagaanaagggttactatttttcaaacatacatcacacatttgatttata
+++++
ctcgactataagtaggctcttacccaatgataaaaagtttgtatgtatgtgttaactaaatat
+++++
aaatacaagccaggatcaggacttatgcctgtaatccagcactttgggagaccaaggcaggag
+++++
tttatgttcggtccgtactccttgaatacggacatttaggtcgtgaaacccctcgggttcggtctc
+++++
gattgcttgtgttcaggagattgagaccagctcgggcaacatgaagaggcatttgttctttcttg
+++++
ctaacgaacacaagtcctctaaccttggtcggaaccgtgtactctccgttaacgaaaagaac
+++++
cttttttttttttttttttttgaacagggtctcactctgtcacccaggctggggtgcagtg
+++++
gaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaacttgcgccagagtgagacagttgggtccgacccacgctcac
+++++
ggcgattctcgtctcactcacgcttccacctcctgggttcaagtgattctcctgcctctgtctcc
+++++
cgcgttagagcogagtgatgtcgaagtgaggaccgaagtctcaatgaaggaaggagacagagg

【図 4 - 1 9】

14,430
+++++
accttcaagtcagattatccttctttaaagggaaatcaactattgttgaatccccagataatccc
+++++
tggaaagtccaggtctaataggagaatttcccttagttgataaacaactttagggtctattagggt
+++++
14,495
+++++
ccaacctcatttfgaccatttttttgcactgttctccagaaagttcaagccctagactgaaggaa
+++++
gggtggagttaacatggttaaaaaacatgcaggaagggtcttccaagtccgggtctgacttctct
+++++
14,560
+++++
cacatgaagtaaaattgatggctttgaatggaaaatccagccagaatccaacggaacatgggtg
+++++
gtgtacttctatttaactaccgaaacttaccttttagggtcgggtctctagggtggctgtaccac
+++++
14,625
+++++
taccaggggcccaagcatgcttctgttcccacttagctaccgggtccaggggccattctctgtc
+++++
atggctccgggttctgtacgaaggacaagggtgatcgatggccagggtccgggtgaaggacgag
+++++
14,690
+++++
agactcgcgtgggctgtgcagacagccctagaggaggcaggagggttctctccagactggatga
+++++
tctgcaggcaccgggacacgtctgtcgggtctctctccgctcctccaaggagggtctgactact
+++++
14,755
+++++
ggcttgggttaagggtcagcaggcagctgcagactctctcccgagactcagggtcagggcacagct
+++++
ccagacccattcccgctcgtccgtgtcagctctgaggagggtcgtcaggtccagtcctcgtcaga
+++++
14,820
+++++
ggctgcggtcaagggttggatcttaatctccgatttggctctaaaagctgctcaggcagcaccca
+++++
ccgacggcagttccaaacctagaattagaggctaaaccgagatttctcagagctcgtcgtgggt
+++++
14,885
+++++
gtgcaataacttggggcaaaatcaagaagtatctagcaggagaggggttccagaacaactgtgc
+++++
cacgttatgacaccccggtttagtctctcatagatcgtctctccaaagggtctgtgtgacag
+++++
14,950
+++++
cagggggtcctaaaaaccgacatttagccctatggacactagccctggatggtctagaaggccca
+++++
gtccccaggatttttggctcgttaactcggatacctgtgatcggggacatccagatcttccgggt
+++++
15,015
+++++
ggatctacttttaacctgttctccagccaagcaggagcaaacacatctgacttaataactct
+++++
cttaggaatgaatttgaacaaggaggtcgggtcgtcctcgttctgggtgagactgaattatagaga
+++++
15,080
+++++
tgttgaagatctactcgtgtatgtcttctcacagtctctgctagagccactagcatggtacaag
+++++
acacctcttagatggacacatacgaaggagtgctcagagacgatctcgggtgatcgtaccatgttc
+++++
15,145
+++++
tgaacaacagcttgcaggaacggacagctgggagataaaaggggaagaggaaggagggaggg
+++++
acctttgttcgaagctcctgctgtgacccctctatttccctcttctctcttctctcctctcc
+++++
15,210
+++++
agggaaagtggggagtgaaaacagctcttaggtgggcgaagggttaatgaaaatttcagtggtac
+++++
tcccttcaacccctcaacttttgtcagagatccaccggttcccatctacttttaaagtcacgac

【図 4 - 2 1】

16,120
+++++
tgagtagctgggattacaggccaccatcatcgtcctggcfaatttttgtatttttgtagataca
+++++
actctcgacacctaatgtccgtgggtagtagtacggaccgattaaaaacataaaaactctatgt
+++++
16,185
+++++
gggtttcaccatgttggctaaagctggcttgaactctctgaccacagggtgttccacccacctcage
+++++
cccaagtggtacacaccgattcgaccagaacttgaggactgggtccacaaggtgggtggagtcg
+++++
16,250
+++++
ctcccagaagtgtcgggattacaggcgtgagccaccatgctcgtggccaagaggcatgtgtcttacaa
+++++
gagggtttcacgaccctaatgttcgcactcgggtgttacggagccggttctcgttaacagaatgtt
+++++
16,315
+++++
aaaaaaattgtttaaanaattagccagggtggcagtgcatgctgtgtgtaccagctaattgggag
+++++
tttttttaacaatttttaacggtccacacggtcacgtacgaacacacctgtgtgattaacctc
+++++
16,380
+++++
gctgagggtgggaagtttgccttgagccaggaggtcgaggctcagtgagctgtgttcacatgaca
+++++
cgactccaccttcaaacgaaactcgggtcctccagctcgcagctcactcgacacaagtgactgt
+++++
16,445
+++++
ccaectcagcctagggtgacgaagtgaacacctgtctcaanaataaatttaaaagaataaaaataca
+++++
gggtgaggtcggatccactgcttcaactcgggacagagtttatatttaaaatttcttattttatgt
+++++
16,510
+++++
aagtcatttcaagccattactgacttttttaaacattttgttataaatttatttttaaataggt
+++++
ttcagtaagttcggtaatgactgaaaaataattgttaaaacatatttcaataaaaaatttatcca
+++++
16,575
+++++
agatattagaagttcagggtccaggattttttgacatttgaagaacttcaatgtcatattagaa
+++++
tctataacttccaagtcagggtcctaaaaaacgttaaaccttcttgaagttacagtataacttt
+++++
16,640
+++++
cattttggaactactgatccatcacatgaatgctgttctctcctcattccagctcagggtggcatg
+++++
gtcaaaccttgatgactagggtatgtacttacgacaaggagaggagtaaggttcagttccaccgtac
+++++
16,705
+++++
ctgtagctgcagtcacgaatccagggttcccatttatgaacacacagctcattgagctcgtccaaa
+++++
gacgatcgacgtcaggtcttaggtccaagggttaaatacttgtgtgcagtaactcagacgggtt
+++++
16,770
+++++
aatcagcttctgaatttgcagaagttcaaggcttagggaaaagttttaaaggcaactgatgcaaca
+++++
ttagtcgaagacttaaacgtcttcaagttcogaatcccttttcaaatctccgttgactacgttgt
+++++
16,835
+++++
gtcacgcttgaccaatttgcgtgggagctgaaatcacacacataataaataatgacttaaacgtg
+++++
cagtcggaactgggttaaacgaccttcgacttagtatgtttagattatttactgaatttgaca
+++++
16,900
+++++
tctattcagtttataataaacaataaggctcagctccaactcttcccttcccagtgaggatt
+++++
agataaagtcaaatattatttgttattccgagtcgaggttaggaaggagagggtcactcctaa

10

20

30

40

50

【図 4 - 2 6】

ctttatcagccgggtgaaaatgaacaaatgcaggtgggaaaaagggacacgatcagtggaatgga
+-----+
gaaatagtcggggccacttttacttgtttacgtccacccttttctcctgtgctagtcaccatcct
+-----+
acaaggagcactggggctcagaagcagcttggtcagttggggcacacgaatcaagaacatggga
+-----+
tgttccctgtgaccccgagctctcgtcagaccgagtcacacccgtgtgcttagttctttgtaccct
+-----+
aaatggcagctggattgttgagctggaatcaggaatgccagaaaataggatagagggaatcgccag
+-----+
ttacccgtcgacctaacacccgaccttagtctctacggcttttatcctatctcccgttacggct
+-----+
tgttggttcactaaagagagaaggaagaccagctgcgactgcagctgactccattcatttattg
+-----+
acaaccaagtgtattctctctctcgtctcgtggctcgagctgacgtcgactgaggtaaatgaataac
+-----+
aatcatcagcaagcatttactgggcatctcctgcagtctaggccctgcactaggactggggatg
+-----+
ttagtaagctgctcgttaaatgaccctgagaggactgacgtccgggacgtgatcctgacccctac
+-----+
caaaaagtaagaagcattgcccagaagaagaaaattgtgaacacaaacactctgatggaatgg
+-----+
gtttttcatctctcgttaacgggttcttctctttaacacttgtgtttgttgagactacccttacc
+-----+
ctaaatgttcacagaggttacaaggcactgcatagcagagtttaacttctgcctggagaacacct
+-----+
gatttacaagttgtctccatgtttcgtgacgtatcgtctcaattgaagacggacctctttggaga
+-----+
acttgaagtttctctgtctttatcactggccaaaggttggtttaccccgacgctctatctctgg
+-----+
tgaactccaagagaaagaaaatagtcacgggttcccaacaaaatggggtcgcgagataggaaac
+-----+
acttcttgttgtaaaggcttttgggtccagggtctggtatttatgcctgtaatcccagtgctttg
+-----+
tgaagaacacaatctccgaaaaccaggctccgacacctaaatcaggacattagggtcaccgaac
+-----+
ggaggccaaaggcgggaggatcacttgaggccaggagttcaagaccaatctggggaacatagtgg
+-----+
cctccggtccgccccctagtgnaactccggctcctcaggttctggttagacccccctgtatcactc
+-----+
acccttatctctacaaaagtgaagtaaaataatagctgggtgttgtggcacagacctcacttgag
+-----+
tgggaatagagatgttttactcattatttaatcgaccaccaaacccgtgctcgagtgaaact
+-----+
ctcaggagttgagtgacgtgagctatagtcgaccaccaactccatctcgggaacagagcaa
+-----+
gagcttccaaaactcagctcactcgatatcagtagcgggtgggtgaggtaggagccgttgtctcgt
+-----+
gaacctgtccctaaaaataaaaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataa
+-----+
ctgggacagggaattttattttattttattttatttttaaatcaggtaccacacttgaggtt
+-----+

【図 4 - 2 8】

gggatttcacttagggaaagaattatggggcagggggagaaggggaatgaagaatgcagtttca
+-----+
ccctaaagtgaactcctttcttaatacccggttccctcttcccttactcttttaagtcacaagt
+-----+
gatttagcagttgttagcgttgaggcactatttgcagctgaagaggttgagggtattctgattgtg
+-----+
ctaaatccgtacaactcgaaactccgtgataacgctacagattcttcaactccctaaagactaacac
+-----+
aggctgggacagaaagaccagagcccttatggccctacttagagggtgaagagaagctctgcattgaa
+-----+
tcgacccctgtcttcttggtctcgggatacgggaggaatccacttctcttcgagacgtactt
+-----+
actgatcaaggtataagcctgacccaaacgcttttgttaattgggtgatgataagaataccaaaccc
+-----+
tgactagtcccatattcggactggttttgcgaaaacattaacacactactattcttatgttgtgg
+-----+
cttgaagttagaaaaagccctgtaagaagaagggtggggaactagactgccactcactgctgtt
+-----+
gaacttcatctttttcgggacattctcttcccaccccccttgatctgacggtagtgacgacaa
+-----+
catgatgagaagtagaagtgccacagtagattaatcattagcagtgatagaagtaagagaggca
+-----+
gtactactcttcatctccaccgtgcatcctaattagtaactgctactatcttcatctctccgt
+-----+
gaatcctagtcaaggctgtagaagaattgggaaggatgtgttgcccttcgggtgacgtgaattag
+-----+
cttaggatcagtttcgcacatcttctaaccttctctacacaagggaacgccactgcacttaact
+-----+
tttcaggcacagagaccagaaaagataggggagaaggaagggaagaacaatagagagttagat
+-----+
aaaagtcctgtctctgggtcttttctatccctcttcttctctcttcttgttatctctcatcta
+-----+
aaatagataactcttagaaaagagacaaaataaattagatcaatgtcnaaataggaacaaatagtctg
+-----+
ttatctattagaacttttctctgtttatttaattctagttacagttttatcccttgttatcagac
+-----+
gaagaatgaagaatgggggttaaccagaagaacaatgaactttctctgaatgggagacgaag
+-----+
cttcttacttctacccccattgggtctcttctgttaacttgaagaagacttacccttgctttc
+-----+
caaaagaagggtcaagggaattggttcacaaaaataatgaaggatgaatgtttaacgcaagctttta
+-----+
gtttcttcccagttctctaacagtggtttatttacttctcacttcaaaaattgcgttcagaat
+-----+
aaaaatgttagaaaaatgcaaaaggagtaaatcacagtatgcacatgaatgtgaagaattaccagc
+-----+
ttttatacatcttttacgtrtttctcatttagtctacagtgacttcatctttaaaggttcg
+-----+
tataataagggtataacatgaattaaatgaatgtttttagggccagatcaagaccaggttgttgc
+-----+
atattattcccaatagtacttaatttacttcaaaaactcccgtgctagttctggtgcaacaacg
+-----+

【図 4 - 2 9】

atgctatacttgaactcacatgctgaattccatctccaacctgatttctccaagctccatctc
+-----+
21,190 taccgatgaacttgagtgtagcacttagaggttagaggttgagctcaaggaggttcgaggttagag
+-----+ 22,035
ctaggctgtcacttccagctgtctccttaggcattggaatgcctacatgtcaacctttttatctcaac
+-----+
21,255 gatccgacagtgaaaggtcgacaggagatccgtacctacggatgtacagttggaataatagagttg
+-----+ 22,100
atgtccaaaagcagattcattttcttccatatttttaactatataagctaattggcttttactatct
+-----+
21,320 taccaggtttctcgtctaaagtaaaagaaagtataaaaatttagtatattcgattaccgaaatgataga
+-----+ 22,165
aaacatccttccagacatttttggctcttctcactcactttccatttctgtagtcaccagaatct
+-----+
21,385 ttgttaggaaggtctgtaaaaaccgagaagagtgagtgaaaggttaagacatcacagttgcttaga
+-----+ 22,230
cttattcttactcccataactatctctcacttggccttttctctctgtaaccactgccttcagca
+-----+
21,450 gaataagagtgagggatttgatagagagtagaccggaaaagagagacattggtgacggaagtcgt
+-----+ 22,295
acactccactatgctggctccttcagacaattagaagttgtaggggagaatggatgagaaggggt
+-----+
21,515 tgtgaggtgatcgaaccgagggaagctgttaactctcacactccctcttaccactcttctccca
+-----+ 22,360
aaaggccctaggctggcctgtcaccaggctctgcaccagaattcaactggttttgaatggtcaay
+-----+
21,580 ttctccgggattccgaccggacagtgccgagacgggtcttaagttgacacaaaacttaccagtttc
+-----+ 22,425
caaaaaaacactcatgaccatctctgaatgtcagactaaggacatttgactttatttggctggc
+-----+
21,645 gtttttgggtgagtagctggttagagacttacagctctgattcctgtaaacgaaataaacgacgc
+-----+ 22,490
catgaggagcgcggaaaagctttttagagagatgtgattgaatcagaggtatgcattaaaga
+-----+
21,710 gtactcctcgcgccttttcgaaaacatctctctacactacattagctccctacgttaattcttct
+-----+ 22,555
ttaatttggcagtagcttatagaagaattataggaanaatagatagcagtaaggagatcagct
+-----+
21,775 aattaaacgctcatogaattatcttcttaataataccttttacttaactgcttctcttagtcga
+-----+ 22,620
aggacataattgcaaaaggccatatgattaacgggaaggttgcactcagttggcagtttgga
+-----+
21,840 tctgtattaaagctttccggataactaattgtcccttccaaacgtaagtcacccgtcaacacct
+-----+ 22,685
aaacagaagtacagagtaggggaataattttggaataagagttggtattacttttgaagttcga
+-----+
21,905 ttgtctttcattctctactccctttataaaacctttatctcaaccataatgaaaaacttcagact
+-----+ 22,750
tgttaaggagggcagaattcaagcatttaactcttgaggttctatccttgactagccaggataata
+-----+
21,970 acaattccctccgtttaaagttcgttaattgagaactccaagataggaaactgactcgttctattat
+-----+ 22,815
ttttcccttaagcaagcttagcacatttctcctcccggtggaattgttctcagtcagaaggtggg
+-----+
22,880 aaaaagggaattcgttcgaatcgtgtaaaaggaggaggccactacaagaagtcagttccaccccc
+-----+ 23,725
aaagactaaggacagaaaggcatttagggcacgaggtgagagaaacgactgagcacaggacacaggc
+-----+
22,945 tttctgattcctgtcttcgttagatccgtgctccactctcttctgctgactcgtgtcctgtgtccg
+-----+ 23,790
tggtagggagaagataagtgaaatcccaataggagtgctgagggtccaggatctcttgatcagatg
+-----+
23,010 accatcccttctattcacttagggtttatctctcagacctccgaggctcttagagaactagttac
+-----+ 23,855
agggaactggtaccactgaagaaagctcaagagaagtgacattgcttaggagaaccagatcccaa
+-----+
23,075 tccctgaccattggtgactcttctcaggttctcttcacgtgaacgatcctcttgggtcttagggt
+-----+ 23,920
ctaagacgaagtacagagagcacttagggcactgattgagggtactggcgaatttagccacggtg
+-----+
23,140 gattctgcttcaatgtctctcgtgaatcccgtagctaacctccatgacgcgttaaatcgggtccac
+-----+ 23,985
ggattgaagttgtctggttagtcagtggaaggttgggcggaggagttcaagtgagcacaagagag
+-----+
23,205 cctaacttcaacagaccatcagtcaccttcttaaccgacctcctcagattcactcgtgttctctc
+-----+ 24,050
cagaagcctgagaagtcagggaagaggaggaggtttgcacctgtgaggataaaggcgatggagc
+-----+
23,270 gttcttcggactcttctcagtccttctccctcctcaaacgtggacactcctatttctcgtacctcg
+-----+ 24,115
ctgagttgtaggtaaatcccttttgttcaactcaggtctcaggatccagccaaactggaaaaactcag
+-----+
23,335 gactcaacatccagttagggaanaacagtgagttcagagattcctaggtcggttgaccttttagtgc
+-----+ 24,180
tcatacttctccatctcagagggtgaagcagatcaacctaaacattcctctattgttccattct
+-----+
23,400 agtatgaagaggttagagttccctactctgtctagttggatttgtaaggagataacaaggttaaga
+-----+ 24,245
cgtggtccatttgtctaagactgtctcttcaggacaccaaaaggccttgtttgaggaagcatgt
+-----+
23,465 gcaccaggtaaacagattctgacagagaaggtcctgtggtttccggaaacaaactcctttcgtaca
+-----+ 24,310
gtttgttcggagacatcgaattaaagttaaacttgcgtgtgtctcctaagcctctgcctttaata
+-----+
23,530 caaacacgctcctgtagcttaatttcaatttgaacacagagaggttcggagacgggaatttat
+-----+ 24,375
gtgaatgacttcccttgtcataaattgaacttctcagtttacttggatgttactttgattcactat
+-----+
23,595 cacttactgaaggaacagatttactttagaagttcaattgaaccttcaactgaacactaaagtga
+-----+ 24,440
cttaggtctctgtcagggaacctaaagatgttgcctctctaatcctcttgggtcctaactagaga
+-----+
23,660 gaatccagagacagttccctggattctatcacaggagagattagggaacccagagatttgatctct
+-----+ 24,505

10

20

30

40

50

【図 4－3 4】

ggatgtgcaggtttgttacataggtaaaagtgtgccagggtgttgcacacagatcatcccat
cctacacgtccaaacaaatgtatccattttcacacgggtgccaccaacgatgtgtctagtagggta

cacctaaagttagtaagccacgcgtccatttagctattcttctgatgctctccctccccacttggc
gtggattcatcattccgggtcgacggttaactgataaagaaggactacgagaggggagggtgaacgg

cctcctccagcaggcccgatgtgtgtgtgttcccccactgtgtccacggttttcatcatttcagc
ggaggaggctgtccgggtcacacacacaaagggggtacacagggtgcacaaaagttagtaagtcg

tcccacttataagtgacaacatgtgggttaattggcctctgtttctgcggttcgtttgctgaggata
aggggtgaatattcactgttgtacaccattaacccgaagacaaagacgcaagcaaacgactcctat

atgtcttccaaactccatccatgtccccgcaaaaggcatgctcatttccctttttatttctgcata
tacagaagggtgaggtaggtacaggggcggttctcgtactagagttaaggaaaaataaagacgtat

gcattccatgggtgtgtgatgcacacatttctttattcaatttatcatgtatgggcatttgggtt
cgttaaggtagccacacacatcgggtgtaaaagaataagttaaatagtaactaccgttaaaccaa

gattccatgtctctgctatttgtgaatagtgtgcattgaataatacgcattgcatgtgtctttataa
ctaaggtacagagacgataaacattatcacgcgcttaactatatacgctacgtacacagaaatatt

tagaatgatttatattcctttgagtatataccagctcatgggattgtcgggtcaaatggatttcc
atcttactaaatataaggaaacctcatatagtgggtcagtaacctaacgaccaggttaccataaag

tgcctctagatctttgaggagttgccacactgtcttccacaatttgtgaactaatttacactcac
acggagatctagaaacctcccacgcgtgtacagaagggtgttaacaacctgatttaattgtgagtg

accaacagtgtaaaagcggtcccttttctctgcaacctcaccagcatctgtgttttttgacttt
tgggtgtcacattttcgcagaagaaaaagacgcttggagtggtcgtagacaacaaaaaacgtaaa

ttaatagtagccattctgcagggtgtgagatgatactcagtgtagttttgatttgtatttctct
aatattatcatcggtgaagactgtccacactctactatagagtcacatcaaaactaaacataaagaga

aaggaccagtagtggtgagcatttttcatacgtacatatcttataaatttaattataaagcaat
ttcctggctcactacaactcgtataaaaagtatgcattgataagaattatttaatttaaatatcgtta

ttagggccacatgcctctctgtgtagctcccatagtgatggctagctagcacagtggttcacatt
aacttcogttagcggagagaactatcgagggtatcactaccgatcgatcgtgtcaccgagtgtaa

【図 4－3 6】

caagggagttctcaatggttgttcccaaccaggttggccccaaaattcaaccaagaanaactcaaa
gtccctcaagagttaccaacaagggttgttcccaaccgggggttttaagtgtgtctttgagttt

ctacaattacaacaaaaataaafatggtctaatataatataatcctagataatgtttgcctttacttg
gagttaattgtttttatttataccagatttaattatattaggtctattacaaacggaaatgaac

gatggctattttacatggacaagggaagaagggaagataagggaanaaggctttttatgtgtttatt
ctaccgataaattgtacctgttccctcttccctctctattcccttttccgaaaaatacacaaataa

caacaattggcggaggaggagcatgccagataaaggcagacacgggcattccaaacacagaanaaggt
gttgttaccgctctctctcgtacggtctattccgctgtgtgcccgtaagggttgtgtcttttcca

BspEI

atgtgtcgcagagaagtcagataaactttcctaggctctcctgcagtcggatgaaatactctcaa
tacacgacgtctcttcagctctattgaaaggatccgagaggagctcaggcctactttatgagagtt

SrfI

aaaattagcccgggccctttgtccaatttttgccttacctagcaacctctcaactatttaattaa
ttttaatcgggcccgggaacgaggttaaaaagggaatggatcgttggtagattgataatttaatt

attgttattatggttttaacatgaattcttttatgatattgcttaccattaatcaaaccccgaggc
taaccataataccaaaatttgtacttagaaaatactaaacgaatggttaattagtttgggggtccg

ttattcacctcaagggggagctgacaanaattgaattattcaacctgcaaaagatccagggcccccaa
aataagtgaggttccctcgcactgtttcaacttaataaagttggacgtttctaggctccgggggtt

atactgtcaatttccactctccctcaacccccaccatgaggccagttctcagcactcggccagcct
tatgacagttaaaggtagagggggattgggggtgttactccgggtcagagtcgtgaccggtcggga

atgcccaactcgggggtaatcagcttagacatatataattatagtgggcatttcagtatcaacagat
tacgggttagccccaattagtgcactctgtataattataaatacccgtaaaagtcatatgtgtcta

cactgtctagcagctgacaggccacctcagaaaaataaccaagaagaanaagggtttatctataata
gtgacagatcgtcgactgtccgtgggagctttttatttggctctcttctccaaatagatatattat

tcaaaattttctatagataaaacctgccattataaggaaagggcagaagaaccttaactaaga
agttttaaanaagtatcatttggacgggttaataattcccttctcccgctctcttgggatttgattct

gccaggcaactgttctatttaactcacagcatattccatagaaggaggagaanaattgtgtcatcaaat
cgggtccgttgaacnagttaattagtgtcgtataaggtagcttctcctctcttacaacagtagttta

【図 4－3 5】

27,950 aggaagatgcttaatagttgcttcttttaaatagttgtcgaatttaaaatattctctcagttc
tcccttctacgaattatcaacgaagaaaaatttaactaacgacttaaattttatagagagggtcaag

28,015 caagggttgaagaaaaatagaagttagccaaaatctatatctgaaccacgcacaaatggattatggc
gttccaaacttcttttatcttcatcgggttttagatataggacttgggtcgtgttaccataatccg

28,080 cacagaatcagtagcagctgatctaagggatatgtaagtacagacacagagtcacaaaaataatc
gtgtcttagtcatgtcgactagattccctatacattcatgtctgtgtcagttggtttatttag

28,145 cctcttaattctgcgtggcgcatgtacacataccccaatgcagtcctcttggtaaatgggtaag
gagaanaattaagaccgaccgcgttaactgtgtatggggttagctcagagaacacatttaccacattc

28,210 ttattaaatatcgcaaggatgtgtttggagaggaaaatggatatatacatatcaggtatccagaag
aataatttatagcgttccacacaaacctctcctttaccatataatagtagtccataggtctctc

SniI

28,275 gccacaccccaacttctcttctcttcgcagatcatggccagagggccacctaagttggcctccaa
cgggtgtgggttgaaggagggaagggaagcgtctagtaccggtctctccggtggattcaccggaggtt

28,340 ctttgagcttgttttctacactagctgcattagagctccggggggaaggcgggggggtggataaa
gaaactcgaacaaaacgatgtgatcgacgtactctcgaggccccccttccgcccccaactattt

28,405 agaagcccaaggaacctgccaaatagattcttttaaaaaataccttaaaaaatttaacctctct
tcttcgggttctcttggacgggttatctaagaaaaatttttatggaatttttaaatttgaaggga

28,470 cttttgtctgcatatccaccccataggtaggggtggatgagcttttgatattctagaagccaaa
gaaaaacagcgtataggtaggggtatccatcccaccactactcgaacctcattaaagattctcggttt

28,535 actattaactgtgtcttaataactgtttatggataaaaactcttcaacagtggtgtgactactaaga
tgataattgacacagatatttgacaaaacacctattttaagaattgtgcacacacctagtgtattct

28,600 cagatcgaacactggaccaagacatgggtgtcttgcctgaatcatcagagctactgataacac
gtctatgtctggaccgtgtctgtaccacagaaaggacttagtagtctcgtagactatagtgtg

28,665 aaaaatccccagatagtgacagggtgtgttctcaagccatgggtgagactgaagttgccactcttg
ttttagggggtctctactgtccacacaagagttcggtaaccactctgacttcaacggttgagaac

28,730 gttatacagtcaccaaatatggggcatggcagcacacaggctaaagattgtggaagattcttata
caatatgtcaggggtttatacccggtaccgtcgtgtgtccgattctcaacacctcttaagaatat

【図 4－3 7】

29,640 tcatctttttcacctcaataaacatctatgctacagctccacagtcagattgagagaaaaaca
agtagaaaaagtggaatttaatttgttagatcagatgtcgaggtgtcagcttaaccttctcttttgt

29,705 gtacgtagctaaagaaagacatagactgttaactgaaatgcttcactgggtgctccttttgtttta
catgcatcgattctttctgtatctgaaacattgaccttacgaagtgaccacagggaaacaaaaat

29,770 aggcattggattctcatagctactgatcgtgcccaagcacacagatctcgcagcaaccacttagg
tcctgaacctagaagtatcgtagctagcacgggttcgtgtgtcatagacgtcgttggatgaatcc

29,835 cctcaggaaatgtggtagccattgaccttaattcctccttcatggattcctatgaacctcc
ggaggctcttacaccactggttaactgggattaaagtaagggaagtagcttaggatacattggtagg

29,900 tccaaaaagagctttcgaaactcaaataaaccagggaagggaagaccttctatctttgagagt
aggtttttctcgaaagcgtttgagtttatttgtgtcctttcctctggaagaatagaaactctca

30,015 atatgttttagccctataacccctctcttatacaaaattgcttcttaggcaagaacacttgatttt
tatacaaatcgggattatgggagagaatagattttaacagaagaatccgttctttgtgacctaaaa

29,965 tcttgtatttgtcaattgocattgggttccatacaagcattcaatttaacaaaataacatttccatt
agaaacataaacagtaacggtaaccaagggtatgttcgttaagtaaatgttttatgttaaggtaga

30,030 ccggtttttgtcttttctctatgcttccggccttgggtttctctcaccataaacacatacaagctt
ggcaaaaaacgaaaaagggaattacgaagccggaaacaaaagagagtggaatttgtgtatgtcgaa

30,095 cttctccagagctctcactttgactccagactacactacatttaacttttaattctctaccaaaa
gaagagggtctcgagagtgaacctgaggctcgtatggagttaatttagaanaattaagagatggtttt

30,160 ttttctcttatctttatattcttttaatttttaattttattttttgtggatatactagtaggtgtat
aaaagagaatagaaatatagaaaaattaaaaataaaaaaacacctatgtatcatccacata

30,225 atatttatggggtacatgcgaattgtttaatacaggcatgcgaattgaaataaggacatcatggag
tataaataccctatgtagttacaaaattatgtccgtacgtttacactttatccctgagtacctc

30,290 aatggggttaccatctcctcaagcatttatcttttcagttacaaaacaatccaattacactcttta
tcccccataggtagaggagtctgtaaatagaaaagtcaatgttgttaggttaatgtgagaat

30,355 ttttaaaaatacaaatatttaattatagtcactctgttgtgtctatacaaatagtagactttattct
aaaatttttatgtttaataatttaattcagtgagacacacgtagtttatcatctagaataaga

30,420

10

20

30

40

50

【図 4 - 3 8】

ttctattttttgtaccctctcgctcttttatattaaaaataatctttatctctgtaagcttcat
aagataaaaaacatgggagagcagaaaaataattttttattagaaatagagacatttcgaagtta
cagtgattttccaatgaaatttaggatcttctctataccctgaattgccttactttctccocact
gtcactaaaaggttactttaaatccttagaagagatatgggacttaacgggaatgaaagaggggtga
tccctgtcttattcaaatgcagatttccattaatgatttccagatcaatgatagttcagaaagcaa
aggaacagaataagtttaacgtctaaagttaattactaaagggtctagttactatcaagttcttctgt
gcaagtcaaagtgaccaagggtcagccctgaaacctgttctaaagaggaatttcacagaacaact
cgttcagtttcactgggtcccgtaaccggacttttgacaagattctctcccttaaatgtcttctgtga
attaaatgatgtcaataggattgtattagtcggttttctacgggtataaagaactgcctgagac
taatttactacagttatcctaacataactcaggcaaaagtatccgatatttcttgacggactctg
tgggttaattataaaggaaagggtttaattgactcacagttcagcaaacactgggcaggcctcag
accatataatatttctttctccaaattaacgtagttcaggtcgtgtgacccgtccggagtc
gaaacttacaatcatggttagaagggtgaagggaagcaaacacacttctcacaaggcgtcaggaa
ctttagaatttagtaccattctccacttcccttctgttctgtggaaggaggtgttccgcagtcctt
gaagtccaagcaaaaggggaaagcccttgtaaaactaccagaacctgtgagaactcaatcac
cttcacggttcgtttcccccctttcggggaaacttttgatggtcttggacactcttgagttagtg
tatcacaagaacagcatgagggaaaccgcccctcgtgattcaattacctccacctggctctctccct
atagttcttctgtctactccccctggcggggagacctaagttaattggagggtgacacagagaggga
tgacacatggggattatgggtgttacaattcaagatgagatttgggtggggacacaaagcctaac
actgtgtacccttaatacccaacatgttaagttctactctaaaccaccccctgtgttctcgattg
catatcaaggtacaagtgggtgggttgaactaacaggtatgagatatatcagatacaacacaggg
gtatagttccttagttcaccaccaactttagttgtctactctatattagttctatgttgtgtccc
tcccatatttgggttaaaattcataaattgatcaagcacaggtatgacagataatattaggtcattt
agggtataaacccaattttaagtatttactagtttctgtgtctactgtctctattatocagtaaa
tagattattgtggccacagcatcacagttgggtagttgtatgacgaaggaggggtcacagttaacta
tatttattgtggccacagcatcacagttgggtagttgtatgacgaaggaggggtcacagttaacta
atcctaataacacgggttgtctagttgtcaccatcacaaactactgcttccctccagtgtaagtat

【図 4 - 4 0】

ggattctctcctgaggtcatagattgtgaacaaattctattagttatgtctttacagcaagatag
cctaagagaggactccggtactctcaacttgggttaagataaatcaalacgaaaattgctgtctatc
tgggttacagcttacaaaaggcttgatactctctcatattaaaagttattagaacagtcctttg
accnaatgcgaattgtttccgaacatgtaggaaggtataatttcaataatcttgttcaggaaac
aagtagaaaagtaggcatttctattttacaaacaggttggccaggtatctgagatagtagataac
ttcactcttctatccgttaaaagataaaatgtttgtctaacccggctcatagactctatcatctattg
tcatagaaggcttccgggaaacggggcagcagaactggatcgaatgactctgggtcatccaact
agtatcttccagtaggccccttgcocctgtctttagacctagcttacttgagaccagtaggttga
ccaaatgcaaaagtcttctctgtctgtcttcttagttaaacctctaagggtctaagactccattcc
gggttaagttttcagaagaagcagcagcaaggataaatttgagattccagattctgaggtaagg
tagttatgggtctcaactacatttgcctatttgtgtgaggggtcaaccacacttccggagttctct
atcaataccagagttgatgtaaacaggttaacgacactccccagttgggtggagggcctcaggaga
cctgcacattctcatgttccctgaaaggctttctgtcccttccactactccctgtaagctccgtg
ggacgtgaagagtacaaggacttccgaaaagacaggggaaggtgatgagggaacttcgaggaca
ggttcacaattctctgttgaattttttctaatctgactctatcagttatgggaattgttccctcaa
cgaagtgttaagaacaacttaaaaaagattagactgagatagtcataacccttacaagggaattt
ttcttagtgcctcaaacccgagcttgccttggcctgttatttgtccaaaatatttgtcttctctat
aagaatcacgaggttggcctgaacgagaaccgaacataaacaggttttataaacagagaagata
gttttctacatgtttgtcttataaaggacaaaacctgccttagtttatccatgaacaaagccagc
caaaagatgtacaacagataatttccgtttttggacggaaatcaaataggctacttgtttcgggtgc
catgtagtggaacacacacacatgcgctgcgcgcgcgcacacacacacacacacatatacac
gtacgataccctgtgtgtgtgtgtacgcgcgcgcgcgcgtgtgtgtgtgtgtgtgtatgtgtg
agagactttgtatgtgagtaaatgaatcatcaaatcatcataaatttctggacttgtattaataagt
tctctgaacatacacctcatctacttagtatttagtagatttaaaagacctgaacataaattattca
cggccaggaggaagaaatctgctgtcaatcatggcttctgggtctcagagtcactcttactttc
gcccgtctctcttctttagacgcagtttagtaccgaagaccaagaggtgtcagtagagatgaag

【図 4 - 3 9】

31,330 cagttacagatggatctgggtacaacatttgcaactaaagtgcctttgccaaggagggaacagtt
gtcaattgtctacttaagaccatgttgtaaactgtatttcacggaaacggttccctccgttgtca
31,395 ctcgacactcctgtggcctgatctacttcagggaactgtgtcttgttcagagcatcacatttgaaga
gagcttaggacacccggactagatgaagtcctgacacagaacaggtctcgtagtgtaaactct
31,460 gaaacttgaccaagggggaatatgccagaaaaggaagtctgggatgtcaggatcttaggaactat
cttgaacatgggtcccccctatcgggtctttccctcaagccctacgactcctagaatccttgata
31,525 gtctaacaagattcatttcacagaagtgggaattgtctatttggcaaaaagaaatactacttaca
cagatttgttctaagtaagtgtcttcacccttacagataaacggttttcttttatgatgaattgt
31,590 tggctgttgggaagcagcaatcacaaactcagtttttcaaaaggctgggcagaaacacagatga
accgacaacctctgtgtcgttagtgttgagtcaaaaagtttccgacccgtcttctgtgtact
31,655 aagaacacggccatgtttaagaanaagataaaagctcacgcatgatagccactagagaatcacct
ttcttgtccggtacaatctcttctatttctgagtgctgtactacgggtgactctcttagtggga
31,720 agcctcagtggttggcggggaggcctggggagttcttgatgtctgagagtgacattctgatgatcac
tcggagtcacaaccgcccctcgggacccctcagaactacagactctcactgttaagcactactgtg
31,785 tgtcatgtgtaaatgttggcctaagctgccaatatttttgatttaagagaagcaagaaatgcac
acagttacatttacaaccggatttcgacggttataaaaaactaaattctcttctgttcttcaagtt
31,850 attttatgcagcatgttccaatttttaatttggcnaactattacaaaatgtttaagagactct
taaaaaactcgtcgtacagagttaaaaattaaaaccggttgataattgtttcacaattctcttgaga
31,915 gtgcagcccaataataacatatctatgggtgtagggcagccacgcttgccagttccaggggtct
cagctcgggtttatattgtatagatacccgactaccgtcgggtgcgaacggtcaaggtgccagga
31,980 acaagagatgattcttagtttcaacagggtgcagttgctgaacgcggtgcacagtagattttgctt
tgttctctactaagaatacaagttgtcccacgtcacgacttgcgcagctgtcatcttaaacgaa
32,045 cggttatgaagaacttccaaattttatgatttcatagccagagaaaaggctctctatccaggtt
gccaaactcttctgaagggttataaatactaaagtatcgggtctcttccgagagataggtccaa
32,110 ctgaacaataggaataatcatcaaggagatattggatgacaatatatgaagatgtttatttgagaaa
gacttgttatcctttagtagttctctataaactactgttatatacttctacaaataaactcttt

10

20

30

40

50

【図 4 - 4 2】

gtgacctaaactggttcaaatgacctatttaagaatatttcatagaaacgaattgtccgatgctctaatt
cactggattgaccagtttactcggataattcttataaagttatcttgcctacaaggctacgagattta

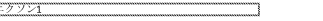
ctctctagacaagggttcatatttgtagtgggttacttattctctctcttcttGTTGACTAAGTCAATAAT
gagagatctgtttccaagtataaacataccocaaatgaattagagagaaaCAACTGATTAGTTATTTA

CAGAATCAGCAGGTTTGCAGTCAGATTGCGACGGATAAGCAGCCTAGCTCAGGAGAAGTGAGTAT
GCTTAGTCGTCGCAACGTCAGTCTAACCGTCCCTATTGTCGGATCGAGTCCTCTTCACTCATA

AAAAAGCCCCAGGCTGGGAGCAGCATCAGACAAGTCCACTCATTCTTGGCAGGATGGCTTCTCAT
TTTTGCGGGTCCGACCCCTCGTCGGTAGTGTCTTCAGGTGAGTAAGAACCCTCTACCGAAGAGTA



CGTCTGCTCCTCCTCTGCTTCTGCTGACTG6TATTTTGTGTCTGAAGGCTGGCCCTACGgtgagtg
GCAGACGAGGAGGACGGAACGACCTGACCATAAACACAGACTCCGACCGGATGCCacttcaca



ttctgtgacatcccatttctacatttaagattcacgttaaatgaagtagaagtgactccttccag
aagacactgttaggtagaaggtatgaattcttaagtgcatcttacttcatcttcactgaggaaggct

ctttgccaaccaagctttttattactaggccaagggtaccagcatctatttttaataataatttaatt
gaaacggttggtcgaaaaatgaatgccgttcccatgggtcgtagataaaaaattatattaattaa

caaaccttcaaaaagaatgaagtccactgagcttactgagctgggaacttgaactctgagcattct
gtttgaagtttttcttacttcaaggtgactcgaattgactcgacctgaacttgagactcgttaaga

acctcattgtcttgggtgcattagggttgttaaatctggtaacctgtgttctctcagatagatgata
tggagtcaacgaaccagtaattccaaacattatagacctggagacaaaaggagttctatctactat

gaaataaagatatgatatttaaggaagctgttaatactgaattttcagaaaagtatccctccataaa
ctttatttctatctataaattcccttcgacaattatgacttaaaagttctttcatagggaaggtatt

aatgtatttgggggacaacgtcgaggagatttatattctggccctatagttattcaaaacgtatttt
ttacataaacccccgtgttgacgtcccttaataataagcaggatcaataaagttttgcatataaa

attgtataatctttaaagggttagtgaacaatttcttagtcagatattctaattctttaaactctc
taactaattagaaaattttccgaattcacttgttataaagtcagtcctatagattagaatttaggag

【図 4 - 4 4】

aggtcacagtatgccctctgaaggaatgccctctttttgttttgccttagctaggaagtgaccaggaa
tccagttcatcagggagacttctcagggagaaaaaacaacgaatcgactcttcaactggtcctt

cttgagcatcattttaggggcagacagttagagaaaaaaggaaatcagaactcctctcctctagctg
ggactcgtagtataatccccgctgctcatctctttcttctcttagcttgaggagaggagatcgac

tggtttgcacaccttttgggtcacagacactttatgtagggtgatgaaaagttaaacattctatgc
accaaacgttgggaaaaacccagtgctctgtgaaatcacctcactacttttcatttgaagatcgc

ccagaaaaatgcacagatcacacacacatacaaaatcatatattgtgattttaggagtttcacaga
gggtctttttacgtgtctatgtgtgtatgttttagtataatcactaaaatccctcaaggtgtct

ttccctgggtgctccctgggttaacacaaaggctaagtgctcttgccttagaattttaggaaaaagta
aagggaccacagggagccacttggtttcgtattcagaggaaacagaattttaaattcctttccat

taatgtgtattaacccatttaacaaaaggaaaggaattcagaaaattatttaaacaggcatctgtgc
attacacataattgggttaattgttttcccttcccttaagctcttataataattgggtcgttagacag

tgtagtttaattggatcacccaaaacccaaggcttttgcctaattgaacactttggggcacctact
acatcaattataacctagtggttttgggttccgaaaaacggattacttgtgaaaccccggtggtga

gtgtgcaaggctgggggctgtcaagctcagtttaaaaaaaaagatagagagatggatccatga
cacacgttccgaccccgacagttcgagtcatttttttttctctatcttctcactcagggtact

ggcaaaagtacagccccaggtaattccacgatcacccgacttcatgtccaagagtggcttctcac
ccgttctatgtcgggttcgattaggggtcgtagtggttgaaatcacaggttctcacccgaagatg

cttcattagccagttcacaattttcatggagtttttctacctgcactagcaaaaacttcaaggaa
gaagtaatcgggtcaagtgtaaaagtaaccttaaaaagatggagctgtagctgttttgaagttccct

aatacattatttaaatctaaagcaaggtgaccagagagacagaaatcaggagaccctttgcatc
ttatgtataattatttagattcgtttcactgggtcttctgtctcgttagtcctctgggaaacgtag

cagcagaagaggaaactgctaagtatttatacttccacagagaagaatttctgttgggttttaatt
gtcgtcttctccttgacgatttcataaattagagggtgtccttcttaagacaacccaaaattaa

gaaccccaagaacccatgattcttcaaccattattgggaagatcattttcttaggtctggtttt
cttgggttcttgggtgactaagaagttggtaataaccttcttagtaaaagaattccagaccaaaa

【図 4 - 4 3】

34,710 tagaagaatttaactaatactataaaaaatgggtcggatgtagttctgacattattttataacaact
35,490 atcttcttaattgattatgatattttaccagagacctacatcaagcattgtaataaaattgttga

34,775 ggtaagaggggagtgactatagcaacaactaaaaatgatctcaggaanaacctgtttggcccatgta
35,555 ccattctccctcactgatatacgttgttgattttactagagtccttttggacaaccgggatacat

34,840 ttggtacattacatcttttcagtaattccactcaaatgagagacttttaacaagaacactgtttctca
35,620 accatgtaatgtagaaaagtcatttaaggtaggtttacacctgaaaaattgttctgttgacaagagt

34,905 ggggacctatttttctcccttaaaattcattatacacatccctgggttgatagcagtggtctggag
35,685 cccctggataaaaagagggaattttaagtaatatgtgtagggaaccaactatcgtcacacagacctc

34,970 gcagaaacattcttgccttggaaaacattacgtctgtgttatactgagtaggggaagctcattaa
35,750 cgtcttggtaagaacgaaacctttgttaatgcagacacaattatgactcatccctcgagtaatt

34,970 **Sall**
ttgtcgacacttacgttctcgataatgggacagtggtgtaattcttgtttctgccagatttcta
35,815 aacagctgtgaatgcaaggactattaccctagtcacacatttaagaacaagcagggtctaaagat

35,035 ataccacaagaataaaactcttccactctgatcaattttgttaactctcacgtgtcttctctac
35,880 tatgggtttctctatttaggaagtgagactagttaaaacaattgaagagtgcacagaagagt

35,100 **AgeI**
SgrAI
accacggcaccgggtaattccaagtgctctctgatgggtcaaaagttctagatgctgctcgaaggcag
35,945 tgggtccgtggccactTAGGTTACAGGAGACTACCAAGTTTCAAAATCTACGACAGGCTCCGTC

35,165 **エクソン2**

35,230 TCCTGCCATCAATGTGCGCTGATGTGTTTCAAGAGGCTGCTGATGACACCTGGGAGCCATTG
AGGACGGTAGTTACACGGCACGTACACAAGCTTTTCCGACGACTACTGTGGACCTCGGTAAC

35,295 **エクソン2**

35,360 CCTCTGGgttaagttgccaaaagaacctctcacaggacttggttttatcttccggtttgcccttca
GGACACCCattcaacggtttcttggagggtgtcctgaaccaaaatagaagggaacacgggaggt

35,425 **GA459**

36,140 ctgtgtagagagaggctcacatcatctgctaaagaatttacaagttagattgaaaaacgtaggcag
gaaacctctctcccgagttgtagtagcatttcttaaatgttcatctaaactttttgcatccgtc

【図 4 - 4 5】

36,205 aactgctcttttatttgggaattcattatgtttatataaaaaatgcaagcataacatgaaaagt
ttgacgcaaaaaataaaccccttaagtaatacaaatatattttaccggtcgtatgtgactttcac

36,270 gttcacaggactatttctaaggagagacagaattggacacacaaaaatctcaatgttcttgtgaat
caatgtcctgataaagattccctctctgtcttaccgtgtgttttataaggttacaagaacactta

36,335 cttttccttgcaccaggacaaaaaaaagaagtgaaaagaagaaggaggaggggcataatca
gaaaaggaaagctgggtcctgttttttttttcttccacttttcttcttccctccctccgtattagt

36,400 gagtcagtaaaagacaactgctatttttattctatcgtagctgtgtgcagtcacaaagggaagcaatt
ctcagtcatttctgtgacgataaaaaatagatagcatgcacaacgctcagtttaccctctgttaaa

36,465 ccaacattcaactatggagctgggtacttacctggaataaagaagttgcctagtggtttgtgtctggc
gggtgttaagttgataacctcgaccatgaattgaccttattcttcaacggtacacaaacacgaccg

36,530 aaagagttatcagagaggtttaaataataaaaagggaagagtcagatcacaggttcttcttcta
ttctcctaagtctctccaatttatatttttcccttttctcaggtctatgtccaagaagaaggat

36,595 ctttaggttttccactgtgtgtgcaaatgatactccctgggtgtgtgagatgctcctcaagctat
gaaatccaaaagggtgacacacagcttactatgagggaacccacacgctcagggatttcgata

36,660 cctcacaccacaagggaaggagcgagatcctgtgtcctggagaagtcagagttagaacagct
ggagtggtgttccctctctctgcttaggacgacaggacctcttcaagttcctaatctgtcga

36,725 gtggccacttgcattcaatcatcaatttgaatcacaggaccttcttctaagtaaacattatcac
caccggtgaacgtaggttaggttagtagtagaacttagtgtcctcgagagaagaattcatttgttaatg

36,790 ctggccgggacaggtgggtcagccgttaatccagcactttgggattgcaaaaggggcatatca
gaccggccgtgccaccaggtcgggacattagggtcgtgaacccctacggttccaccgtatagt

36,855 tctgaggtcaggagttcaagaccagcctggccaacatgcaaaaactccgcttttatgaaaattac
agactccagtcctcaagttctggtcggaccggttgtaccgttttagggcagaaatacttttatg

36,920 aaaaaatagccagcagctgggtgcagcgcctgttaattccagactaattgggaggtcagggtcgag
tttttaatcgttcgtaccaccgttcgcgacattagggtcgattaaacctccgactccgacctc

36,985 aatcccttgaattcaggagggcagaggttgcaagtgagatcgtgccattgcaactccagcctg
ttagggaacttagatcctcgttctcaacgtcactcgactctagcaggtgaactgtagggtcgac

10

20

30

40

50

【圖 4-47】

38.610

29.675

39 740

32.00F

39-036

【圖 4-49】

40,300

10,365

10,430

10,495

40,560

40,625

40,690

10,755

40,820

40,885

40,950

41,015

41,080

【図 4 - 5 0】

gactgggacaataacaataattcaagtcctggtttgtctcatctgtaattgggaagaatgtttccag
ctgaccctgttatgtttatttaagttcagaccacaaacgagtagacatttaaccctctttacaagggtc
ctccagaatgctaaatctcctaagtcgtggtttggcagccactattgcagcagctcttcaatgact
gaggctttacgatttagagattcagacaccaacgcgcgtgataacgtcgtcgagaagttactga
caatgcagttttgcatctccctaccctttttttctaaaaccaataaaatagatacagccttttag
gttacgtcaaaacgtaagagggtggaanaaaagattttggttattttatctatgtcggaaatc
gctttctgggatttcccttagtcaagctagggtcatcctgactttcggcgtgaatttgcaaaaca
cgaaagaccctaaagggaatcagttcgaatccagtaggactgaaagccgcacttaaacgttttgt
agacctgactctgtactcctgctctaaggactgtgcattgttccaaaggcttagcttgccagcat
tctggactgagacatgaggacgagattcctgacacgtaccaaggtttccgaatcgaacggtcgtg
atttgagctttttcctctgttcaaacgtttccaaaataaaaagaataaaattaattaagtgg
taaacctgaaaaaggaagacaagtttgacaaggttttatattttctattttaattaattcaacc
cactggacttcgggtggtcagtcagtgtgtcatctgacggttttcgggctcgtggtgaaatg
gtgacctgaaggccaccagtcagtagacacagtagacagtgcaaaaagccgagaccacctttac
gactctgtctgtctctctcatagGTGGTATTCACAGCCAACGACTCCGGCCCCGCCGTACACC
ctagacagacgaagagagattaccACCATAAGTGTGGTGTCTGAGGCCGGGGCGGCATGTGG
エクソン4
ATTGCCGCCCTGTGAGCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCTCACCAATCCCAAGGAATG
TAACGGCGGACGACTCGGGGATGAGGATAAGGTGGTCCGACAGCAGTGGTTAGGGTTCCTTAC
エクソン4
AGGGACTTCTCCTCCAGTGGACCTGAAGGACGAGGGATGGGATTTTCATGTAACCAAGATTTCC
TCCCTGAAGAGGAGGTCACCTGACTTCCTGCTGCTACCTAAAGTACATTGGTTCTCATAAAG
エクソン4
ATTTTACTAAAGCAGTGTTTTCACCTCATATGCTATGTTAGAAGTCCAGGCAGAGACAATAAAA
TAAAAATGATTTCGTACAAAAGTGAGATACGATACAATCTTCAGGTCCGCTCTCTGTTATTTT
エクソン4

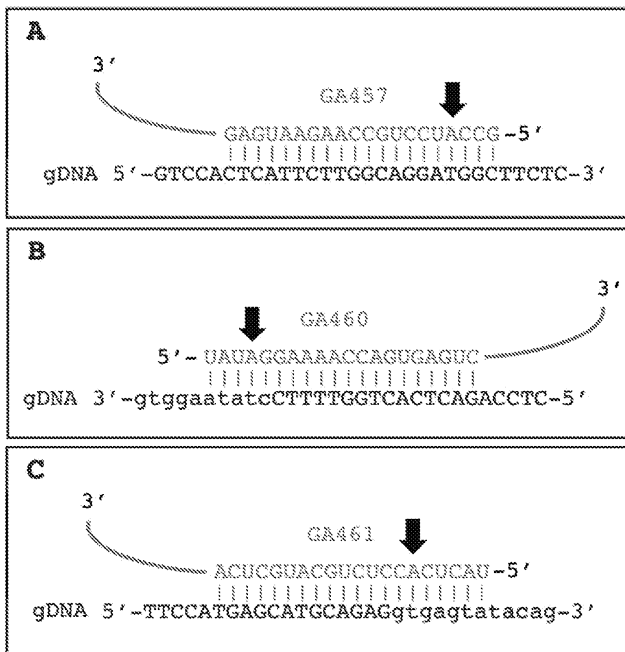
【図 4 - 5 1】

41,145 終了(41,824)
CATTCTCTGTGAAAGGCACCTTTTCATTCCA 3'
41,210 41,824
GTAAAGGACACTTTTCCGTGAAAAGTAAGGT 5'
41,275 エクソン4

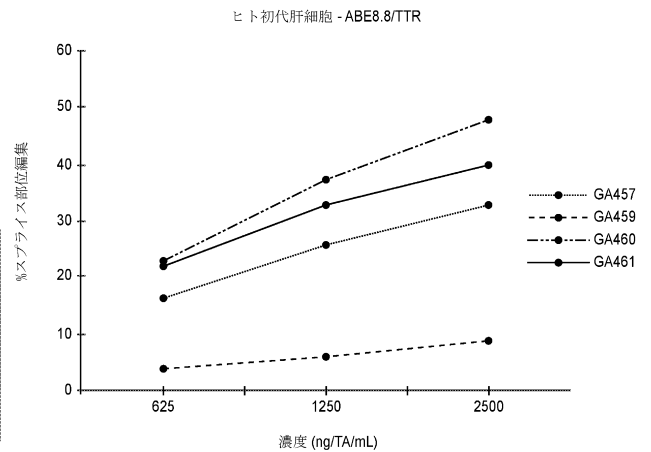
10

20

【図 5】



【図 6】

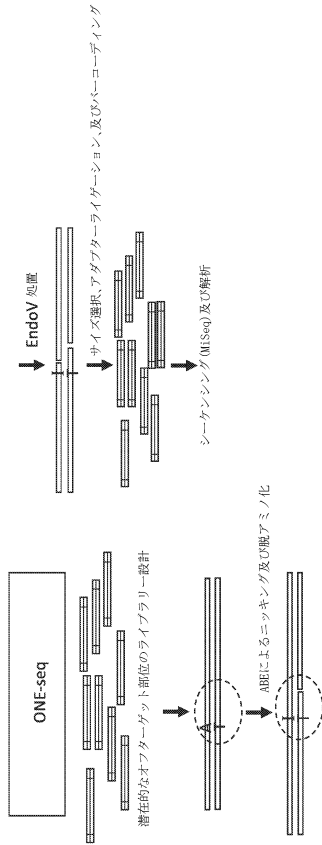


30

40

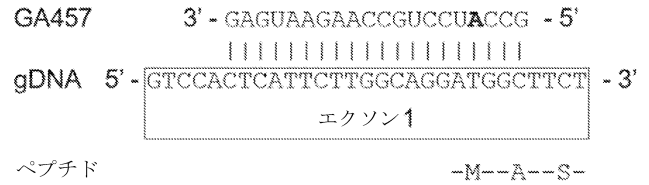
50

【図 7】

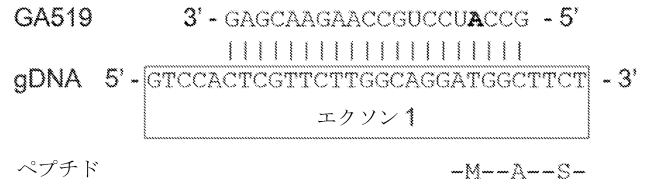


【図 8】

ヒト

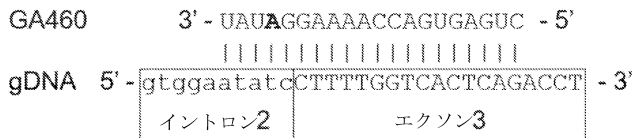


カニクイザル

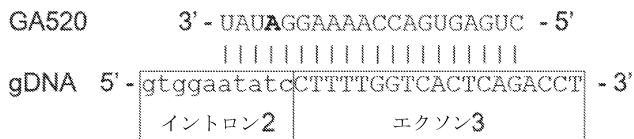


【図 9】

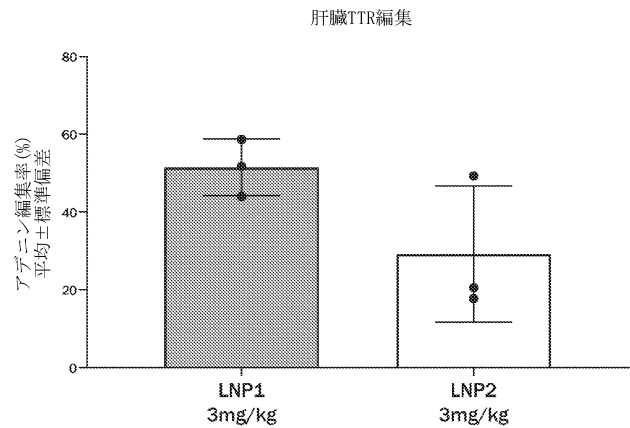
ヒト



カニクイザル



【図 10】



10

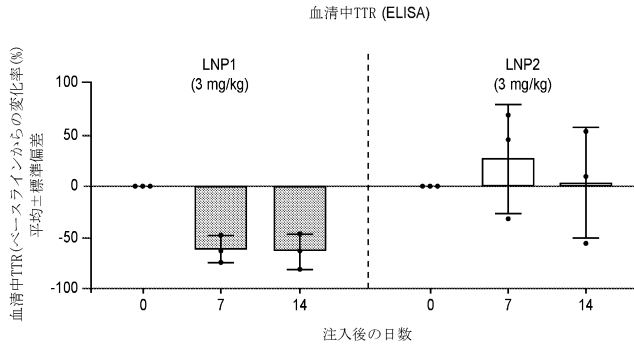
20

30

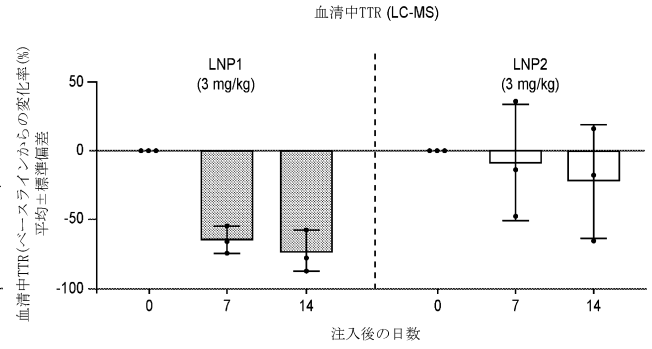
40

50

【図 1 1】

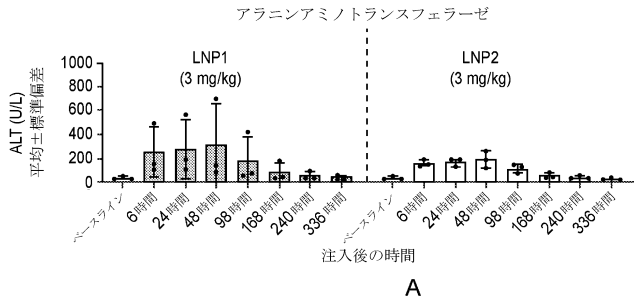


【図 1 2】

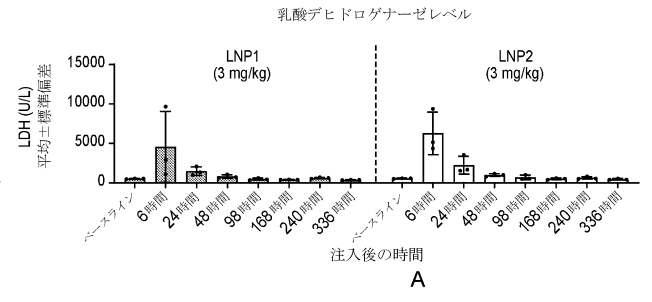


10

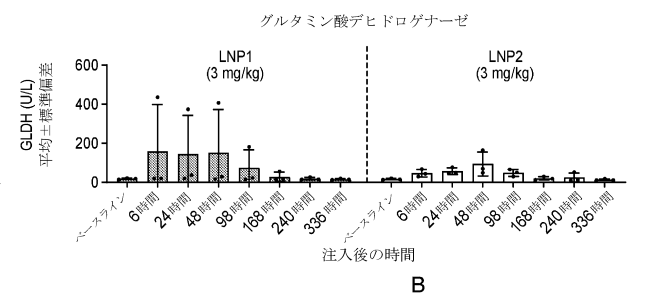
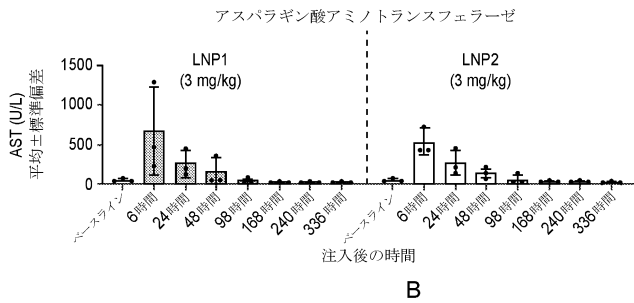
【図 1 3】



【図 1 4】



20

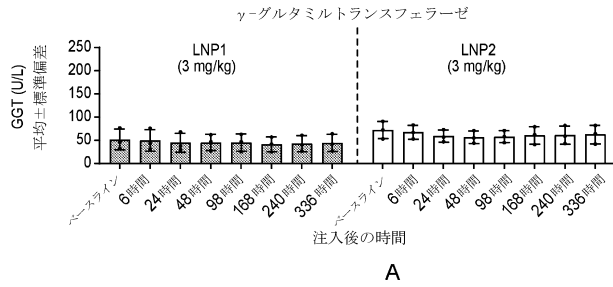


30

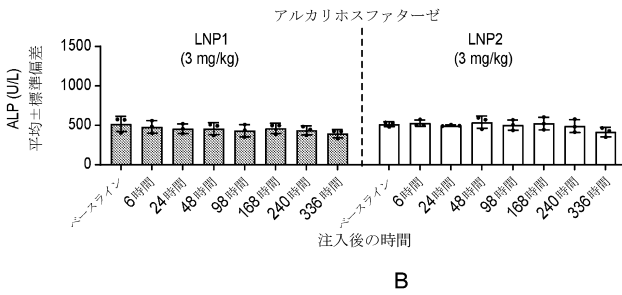
40

50

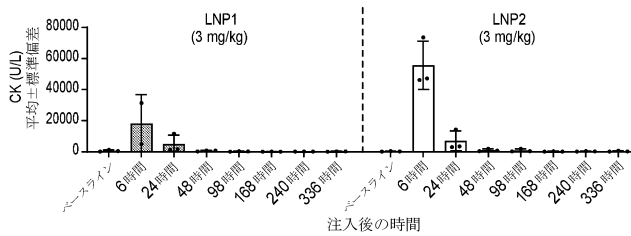
【図 15】



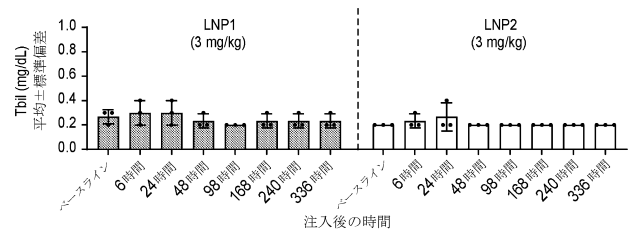
10



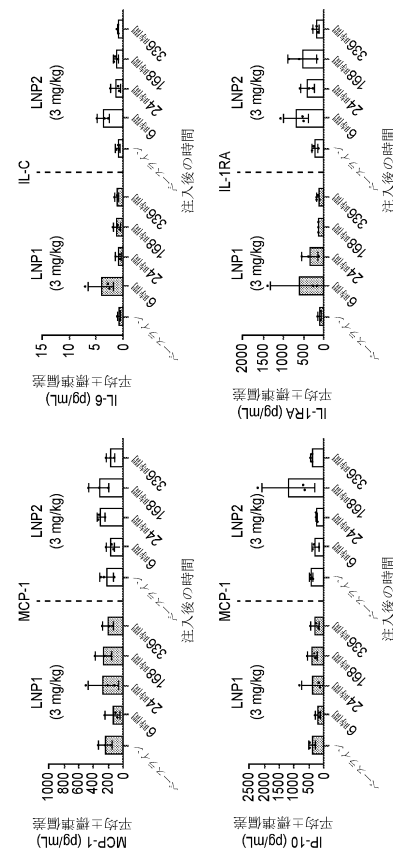
【図 17】



【図 16】



【図 18】



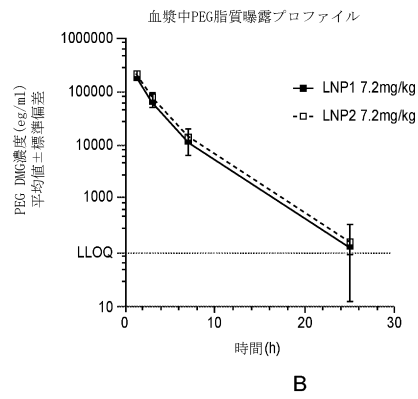
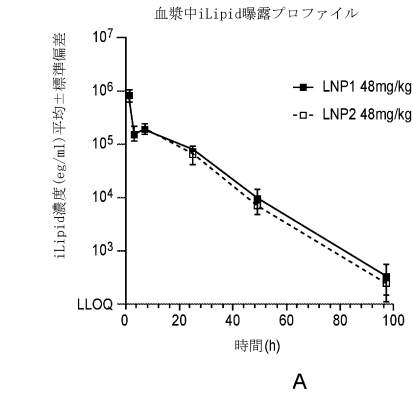
20

30

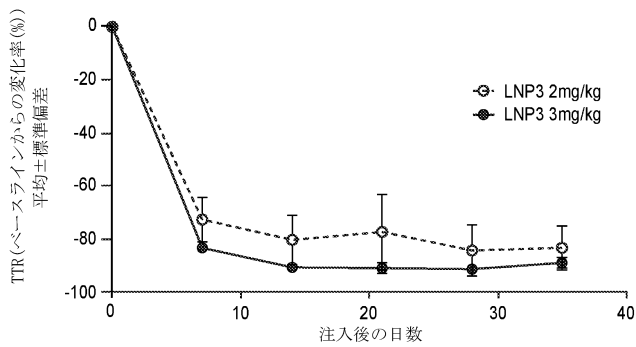
40

50

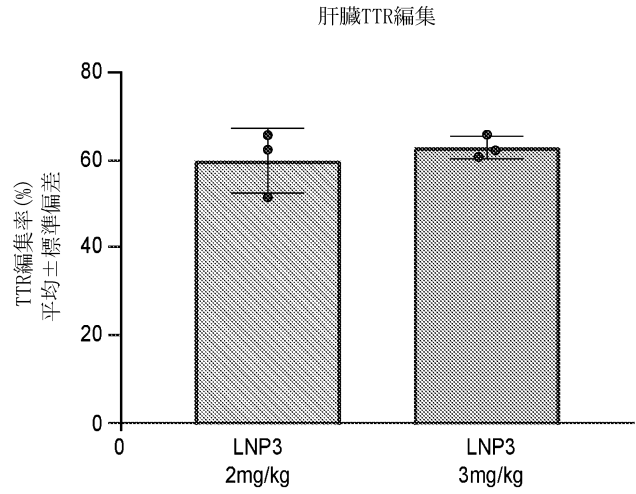
【図 19】



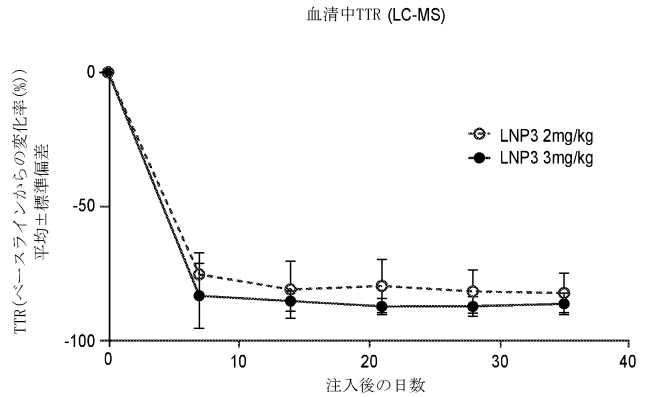
【図 21】



【図 20】



【図 22】



10

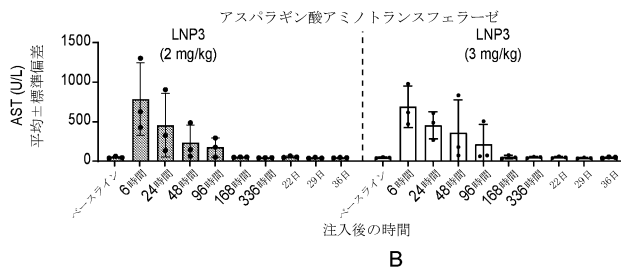
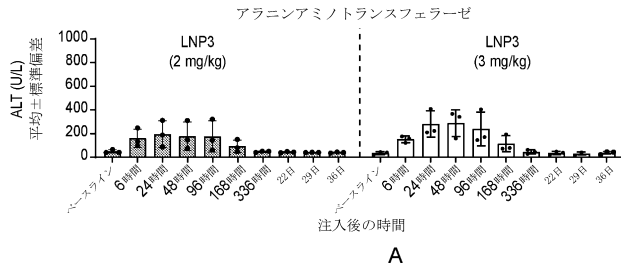
20

30

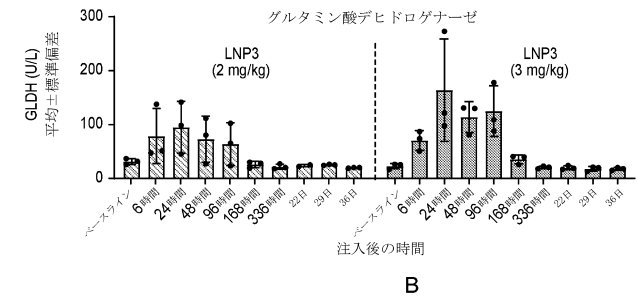
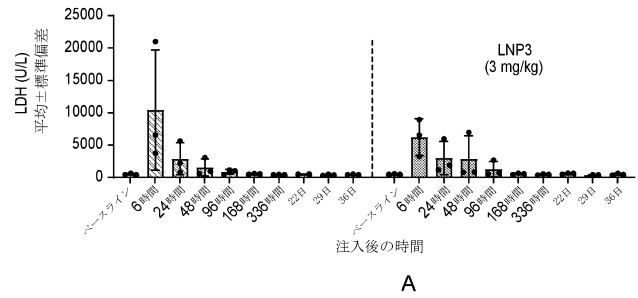
40

50

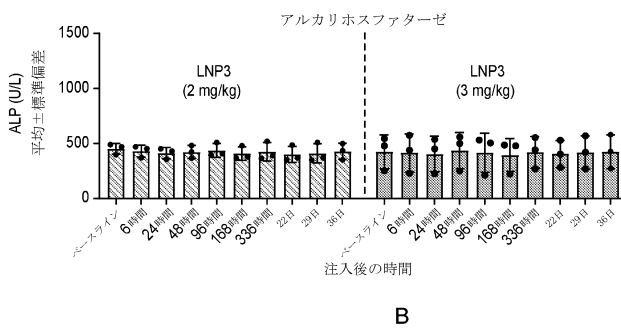
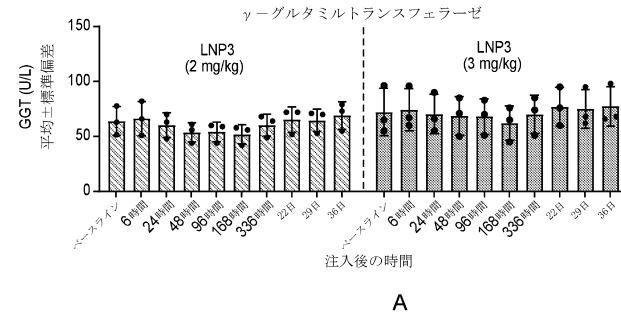
【図 2 3】



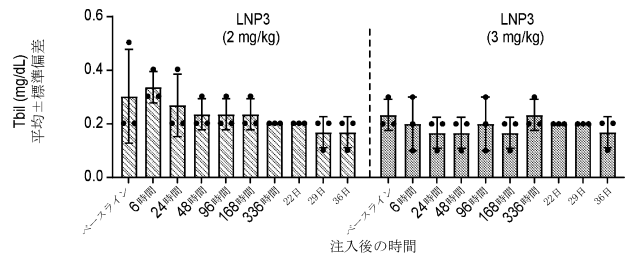
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



10

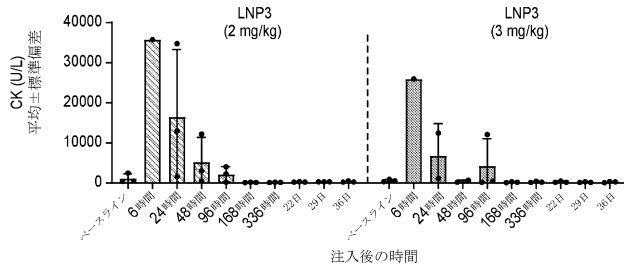
20

30

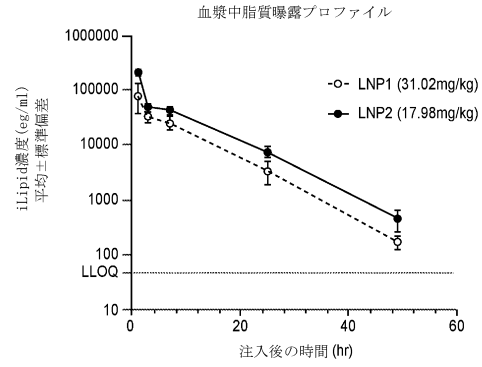
40

50

【図 27】

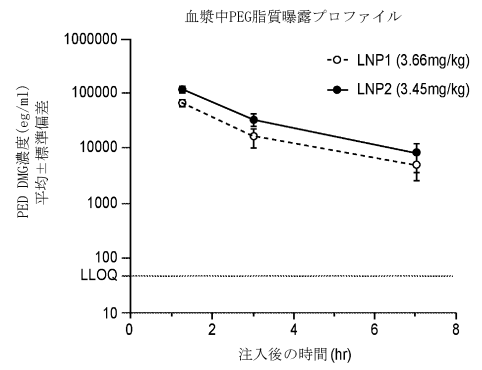


【図 28】



10

A



20

B

【配列表】

2024519922000001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/30359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 9/22; ADD. C12N 9/78, A61K 31/713 (2022.01)

CPC - INV. C12Y 305/04004, C12Y 305/04005; ADD. C07K 14/4702, C07K 2319/09

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/226953 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC. et al.,) 28 November 2019 (28.11.2019) Abstract; Claim 15; Claim 78; Claim 80; Claim 82; para [0008]; para [0026]; para [0028]; para [0034]; para [0037]; para [0065]; para [0084]; para [0235]; para [0278]; para [0320]; para [0367]	1-3, 29-34 35
Y	MUSUNURU et al., In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. Nature. 19 May 2021, Vol 593, No 7859, pages 429-434. Abstract; p430, col 1, para 2	35

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 July 2022

Date of mailing of the international search report

SEP 01 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/30359

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:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/30359

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.: 4-28, 36-44
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:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	
A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 1 2 N	9/78 (2006.01)	C 1 2 N	9/78	

,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,D
K,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),O
A(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,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,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,Z
A,ZM,ZW

(72)発明者 ラジーブ、 カラントッタティル ジー。

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ テクノロジー スクエア 5 0 0
スイート 9 0 1

F ターム (参考) 4C076 AA19 AA65 CC50 DD15F DD15H DD49F DD49H DD70F DD70H EE23F
EE23H FF21 FF43
4C084 AA02 BA44 DC22 NA14 ZA011 ZA012 ZA361 ZA362 ZB211 ZB212
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA36 ZB21