

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-515503
(P2025-515503A)

(43)公表日 令和7年5月15日(2025.5.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	Z N A	4 C 0 5 7
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 7 6
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0	4 C 0 8 6
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全166頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-563706(P2024-563706)		(71)出願人	515025398	
(86)(22)出願日	令和5年4月28日(2023.4.28)			ザ ブロード インスティテュート, イン	
(85)翻訳文提出日	令和6年12月19日(2024.12.19)			コーポレーテッド	
(86)国際出願番号	PCT/US2023/066389			THE BROAD INSTITUTE	
(87)国際公開番号	WO2023/212715			, INC.	
(87)国際公開日	令和5年11月2日(2023.11.2)			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0	
(31)優先権主張番号	63/336,064			2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン スト	
(32)優先日	令和4年4月28日(2022.4.28)			リート 4 1 5、ルーム 7 0 0 3	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			4 1 5 Main Street, Roo	
(31)優先権主張番号	63/389,796			m 7 0 0 3, Cambridge, M	
(32)優先日	令和4年7月15日(2022.7.15)			assachusetts 0 2 1 4 2	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			United States of Am	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		(71)出願人	507044516	
		最終頁に続く		プレジデント アンド フェローズ オブ	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 塩基エディタをコードするAAVベクターおよびその使用

(57)【要約】

例としてAAVベクターを介して、細胞へ塩基エディタ(または「核酸塩基エディタ」)を送達するための核酸分子、組成物、組換えAAV(rAAV)粒子、キット、および方法が本明細書に記載される。特に、本開示は、シングルAAVベクター(またはゲノム)におけるアデニン塩基エディタおよびシトシン塩基エディタの送達のための組成物、方法、および使用を提供する。本明細書には、さらに、例として塩基エディタのパッケージングを可能にするサイズが最小化された調節構成要素を含有する改善されたAAVベクターが記載される。本明細書においては、単一の組換えAAV(rAAV)ベクターにおいて細胞または組織へ塩基エディタタンパク質を送達するための方法および組成物が提供される。本明細書においては、単一のrAAV粒子においてin vivoでこれらの塩基エディタを送達するための改善された方法および組成物が企図される。さらに、本明細書においては、塩基エディタ、ならびにこれらの塩基エディタを含む組成物および細胞を提供する。

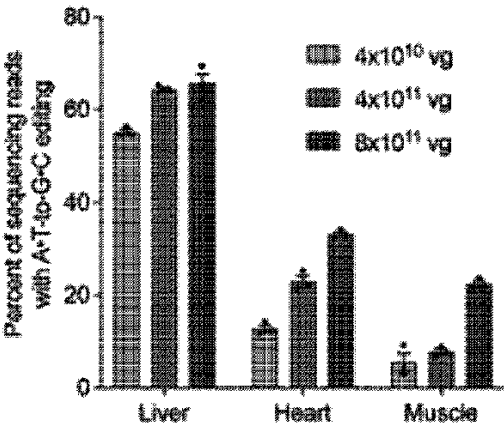


FIG. 2C

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(i) 5'逆位末端反復(ITR)と;

(ii) 第1のプロモータに作動可能に連結された塩基エディタをコードする配列(ここで、塩基エディタは、核酸プログラマブルDNA結合タンパク質(napDNAbp)ドメインおよびデアミナーゼドメインを含む);およびポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む第1の核酸断片と;

(iii) 第2のプロモータに作動可能に連結されたガイドRNA(gRNA)をコードする第2の核酸断片と;

(iv) 3'ITRと

を含む、核酸分子であって、

ここで、5'ITRと3'ITRとの間の長さは約4.90kb未満である、核酸分子。

【請求項 2】

第1の核酸断片がインテインをコードしない、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項 3】

核酸分子が転写後応答エレメントを含まない、請求項1または2に記載の核酸分子。

【請求項 4】

第2のプロモータがU6プロモータである、請求項1～3のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 5】

第1のプロモータが、325ヌクレオチド未満、315ヌクレオチド未満、300ヌクレオチド未満、285ヌクレオチド未満、270ヌクレオチド未満、265ヌクレオチド未満、または250ヌクレオチド未満の長さを有する、請求項1～4のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 6】

第1のプロモータがおよそ280ヌクレオチドの長さを有する、請求項1～5のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 7】

第1のプロモータが、EF-1 α ショート(EFS)プロモータ、MeCP2プロモータ、P3プロモータ、またはU1Aプロモータである、請求項1～5のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 8】

第1のプロモータがEF-1 α ショート(EFS)プロモータである、請求項1～7のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 9】

第1のプロモータが組織特異的プロモータである、請求項1～8のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 10】

第1のプロモータが、心臓組織特異的プロモータ、筋肉組織特異的プロモータ、またはニューロン組織特異的プロモータである、請求項9に記載の核酸分子。

【請求項 11】

塩基エディタが、(i)核酸プログラマブルDNA結合タンパク質(napDNAbp)ドメイン;および(ii)デアミナーゼドメインを含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 12】

napDNAbpドメインがCas9ドメインである、請求項1～11のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 13】

napDNAbpドメインが、*S. aureus* Cas9(SaCas9)ドメイン、*N. meningitidis* 2 Cas9(Nme2Cas9)ドメイン、*C. jejuni* Cas9(CjCas9)ドメイン、*S. auricularis*(S

10

20

30

40

50

auriCas9)ドメイン、およびそれらのバリエーションから選択される、請求項1～12のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項14】

napDNABpドメインがニッカーゼ活性を有する、請求項1～13のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項15】

napDNABpドメインが、*S. pyogenes* Cas9(SpCas9)、Cpf1、CasX、CasY、C2c1、C2c2、C2c3、Cas12a、Cas12b、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13b、Cas13c、Cas13d、Cas14、Csn2、Cas3、またはCasΦのコンパクトなバリエーションである、請求項1～14のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項16】

napDNABpドメインが、SaCas9ドメイン、SaCas9ニッカーゼドメイン、SaKKHドメイン、またはSaKKHニッカーゼドメインである、請求項1～14のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項17】

napDNABpドメインがSaKKHニッカーゼドメインである、請求項1～14および16のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項18】

napDNABpドメインがCjCas9ニッカーゼドメインである、請求項1～14および16のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項19】

デアミナーゼドメインがアデノシンデアミナーゼを含む、請求項1～18のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項20】

デアミナーゼドメインがアデノシンデアミナーゼ単量体からなる、請求項1～19のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項21】

デアミナーゼドメインが、TadA-8e、TadA-8e(V106W)、TadA9、TadA20、またはTadA7.10デアミナーゼである、請求項1～20のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項22】

デアミナーゼドメインがTadA-8eデアミナーゼドメインである、請求項1～21のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項23】

塩基エディタが1以上の核局在配列(NLS)をさらに含む、請求項1～22のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項24】

塩基エディタが双節型NLS(bpNLS)をさらに含む、請求項1～23のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項25】

双節型核局在シグナルが、KRTADGSEFEPKKKRKV(配列番号398)、KRPAATKKAGQAKKKK(配列番号344)、KKTTELQTTNAENKTKKL(配列番号345)、KRGINDRNFWRGENGRKTR(配列番号346)、およびRKSGKIAAIVVKRPRK(配列番号347)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項24に記載の核酸分子。

【請求項26】

双節型核局在シグナルが、配列番号344または398で提出されるアミノ酸配列を含む、請求項24または25に記載の組成物。

【請求項27】

塩基エディタが、ABE8e、ABE8e(V106W)、ABE9、ABE20、ABE7.10、またはそのバリエーションである、請求項1～26のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項28】

10

20

30

40

50

塩基エディタが、SaKKH-ABE8e、SauriCas9-ABE8e、CjCas9-ABE8e、Nme2Cas9-ABE8e、またはSaCas9-ABE8eである、請求項1～27のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項29】

塩基エディタが次の構造: NH_2 -[アデノシンデアミナーゼ]-[napDNAbpドメイン]-COOH; または NH_2 -[napDNAbpドメイン]-[アデノシンデアミナーゼ]-COOH を含み、ここで、前記構造における各「]-[」は任意のリンカー配列の存在を指示する、請求項1～28のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項30】

デアミナーゼドメインがシチジンデアミナーゼを含む、請求項1～18および23～26のいずれか一項に記載の核酸分子。

10

【請求項31】

デアミナーゼドメインがFERNYまたは進化したFERNY(evoFERNY)である、請求項1～18、23～26、および30のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項32】

塩基エディタが、BE3.9、FERNY-BE3.9、またはそのバリエーションである、請求項1～18、23～26、30、および31に記載の核酸分子。

【請求項33】

塩基エディタがウラシルグリコシラーゼインヒビター(UGI)ドメインをさらに含む、請求項1～18、23～26、および30～32のいずれか一項に記載の核酸分子。

20

【請求項34】

塩基エディタが次の構造:

NH_2 -[シチジンデアミナーゼドメイン]-[napDNAbpドメイン]-[UGI]-COOH;

NH_2 -[シチジンデアミナーゼドメイン]-[UGI]-[napDNAbpドメイン]-COOH;

NH_2 -[napDNAbpドメイン]-[UGI]-[シチジンデアミナーゼドメイン]-COOH;

NH_2 -[napDNAbpドメイン]-[シチジンデアミナーゼドメイン]-[UGI]-COOH;

NH_2 -[UGI]-[シチジンデアミナーゼドメイン]-[napDNAbpドメイン]-COOH; または

NH_2 -[UGI]-[napDNAbpドメイン]-[シチジンデアミナーゼドメイン]-COOH、

を含み、

ここで、前記構造における「]-[」の各場合は、任意のリンカー配列の存在を指示する、請求項1～18および30～33のいずれか一項に記載の核酸分子。

30

【請求項35】

塩基エディタが配列番号21または22のアミノ酸配列を含む、請求項1～18、23～26、および30～33のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項36】

塩基エディタが配列番号171～172および181～183のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項1～29のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項37】

塩基エディタが配列番号171のアミノ酸配列を含む、請求項1～29および36のいずれか一項に記載の核酸分子。

40

【請求項38】

ポリAシグナルが、ウシ成長ホルモン(bGH)シグナル、ヒト成長ホルモン(hGH)シグナル、またはSV40シグナルである、請求項1～37のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項39】

ポリAシグナルがウシ成長ホルモン(bGH)シグナルである、請求項1～38のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項40】

第1の核酸断片が、マウスの最小微小ウイルス(MVM)イントロンをさらに含む、請求項1～39のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項41】

50

5' ITRと3' ITRとの間の長さが4.7 kbと4.9 kbとの間である、請求項1～40のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項42】

5' ITRと3' ITRとの間の長さが、約4.65 kb、約4.70 kb、約4.725 kb、約4.75 kb、約4.80 kb、約4.825 kb、約4.85 kb、または約4.90 kbである、請求項1～41のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項43】

5' ITRと3' ITRとの間の長さが約4.80 kbである、請求項1～42のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項44】

10

(i) 5' 逆位末端反復(ITR)と;

(ii) 第1のプロモータに作動可能に連結された塩基エディタをコードする配列と;

(iii) ポリアデニル化(ポリA)シグナルと;

(iv) 第2のプロモータに作動可能に連結されたガイドRNA(gRNA)をコードする第2の核酸断片(ここで、第2の核酸断片の転写の方向は核酸分子の転写の方向に対して相対的に逆転している)と;

(v) 3' ITRと、

から本質的になる核酸分子であって、

ここで、5' ITRと3' ITRとの間の長さは約4.90 kb未満である、請求項1～43のいずれか一項に記載の核酸分子。

20

【請求項45】

核酸分子が一本鎖または自己相補的である、請求項1～44のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項46】

核酸分子が配列番号100～102のいずれか1つの配列を含む、請求項1～29および36～45のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項47】

核酸分子が配列番号100の配列を含む、請求項1～29および36～46のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項48】

30

第2の核酸断片の転写の方向が第1の核酸断片の転写の方向に対して相対的に逆転している、請求項1～47のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項49】

(i) 5' 逆位末端反復(ITR)と;

(ii) 第1のプロモータに作動可能に連結されたSaKKH-ABE8e、SauriCas9-ABE8e、CjCas9-ABE8e塩基エディタ、またはNme2Cas9塩基エディタをコードする配列(ここで、第1のプロモータはEFS、MeCP2、P3、およびU1Aプロモータから選択される);およびbGHポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む第1の核酸断片と;

(iii) U6プロモータに作動可能に連結されたガイドRNA(gRNA)をコードする第2の核酸断片(ここで、第2の核酸断片の転写の方向は核酸分子の転写の方向に対して相対的に逆転している)と;

40

(iv) 3' ITRと、

を5'から3'に含む、核酸分子であって、

ここで、5' ITRと3' ITRとの間の長さは約4.90 kb未満である、請求項1～29および36～48のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項50】

第1のプロモータがEFSである、請求項49に記載の核酸ベクター。

【請求項51】

塩基エディタがSaKKH-ABE8eである、請求項49または50に記載の核酸ベクター。

【請求項52】

50

(i) 5'逆位末端反復(ITR)と;

(ii) 第1のプロモータに作動可能に連結されたCjCas9-FERNY-BE3.9またはCjCas9-evoFERNY-BE3.9塩基エディタをコードする配列(ここで、第1のプロモータはEFS、MeCP2、P3、およびU1Aプロモータから選択される);およびbGHポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む第1の核酸断片と;

(iii) U6プロモータに作動可能に連結されたガイドRNA(gRNA)をコードする第2の核酸断片(ここで、第2の核酸断片の転写の方向は核酸分子の転写の方向に対して相対的に逆転している)と;

(iv) 3'ITRと、

を5'から3'に含む、核酸分子であって、

10

ここで、5'ITRと3'ITRとの間の長さは約4.90kb未満である、

請求項1~18、23~26、30~35、および38~43のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項53】

第1のプロモータがEFSである、請求項52に記載の核酸ベクター。

【請求項54】

塩基エディタがCjCas9-evoFERNY-BE3.9である、請求項52または53に記載の核酸ベクター。

【請求項55】

(i) 5'逆位末端反復(ITR)と;

(ii) 第1のプロモータに作動可能に連結されたトランスジーン(ここで、第1のプロモータは300ヌクレオチド未満の長さを有する);および転写後応答エレメントを含有しない転写ターミネータを含む第1の核酸断片と;

20

(iii) 第2のプロモータに作動可能に連結された第2の核酸断片(ここで、第2の核酸断片の転写の方向は第1の核酸断片の転写の方向に対して相対的に逆転している)と;

(iv) 3'ITRと、

を5'から3'の順序で含むAAV核酸分子であって、

ここで、5'ITRと3'ITRとの間の長さは約4.90kb未満である、AAV核酸分子。

【請求項56】

第1の核酸断片が塩基エディタをコードし、第2の核酸断片がgRNAをコードする、請求項55に記載のAAV核酸分子。

30

【請求項57】

塩基エディタが、コンパクトなCas9タンパク質であるnapDNAbpドメインを含有する、請求項56に記載のAAV核酸分子。

【請求項58】

napDNAbpドメインが、*S. aureus* Cas9(SaCas9)ドメイン、*N. meningitidis* 2 Cas9(Nme2Cas9)ドメイン、*C. jejuni* Cas9(CjCas9)ドメイン、*S. auricularis*(SauriCas9)ドメイン、およびそれらのバリエーションから選択される、請求項57に記載のAAV核酸分子。

【請求項59】

40

napDNAbpドメインが、*S. pyogenes* Cas9(SpCas9)、Cpf1、CasX、CasY、C2c1、C2c2、C2c3、Cas12a、Cas12b、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13b、Cas13c、Cas13d、Cas14、Csn2、Cas3、またはCasΦのコンパクトなバリエーションである、請求項55に記載の核酸分子。

【請求項60】

napDNAbpドメインがニッカーゼ活性を有する、請求項55~59のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項61】

カプシドにカプシド化された請求項1~60のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、組換えAAV(rAAV)粒子。

50

【請求項 6 2】

カプシドが血清型 2、6、8、9、PHP.B、または PHP.eB である、請求項 6 1 に記載の rAAV 粒子。

【請求項 6 3】

カプシドが血清型 8 または血清型 9 である、請求項 6 1 または 6 2 に記載の rAAV 粒子。

【請求項 6 4】

rAAV 粒子が、rAAV8-Sauri-ABE8e、rAAV9-Sauri-ABE8e、rAAV8-SaKKH-ABE8e、rAAV9-SaKKH-ABE8e、rAAV8-CjCas9-ABE8e、rAAV9-CjCas9-ABE8e、rAAV8-Nme2Cas9-ABE8e、または rAAV9-Nme2Cas9-ABE8e 粒子である、請求項 6 1～6 3 のいずれか一項に記載の rAAV 粒子。

10

【請求項 6 5】

rAAV 粒子が rAAV8-SaKKH-ABE8e 粒子である、請求項 6 1～6 4 のいずれか一項に記載の rAAV 粒子。

【請求項 6 6】

請求項 6 1～6 5 のいずれか一項に記載の複数の rAAV 粒子を含む組成物。

【請求項 6 7】

請求項 1～6 0 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む組成物。

【請求項 6 8】

請求項 6 6 または 6 7 に記載の組成物および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

20

【請求項 6 9】

請求項 1～6 0 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 6 1～6 5 のいずれか一項に記載の rAAV 粒子、または請求項 6 6～6 8 のいずれか一項に記載の組成物を含む細胞。

【請求項 7 0】

細胞が細菌細胞である、請求項 6 9 に記載の細胞。

【請求項 7 1】

細胞が真核細胞である、請求項 6 9 に記載の細胞。

【請求項 7 2】

細胞が酵母細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞である、請求項 6 9 または 7 1 に記載の細胞。

30

【請求項 7 3】

細胞がヒト細胞である、請求項 6 9 に記載の細胞。

【請求項 7 4】

請求項 1～6 0 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 6 1～6 5 のいずれか一項に記載の rAAV 粒子、または請求項 6 6～6 8 のいずれか一項に記載の組成物、および細胞への送達のための説明書を含む、キット。

【請求項 7 5】

標的核酸分子を含む細胞を、請求項 1～6 0 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 6 1～6 5 のいずれか一項に記載の rAAV 粒子、または請求項 6 6～6 8 のいずれか一項に記載の組成物と接触させることを含む、標的核酸分子を編集するための方法。

40

【請求項 7 6】

接触が *in vitro* で実施される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

接触が *in vivo* で実施される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 8】

接触が対象において実施される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 9】

対象が疾患または障害を有すると診断されている、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

ガイド RNA が、標的核酸分子上の標的配列に対して相補的である少なくとも 10 個の一

50

続きのヌクレオチドのガイド配列を含む、請求項75～79のいずれか一項に記載の方法。

【請求項81】

ガイドRNAが、長さが約25と200との間のヌクレオチドである、請求項75～80のいずれか一項に記載の方法。

【請求項82】

標的配列が、疾患または障害に関連する点突然変異を含む、請求項75～81のいずれか一項に記載の方法。

【請求項83】

点突然変異が、疾患または障害に関連するT→C点突然変異を含む、請求項82に記載の方法。

【請求項84】

点突然変異が、疾患または障害に関連するA→G点突然変異を含む、請求項82に記載の方法。

【請求項85】

標的核酸を編集するステップが、点突然変異の修正をもたらす、請求項82～84のいずれか一項に記載の方法。

【請求項86】

接触させるステップが、スプライス部位の導入をもたらす、請求項75～85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項87】

接触させるステップが、スプライス部位の取り除きをもたらす、請求項75～85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項88】

接触させるステップが、終止コドンの取り除きをもたらす、請求項75～85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項89】

接触させるステップが、終止コドンの導入をもたらす、請求項75～85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項90】

終止コドンが、核酸配列5'-TAG-3'、5'-TAA-3'、または5'-TGA-3'を含む、請求項89に記載の方法。

【請求項91】

標的配列がPCSK9遺伝子またはANGPTL3遺伝子内にある、請求項75～90のいずれか一項に記載の方法。

【請求項92】

接触させるステップが、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、または少なくとも約85%の編集効率をもたらす、請求項75～91のいずれか一項に記載の方法。

【請求項93】

接触させるステップが、少なくとも約5:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、または約15:1よりも多大な塩基編集:インデル比をもたらす、請求項75～92のいずれか一項に記載の方法。

【請求項94】

接触させるステップが、2.5%以下、2.0%以下、1.5%以下、1.2%以下、または1.0%以下のインデル率をもたらす、請求項75～93のいずれか一項に記載の方法。

【請求項95】

接触させるステップが、最小限のバイスタンダー編集をもたらす、請求項75～94のいずれか一項に記載の方法。

【請求項96】

細胞を、請求項61～65のいずれか一項に記載のrAAV粒子、または請求項66～68のいずれか一項に記載の組成物と接触させることを含み、ここで、接触は細胞内への核酸分子の送達をもたらす、方法。

【請求項97】

細胞がヒト細胞である、請求項96に記載の方法。

【請求項98】

細胞が心臓細胞または筋肉細胞である、請求項96または97に記載の方法。

【請求項99】

接触させるステップが、心臓細胞または筋肉細胞において、少なくとも約20%、少なくとも約22%、少なくとも約24%、少なくとも約27%、少なくとも約30%、少なくとも約33%、または少なくとも約36%の編集効率をもたらす、請求項98に記載の方法。

10

【請求項100】

接触させるステップが、心臓細胞または筋肉細胞において、2.5%以下、2.0%以下、1.5%以下、1.2%以下、または1.0%以下のインデル率をもたらす、請求項96～99のいずれか一項に記載の方法。

【請求項101】

治療的有効量の請求項61～65のいずれか一項に記載のrAAV粒子、請求項68に記載の医薬組成物、または請求項69～73のいずれか一項に記載の細胞を、それを必要とする対象へ投与することを含む、方法。

【請求項102】

20

対象がヒトである、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

対象が疾患または障害を有する、請求項101または102に記載の方法。

【請求項104】

rAAV粒子が、対象のkg体重当たり約 10^{15} 、約 10^{14} 、約 10^{13} 、約 10^{12} 、約 10^{11} 、または約 10^{11} 未満のベクターゲノム(vg)の治療的有効量で投与される、請求項101～103のいずれか一項に記載の方法。

【請求項105】

rAAV粒子が、対象のkg体重当たり約 8×10^{10} 、 4×10^{10} 、 1×10^{10} 、または約 10^{10} vg未満の治療的有効量で投与される、請求項101～104のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項106】

rAAV粒子が対象の心臓組織へ投与される、請求項101～105のいずれか一項に記載の方法。

【請求項107】

rAAV粒子が対象の骨格筋組織へ投与される、請求項101～106のいずれか一項に記載の方法。

【請求項108】

rAAV粒子が対象のニューロン組織へ投与される、請求項101～107のいずれか一項に記載の方法。

【請求項109】

40

医薬の製造における、請求項1～60のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項61～65のいずれか一項に記載のrAAV粒子、請求項66～68のいずれか一項に記載の組成物、または請求項69～73のいずれか一項に記載の細胞の使用。

【請求項110】

請求項61～65のいずれか一項に記載のrAAV粒子を作る方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、35 U.S.C. § 119(e)の下において、2022年4月28日出願の米国仮特許出

50

願第63/336064号および2022年7月15日出願の米国仮特許出願第63/389796号の優先権を主張し、これらの各々は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府援助の条項

本発明は、the National Institutes of Healthによって授与された助成金番号UG3AI150551、U01AI142756、R35GM118062、RM1HG009490、R01EY009339、R01HL148769、およびR35HL145203によって資金提供された。政府は本発明にある特定の権利を有する。

【0003】

電子配列表の参照

電子配列表(B119570158W000-SEQ-JQM.XML;サイズ:447,661バイト;作成日:2023年4月28日)の内容は、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

遺伝子編集は、少数の治療選択肢しか利用可能でない広い種々の遺伝子障害を処置するための臨床的に検証された潜在能力を提供する。遺伝子編集を通してのほとんどの遺伝子障害の研究および処置はin vivoの編集を要求するため、哺乳動物などの動物の組織の細胞内への高精度遺伝子編集剤の効率的送達を媒介する臨床上有用な方法^{1,74}は、技術分野を前進させることにおいて継続して重要な役割を演ずる。

【0005】

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、ヒト疾患の動物モデル^{3,4}、治験⁵、およびFDA承認薬物^{6,7}において、多くの治療用タンパク質をコードする遺伝子を送達するために使用されてきた。AAVは、その臨床的検証、種々の臨床に該当する組織を標的化するその能力、およびその比較的よく理解された、好都合な安全性プロファイルにより、普及したin vivo送達方法になっている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

発明の概要

いくつかの側面において、本明細書においては、例としてシングルAAVベクター(またはゲノム)を介して、細胞へ完全な塩基エディタ(base editor)(または「核酸塩基エディタ」)を送達するための核酸分子、組成物、組換えAAV(rAAV)粒子、キット、および方法が記載される。特に、本開示は、シングルAAVベクターにおけるサイズが最小化されたアデニン塩基エディタおよびシトシン塩基エディタの送達のための組成物、方法、および使用を提供し、ここで、アデニン塩基エディタおよび関連する調節エレメントは、大凡4.9キロ塩基(kb)というAAVのパッケージング容量よりも短い長さを有する。さらに、塩基エディタのパッケージングを可能にするサイズが最小化された調節構成要素を含む改善されたAAVベクターが本明細書に記載される。本開示は、開示されるrAAV粒子を含む宿主細胞および組成物を提供する。本開示は、さらに、塩基エディタ以外のより大きいトランスジーンのパッケージングを可能にするサイズが最小化された調節構成要素を含む改善されたAAVベクターを提供する。

【0007】

塩基エディタ^{8,9}(BE)は、in vitroの種々の治療に該当する細胞型においておよびヒト遺伝子疾患の動物モデルにおいて、標的化された突然変異を効率的に組み入れ得る^{1,10}。BEはまた、肝臓組織を包含するヒト対象などの対象における種々の治療に該当する組織に、標的化された突然変異を効率的に組み入れ得る。ヌクレアーゼによって媒介される遺伝子編集とは違って、塩基編集は二本鎖DNA切断を要求せず、よって、最小限の不要なインデル副産物、染色体転座¹¹、染色体異数性¹²、大きい欠失^{13,14}、p53活性化^{15,16}、またはクロモソリプシス¹⁷を生成する。塩基エディタは、種々の遺伝子疾患を引き

10

20

30

40

50

起こす点突然変異を修正し得るが、*in vivo*の対象へのそれらの送達、それらの大きいサイズ(約5.2kb)によって複雑化する。これは、典型的には、逆位末端反復(ITR)間の大凡4.9kbであるアデノ随伴ウイルス(AAV)の最大パッケージング容量を超過する^{18,19}。AAVの最適なパッケージング容量は大凡4.7kbであるため、シングルAAV粒子における標的DNAに対して作用することができる塩基エディタの送達は、主要な障害物を提示している。例えば、単一の(シングル)ベクター上の普通に使用される*Streptococcus pyogenes* Cas9タンパク質(SpCas9。これは長さが約4.2kbである)を含有するBEおよびシングルガイドRNA(sgRNA)をパッケージングすることは、実行可能ではなかった。技術的には実現可能であるが、このアプローチは、カスタマイズされた発現および制御エレメント、たとえば核局在配列(NLS)のための余地を少ししか残さない。塩基エディタそれ自体に加えて、塩基エディタを送達するAAVは、ガイドRNA、塩基エディタおよびsgRNA発現を駆動するプロモータ、ならびにcis調節エレメントをもまた包含しなければならない。

10

【0008】

以前の研究²⁰⁻²⁶では、AAVは、2つのAAV核酸ベクターの間で塩基エディタを2つの半分に分けることによって、塩基エディタを送達するために使用された。2018年5月10日公開の米国特許出願公開第2018/0127780号明細書、2020年11月26日公開の国際公開第2020/236982号、Levy, J.M., et al. *Nat Biomed Eng* 4, 97-110 (2020)、Chen, Y., et al. *Development of Highly Efficient Dual-AAV Split Adenosine Base Editor for In Vivo Gene Therapy. Small Methods* 4, 2000309 (2020)、およびVilliger, L. et al. *Nature Medicine* 24, 1519-1525 (2018)を見よ。これらの各々は参照によって本明細書に組み込まれる。デュアルAAVアプローチでは、塩基エディタトランスジーン各「分割」部分は小さいトランススプライシングインテインに融合されるか²⁷、または各部分はトランススプライシングを経過するmRNAとして発現される²⁸。典型的には、2つのAAVベクターの各々は、別個のAAVウイルス粒子(またはビリオン)にパッケージングされる。デュアルAAVアプローチはトランススプライシングインテインの組み込みに依拠し、これらは、AAV粒子の送達および形質導入後の細胞における分割された部分からの全長BEの再構成を媒介する。単一の塩基エディタを送達するために2つのAAV粒子が要求されるため、標的細胞の2つの首尾良いかつ比較的同時の形質導入が必要である。

20

30

【0009】

塩基エディタのデュアルAAV送達は、ヒト疾患のマウスモデルを包含する治療レベルの編集を支持しているが、シングルAAV塩基編集システムの開発は、塩基エディタの適用、キャラクタリゼーション、および製造を単純化することと、複数のAAVの同時形質導入の必要性を無用にするによって編集効率を潜在的に増大させることとによって、潜在的なインパクトをさらに増大させるであろう。本明細書において開示されるシングルAAV塩基編集システムはAAVの要求される用量をもまた低下させる。AAVの臨床適用は多くの場合には用量制限毒性によって制約されるため、重要な前進である²⁹。それゆえに、当該技術分野においては、高い編集能性を保持する標的細胞の単一の形質導入のみを要求するシングルAAVの*in vivo*塩基エディタ送達の必要がある。シングルAAV送達は、特に心臓、CNS、および筋肉組織などの有効に形質導入することがより困難である哺乳動物組織における研究および臨床使用にとって、利点を提供するのである。

40

【0010】

それらは知られている全ての病原性SNPのおよそ半分を修正するA・TからG・Cの変換を組み入れるため、アデニン塩基エディタ(ABE)は特に有用な編集剤のクラスである⁹。アデニン塩基エディタABE7.10のファージによって支援される連続的進化(PACE)は、最近、SpCas9以外のCasドメインとの広げられた適合性および増大した活性を有するデオキシアデノシンデアミナーゼ*TadA-8e*を生じた³⁰。*TadA7.10*デアミナーゼを含有するABE7.10は、培養細胞、成体マウス、植物、および他の生物において、非常に低いレベルの望まれない副産物、たとえば小さい挿入または欠失(インデル)を有して、DNAに

50

においてクリーンなかつ効率的なA・TからG・Cの変換を行い得る。TadA-8eおよびTadA 7.10デアミナーゼについての追加の詳細は、2021年8月12日公開の国際公開第2021/158921号;2018年2月8日公開の国際公開第2018/027078号、2019年4月25日公開の国際公開第2019/079347号;Koblan et al., Nat Biotechnol 36, 843-846 (2018);およびGaudelli et al., Nature 551, 464-471 (2017)に見出され得る。これらの各々は参照によって本明細書に組み込まれる。単一鎖の二量体よりもむしろ単一のTadAデアミナーゼドメインのみを含有するABEは、エディタサイズの低減を許す^{30,31}。その上、SaCas9は、シングルAAVと適合性の塩基エディタを提供するために十分に小さいが(長さが1053アミノ酸。配列番号377)、その有用性は、そのNNGRRT PAMの希少性によって多大に限定される。塩基編集は、標的ヌクレオチドを編集ウィンドウ内に置くための好適なPAMの存在を要求するため、単純なかつ効率的なin vivo送達と併せて幅広いPAM適合性を総合的に提供するABEは、塩基編集のin vivo適用を前進させるであろう。

10

【0011】

同様に、単純なかつ効率的なin vivo送達と併せて幅広いPAM適合性を提供するシトシン塩基エディタ(CBE)は、塩基編集のin vivo適用を前進させるであろう。現行のCBEはウラシルグリコシラーゼインヒビタードメインを含有し、これは長さが約84bpである。非常に大きいわけではないが、これらの追加の84塩基対は、シングルAAVベクターにおけるCBEの送達をABEよりも困難にする。

【0012】

20

Ranらは、標的ゲノムDNAに二本鎖切断を組み入れるために、in vivoのシングルAAVベクターにおける送達のためのサイズが最小化された*S. aureus* Cas9(SaCas9)を操作した。参照によって本明細書に組み込まれるRan, F. A., et al. (2015) Nature 520(7546): 186-191を見よ。RanのAAVカセットは、U6プロモータによって駆動されるsgRNAおよびサイトメガロウイルス(CMV)プロモータまたはサイロキシン結合グロブリン(TBG)プロモータによって駆動されるSaCas9トランスジーンを含有した。最近、Tranらは、サイズが最小化されたSaCas9 ABEのmicroABE 1744を含有するシングルAAVベクターを操作した。これにおいては、ABE7.10 TadAデアミナーゼ単量体がSaCas9ドメイン内にはめ込まれている(すなわち挿入されている)。参照によって本明細書に組み込まれるTran et al., Nat. Commun. 11, 4871 (2020)を見よ。しかしながら、このAAVにコードされるABEは<0.25%のin vitro編集のみを示し、in vivoでは評価されなかった。より最近に、Zhang, Sontheimerらは、*N. meningitidis* 2 Cas9(Nme2Cas9)タンパク質を含有するABEをコードするシングルAAVベクターを生成した。参照によって本明細書に組み込まれるZhang et al., Adenine Base Editing in vivo with a Single Adeno-Associated Virus Vector. bioRxiv 2021.12.13.472434を見よ。しかしながら、Zhangの塩基エディタは、肝臓組織へのAAV送達後に、バイスタンダーアデニンにおける有意な編集および35%の最大編集効率を見せた。しかしながら、現行で使用されているABEおよびCBEと同じく、高度に効率的な塩基編集を見せる他のコンパクトなCas9タンパク質ドメインを含有する塩基エディタのシングルAAV送達は開示されていない。加えて、心臓および筋肉組織への塩基エディタの塩基エディタのシングルAAV送達は開示されていない。

30

40

【0013】

本開示は、ITR間の約4.90kb未満の長さを有するサイズが最小化されたAAVベクターを提供する。このシングルAAV塩基編集プラットフォームは、マウスへ全身送達されるときには、複数の用量において、種々の組織においてデュアルAAV ABE8eと比較して類似のまたは改善された編集効率を提供する。本開示の例示的なAAVベクターは、首尾良い送達のためには、トランススプライシングインティンを組み込むこともその使用に依拠することもしない。

【0014】

本開示のAAVベクターは、少なくとも部分的には、標的細胞における効率的な発現お

50

よびin vivoの標的塩基の編集に必要なサイズが最小化された構成要素を含有するベクターを生成した遺伝子工学の前進に基づく。例示的な標的細胞は、筋肉細胞、ニューロン、肝臓細胞、神経筋細胞、および心臓細胞を包含する。これらのベクターは、2018年5月10日公開の米国特許出願公開第2018/0127780号明細書および2020年11月26日公開の国際公開第2020/236982号において開示されているベクターよりも小さく、それゆえに、シングルAAV粒子への組み込みに適合している。特に、開示されるAAVベクターは、部分的には、転写ターミネータ(またはポリアデニル化シグナル)におけるWPREなどの転写後応答エレメントが、in vivoの標的組織における塩基エディタの首尾良い発現に必要なではないという発見に基づく。それゆえに、開示されるAAVベクターは、より短い(またはサイズが最小化された)ターミネータを含有する。開示されるAAVベクターは、短いプロモータなどの他のサイズが最小化された調節エレメントをさらに含む。

10

【0015】

開示されるAAVベクターは、部分的には、開示されるCasタンパク質のいずれかと適合性のガイドRNAがベクターの3'末端にコードされ、4.9kb未満、4.8kb未満、4.7kb未満、4.6kb未満、または4.5kb未満のITRからITRの総長さを維持し得るという発見にもまた基づく。従って、本明細書に記載される遺伝子工学技術を通して、塩基エディタおよびそのガイドが、in vivo送達のために単一のrAAV粒子に効率的にパッケージングされ得る。ガイドRNAは、ベクター上において塩基エディタおよび塩基エディタトランスジーンの発現を駆動するプロモータ(およびその複製起点)のもの(すなわち5'から3')とは逆の向き(3'から5')でコードされ得る。

20

【0016】

本開示は、サイズが最小化された塩基エディタをもまた提供する。これらの塩基エディタは、シングルAAV粒子によって媒介される効率的なin vivo塩基編集を可能にするために開発された。開示されるAAVにコードされる塩基エディタは、サイズが最小化されたCasタンパク質を含み得る。これらのCas9タンパク質は長さが約1000~1050アミノ酸であり、これはSpCas9タンパク質よりも約350アミノ酸短い。これらのサイズが最小化されたCasタンパク質は、*S. aureus* Cas9(SaCas9)、Nme2Cas9、*C. jejuni* Cas9(CjCas9)、*S. auricularis* Cas9(SauriCas9)、およびこれらのCas9タンパク質のいずれかのバリエーションを包含するが、これらに限定されない。開示される塩基エディタは、これらのCas9タンパク質のいずれか、または本明細書において開示されるCas9タンパク質のいずれかの進化または突然変異したバリエーションを含有し得る。

30

【0017】

従って、種々の態様において、開示されるAAV核酸分子はトランススプライシングインテインなどのインテインを含まない(例として、*Nostoc punctiforme*またはNpuに由来するトランススプライシングインテインを含まない)。種々の態様において、開示されるAAV核酸分子は、転写後応答エレメントを含まない転写ターミネータを含む。いくつかの態様において、開示されるAAV核酸分子は、インテインも転写後応答エレメントも含まない。いくつかの態様において、核酸分子は、(i)5'逆位末端反復(ITR);(ii)第1のプロモータに作動可能に連結された塩基エディタをコードする配列(ここで、塩基エディタは、核酸プログラマブルDNA結合タンパク質(napDNAbp)ドメインおよびデアミナーゼドメインを含む);およびポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む第1の核酸断片;(iii)第2のプロモータに作動可能に連結されたガイドRNA(gRNA)をコードする第2の核酸断片;ならびに(iv)3'ITR、を含む第1の核酸断片を含む。

40

【0018】

いくつかの側面において、本明細書においては、大きいトランスジーンのパッケージングを許すサイズが最小化された調節エレメントを有するrAAVベクターが提供される。従って、本明細書においては、5'から3'の順序で次を含むrAAV核酸分子が提供される:(i)5'逆位末端反復(ITR);(ii)第1のプロモータに作動可能に連結されたトランスジーン(ここで、第1のプロモータは300ヌクレオチド未満の長さを有する);および転写後反応エレメントを含有しない転写ターミネータを含む第1の核酸断片;(iii)第2のプロモータに作動

50

可能に連結された第2の核酸断片(ここで、第2の核酸断片の転写の方向は、第1の核酸断片の転写の方向に対して相対的に逆転している);ならびに(iv)3'ITR。種々の態様において、長さ、5'ITRと3'ITRとの間の長さは約4.90kb未満である。いくつかの態様において、長さ、5'ITRと3'ITRとの間の長さは、約4.85kb未満、約4.80kb未満、約4.75kb未満、約4.725kb未満、約4.70kb未満、または4.65kb未満である。

【0019】

いくつかの態様において、第1の核酸断片は塩基エディタをコードし、第2の核酸断片はgRNAをコードする。いくつかの態様において、第1の核酸断片は、塩基エディタではないタンパク質をコードする。

【0020】

開示される塩基エディタのいずれかは、(i)napDNABpドメイン;および(ii)デアミナーゼドメインを含み得る。開示される塩基エディタは、野生型napDNABpドメイン(例として野生型SaKKH-Cas9)を含み得る。開示される塩基エディタは、ニッカーゼ活性を有するnapDNABpドメイン(例としてSaKKH-Cas9ニッカーゼまたは「SaKKH」)を含み得る。いくつかの態様において、napDNABpドメインはCas9ニッカーゼドメインである。いくつかの態様において、napDNABpドメインはSaKKH-Cas9ニッカーゼである。napDNABpドメインは、*S. aureus* Cas9(SaCas9)、*N. meningitidis* 2 Cas9(Nme2Cas9)、*C. jejuni* Cas9(CjCas9)、または*S. auricularis*(SauriCas9)ドメイン、およびそれらのバリエーションから選択され得る。これらのCasタンパク質は、標準的なSpCas9タンパク質よりも幅広いPAM適合性を有する。従って、開示されるシングルAAVにコードされる塩基エディタは、ゲノム上のアデニンの大多数またはゲノム上のシトシンの大多数を潜在的に標的化し得る。例示的な態様において、napDNABpドメインは、SaCas9ドメイン、SaCas9ニッカーゼドメイン、SaKKHドメイン、またはSaKKHニッカーゼドメインである。

【0021】

本開示のAAVにコードされるABEは、アデノシンデアミナーゼ二量体(すなわち2つのアデノシンデアミナーゼ)よりもむしろ単一のデアミナーゼ、すなわちデアミナーゼ単量体(TadA-8e単量体など)を含有するアデノシンデアミナーゼドメインを含有する。デアミナーゼ単量体の使用は、サイズが最小化された塩基エディタの生成を容易にする。TadA単量体は長さが約166アミノ酸である。

【0022】

開示されるアデニン塩基エディタのいずれかは、*E. coli* TadAデアミナーゼのバリエーションであるアデノシンデアミナーゼドメインを含み得る。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、TadA-8e、TadA-8e(V106W)、TadA9、TadA20、およびTadA7.10デアミナーゼから選択される。いくつかの態様において、本開示の塩基エディタのいずれかは、Cas9ニッカーゼなどのnapDNABpドメインのN末端に融合されたアデノシンデアミナーゼを含む。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼはTadA-8eである。

【0023】

いくつかの側面において、本開示は、サイズが最小化されたABE8eバリエーションを提供する。各バリエーションはシングルAAV送達と適合性であり、3つのかかるバリエーションは、総合的に、ヒトゲノム上のアデニンの87%を標的化および82%を編集するために十分なPAM適合性を提供する。これらの3つのバリエーションは、Sauri-ABE8e、SaKKH-ABE8e、およびSaABE8eである。各々は、TadA-8eアデノシンデアミナーゼと、夫々SauriCas9、SaKKH-Cas9、およびSaCas9のニッカーゼバリエーションとを含有する。本開示はさらにABE8eバリエーションCjCas9-ABE8eおよびNme2Cas9-ABE8eを提供する。本開示はさらに、ABEバリエーションSaKKH-ABE8e(V106W)、SauriCas9-ABE8e(V106W)、CjCas9-ABE8e(V106W)、Nme2Cas9-ABE8e(V106W)、およびSaCas9-ABE8e(V106W);SaKKH-ABE9、SauriCas9-ABE9、CjCas9-ABE9、Nme2Cas9-ABE9、およびSaCas9-ABE9;SaKKH-ABE20、SauriCas9-ABE20、CjCas9-ABE20、N

me2Cas9-ABE20、およびSaCas9-ABE20;ならびにSaKKH-ABE7.10、SauriCas9-ABE7.10、CjCas9-ABE7.10、Nme2Cas9-ABE7.10、およびSaCas9-ABE7.10を提供する。これらの開示される塩基エディタのいずれかにおいては、夫夫、SauriCas9、SaKKH-Cas9、SaCas9、CjCas9、およびNme2Cas9の野生型またはニックアーゼバリエーションが使用され得る。

【0024】

本開示はさらに、サイズが最小化されたCBEバリエーション、特にサイズが最小化されたBE3.9バリエーションを提供する。これらのバリエーションの例は、CjCas9-BE3.9、CjCas9-FERNY-BE3.9、およびCjCas9-evoFERNY-BE3.9を包含する。いくつかの態様において、塩基エディタは、ウラシルグリコシラーゼインヒビター(UGI)ドメインをさらに含む。開示されるCBEの例示的なシチジンデアミナーゼ(例としてrAPOBEC1デアミナーゼ)のサイズは約229アミノ酸である。

【0025】

これらの開発をインテグレーションすることによって、本開示のシングルAAVによって送達される塩基エディタは、高コレステロール(これは心血管疾患に関与する)のマウスモデルを処置するために使用され、心臓組織におけるカジュアルな突然変異の修正および動物の寿命の増大をもたらした。

【0026】

本開示の例において、ABEのシングルAAV送達は、これらの組織を標的化するAAV粒子の最近の前臨床および臨床試験で使用されたものよりも低いかまたは類似の用量において、夫夫肝臓、心臓、および筋肉組織において66%、33%、および22%の編集を達成した(例として治験番号NCT02122952(SMA処置)およびNCT03375164(DMD処置)を見よ)。加えて、シングルAAV8 ABEが、60~85%の効率で、マウスにおいて治療上該当する標的を効率的に編集し得るということが実証された。これらの編集は、標的のヒトおよびマウスPcsk9およびマウスAngptl3遺伝子における自然状態のスプライスアクセプター部位において破壊を産生した。これは、以前に報告されたものよりも低い用量において、これらの遺伝子の完全に近い(平均93%)ノックダウンをもたらし、血漿コレステロールおよびトリグリセリドの実質的な低減をもたらした。肝臓タンパク質のプロタンパク質コンベルターゼサブチリシン/ケキシニン9型(PCSK9)は、分泌される球状の自己活性化セリンプロテアーゼである。これは、LDL粒子のエンドサイトーシスの間に低密度リポタンパク質受容体(LDL-R)とのpH依存的相互作用を橋渡しするためにエンドソーム小胞内においてタンパク質結合アダプターとして作用し、細胞表面へのLDL-Rのリサイクルを防止し、LDL-コレステロールクリアランスの低減に至る。アンジオポエチン様3タンパク質(Angptl3)はリポタンパク質リパーゼ(LPL)の内因性インヒビターであり、これはトリグリセリドに富むリポタンパク質の加水分解に関わる主な酵素である。Pcsk9遺伝子上の疾患を引き起こす突然変異を標的化する塩基エディタは、2018年8月23日公開の米国特許出願公開第2018/0237787号明細書において開示され、これは参照によって本明細書に組み込まれる。

【0027】

アデニン塩基エディタおよびAAV構成要素のサイズを最小化することによって、それらの総合的なPAM適合性を原因とする幅広い標的化能を有し、in vivoのロバストな編集を支持する一連のシングルAAVアデニン塩基エディタシステムが開発された。本開示のシングルAAV BEベクターは、産生およびキャラクタリゼーションを単純化することによって、ならびに所望のレベルの編集を達成するために要求されるAAVの総用量を低減することによって、研究および治療上の適用のための塩基編集を容易にする。これらのシングルAAV BEは、臨床使用のためのデュアルAAVアプローチを超えるいくつかの潜在的な利点を提供する:2つよりもむしろ単一のベクターの臨床スケール産生;特に低い用量における増大した力価;およびトランススプライシングインテインを使用する必要性を無用にするより単純な構築物からの低減された複雑さ。これらの理由から、シングルAAV送達と適合性のin vivo編集アプローチは、全身送達が普通に使用される大型動物モデル

およびヒトの治療学に、より容易く適用され得る。塩基エディタの十分な発現を提供するより小さいプロモータの開発は、シングルAAV ABEの要素のさらなる最小化を許す。これは、全長のパッケージングされるAAVゲノムの割合を増大させることによって臨床への転化を容易にするはずである。

【0028】

他の側面においては、本明細書に記載される組成物を含む宿主細胞が提供される。開示される細胞は、本明細書に記載される開示される核酸分子、rAAVベクター、またはrAAV粒子のいずれかを含み得る。依然として他の側面においては、開示されるrAAV粒子のいずれかと、細胞(宿主細胞など)への送達のための説明書とを含むキットが提供される。

【0029】

本開示の依然として他の側面は、標的核酸分子を本明細書に記載される組成物のいずれかと接触させることを含む方法を提供する。種々の態様において、標的核酸分子は真核細胞(例として哺乳動物細胞)などの細胞にある。いくつかの態様において、標的核酸分子はゲノムDNAである。いくつかの態様において、ゲノムDNAは、ヒト対象などの対象の細胞または組織にある。従って、本明細書において開示されるrAAV粒子または組成物のいずれかと細胞を接触させることを含む方法が企図される。

【0030】

本開示の依然として他の側面は、治療的有効量の本明細書に記載される組成物(またはrAAV粒子)のいずれかを、それを必要とする対象へ投与することを含む方法を提供する。いくつかの態様において、対象は疾患または障害(例として遺伝子疾患)を有する。いくつかの態様において、疾患または状態は心血管疾患である。いくつかの態様において、組成物は、対象の肝臓組織、心臓組織、または骨格筋組織へ投与される。

【0031】

本開示の依然として他の側面は、開示されるrAAV粒子および組成物のいずれかを作る方法を提供する。

【0032】

本発明のある特定の態様の詳細は、下に記載されるとおり、発明を実施するための形態において提出される。本発明の他の特徴、目的、および利点は、定義、実施例、図、および請求項から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1A-1C】図1Aは、*in vivo*で評価されたAAV構築物を示す。W8突然変異を有するPcsk9遺伝子を標的化するsgRNAが、1つのAAVにおいてEGFPと共に送達された。これは、夫夫無傷のまたはインテイン分割SaABE8eどちらかをコードする1つまたは2つの追加のAAVどちらかと共注射された。無傷のSaABE8eおよびsgRNAを送達するために合計で2つのAAVが使用され、インテイン分割SaABE8eを送達するために3つのAAVが使用された。黒いボックスはITRを表し、EFSプロモータはEF1 α ショートであり、W3はトランケーションされたWPREであり、bGHはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルであり、紫色のボックスは、矢印で指示されている向きにU6プロモータによって駆動されるsgRNAカセットであり、*Nostoc punctiforme*からのNpuNおよびNpuC分割インテインは茶色で示され、タンパク質コード領域がEGFPおよびSaABE8eについて指示されている。図1Bは、インテイン分割および無傷のSaABE8eをコードするAAVの注射からの*in vivo*編集効率を示す。各マウスへ投与された塩基エディタAAVの総用量が示されている。図1Cは、示されている用量で投与されたときの、5つの異なるAAVアーキテクチャにおいて無傷のSaABE8eをコードするAAV9の注射からの*in vivo*編集効率の比較を示す。全てのケースで、エディタAAV用量は 4×10^{11} ベクターゲノム(vg)または 4×10^{10} vgどちらかであり、sgRNA EGFP AAV用量は、塩基エディタAAV対sgRNA AAVの1:1比で 4×10^{11} vgまたは 4×10^{10} vgどちらかであった。送達されたエディタAAV構築物(ITRを包含する)のサイズは凡例に示されている。20~25gの体重である6~7週齢の年齢のC57BL/6Jマウスが、後眼窩注射によって全身注射された。点は個々

のマウスを表す。値およびエラーバーは、 $n=3$ の異なるマウスの平均 $\pm$ SEMを表す。

【0034】

【図2A-2C】シングルAAV SaABE8eの開発およびキャラクタリゼーション。図2Aは、シングルAAV SaABE8eゲノム(ITRを包含する5,064bp)の概略図を示す。矢印はU6 sgRNAカセットの方向を指示する。図2Bは、デュアル対シングルSaABE8eの比較を示す。デュアル(一方のゲノム上に無傷のエディタを有するSaABE8e、第2のゲノム上にsgRNAおよびEGFP)またはシングル(単一のベクター上にSaABE8eおよびガイドRNA)AAVベクターどちらかの塩基編集活性の両方ともPcsk9 W8R編集を組み入れ、AAV9にパッケージングされ、マッチしたプロモータおよびターミネータ(ポリA)を有する。塩基エディタAAVが、凡例において指示されている用量で(デュアルAAVはエディタAAVおよびsgRNA AAVの指示されている用量で送達され、シングルAAVは指示されている用量で送達された)、後眼窩注射を介して20~25グラムの体重である6~8週齢の年齢のC57BL/6Jマウスへ投与され、組織が注射の3週間後に採取され、ハイスループットDNA配列決定(HTS)によって分析された。図2CはシングルAAV SaABE8eの用量タイトレーションを示す。点は個々のマウスを表し、エラーバーは $n=3$ の異なるマウスの平均 $\pm$ SEMを表す。

10

【0035】

【図3A-3D】HEK293T細胞における、Nme2ABE8e(図3A)、CjABE8e(図3B)、およびSauriABE8e(図3C)のキャラクタリゼーション。プロトスペーサ内の各標的アデニンの編集が示されている。標的部位が指示され、各標的プロトスペーサおよびPAMの配列は表1に列挙されている。標的アデニンは、各エディタの標準的なプロトスペーサ長さ(CjABE8eについては22ヌクレオチド、Nme2ABE8eについては24ヌクレオチド、SauriABE8eについては21ヌクレオチド)について付番される。点は値を表し、エラーバーは $n=3$ の反復の平均 $\pm$ SEMを表す。図3Dは、独立しておよび総合的に、サイズが最小化されたABEによって標的化可能なhg38ヒト参照ゲノム上のゲノムアデニンのパーセントを示す。サイズが最小化されたABEによって標的化可能なゲノムの代表的な部分を示す概略図が示されている。標的化可能なPAMは着色された線で示され、標的化可能なアデニンは着色された点で示されている。概略図の右端の円グラフは、1ヌクレオチドアデニン多型の87%が、総合的に、本開示の小さいAAVにコードされるABEの全てによって標的化可能(および82%が編集可能)であるということを指示している。

20

30

【0036】

【図4A-4D】HEK293T細胞におけるNme2ABE8e(図4A)、CjABE8e(図4B)、およびSauriABE8e(図4C)のキャラクタリゼーション。各サイズが最小化されたABEについて、8~9個のゲノム標的部位からの塩基編集活性ウィンドウが示されている。いずれかの試験部位に存在しなかった位置は、灰色の網掛けである。標的アデニンは、各エディタの標準的なプロトスペーサ長さ(Nme2ABE8eでは24nt、CjABE8eでは22nt、SauriABE8eでは21nt)について付番されている。点は値を表し、エラーバーは各部位について $n=3$ の反復の平均 $\pm$ SEMを表し、各位置は1~3個のゲノム部位を表す。点線は、各塩基エディタの平均ピーク活性の25%に対応し、編集ウィンドウ内で考えられる活性しきい値を定める。プロトスペーサ内に3つ以上のアデニンを含有する個々の部位がこの分析に包含された。プロトスペーサ内に1つまたは2つのアデニンのみを有する部位はサマリー分析から除外されたが、分析された全ての部位からのデータが図3A~3Cに示されている。図4Dは、独立してまたは総合的にどちらかで、サイズが最小化されたABEによって標的化可能なhg38ヒト参照ゲノム上のゲノムアデニンのパーセントを示す。サイズが最小化されたABEによって標的化可能なヒトゲノムの代表的な部分を示す例が示されている。標的化可能なPAMは着色された線で示され、標的化可能なアデニンは着色された点で示されている。

40

【0037】

【図5A-5K】PCSK9、Pcsk9、およびAngptl3をシングルAAVによってin vivoで標的化するときのゲノム編集および血漿脂質の評価。図5Aは、AAV処置されたマウスに

50

おける塩基編集および血漿アナライズを評価するための戦略を示し、BioRenderを使用して作出された。図5Bは、ヒトPCSK9、ならびにマウスPcsk9およびAngptl3におけるバルク肝臓の編集効率を示す(n=3~5匹のマウス。各点は1匹のマウスを表し、エラーバーはSEMを表す)。ヒトPCSK9編集はヒト化PCSK9マウスを使用して実施され、マウスPcsk9およびAngptl3編集は野生型C57BL/6Jマウスの内因性マウス遺伝子座において実施された。AAVは、6~8週齢において 1×10^{11} vg/マウスの用量で後眼窩注射によって投与された。図5Cは、マウスPcsk9エクソン1スプライスドナーにおけるデュアルSpABE8eおよびシングルSaKKH-ABE8eについての用量依存的な塩基編集を示す。投与された総AAV用量は、バーの各セットの下にvg/マウスで指示されている。投与された総AAV用量は、バーの各セットの下にvg/マウスで指示されている。デュアルSpABE8e編集データは、本発明者らのグループからの別の公開において報告された²。各点は異なるマウスを表す(n=5)。図5Dは、2つの用量において、バルク肝臓におけるPcsk9エクソン1ドナー部位を標的化するデュアルAAV8インテイン分割SaKKH-ABE8eおよびシングルAAV8 SaKKH-ABE8eの編集効率の直接比較を示す。投与された総AAV用量はバーの各セットの下にvg/マウスで指示されている。***P=0.0004。各点は異なるマウスを表す(n=4)。図5Eは、 1×10^{11} vgシングルAAV8 SaKKH-ABE8eによって処置されたヒト化マウスにおける血漿PCSK9タンパク質を示す。図5Fは、 1×10^{11} vgシングルAAV8 SaKKH-ABE8e、デュアルAAV8 SpABE8e、または非標的化対照どちらかによって処置されたC57BL/6Jマウスにおける血漿Pcsk9タンパク質を示す。***P=0.0001。図5Gは、 1×10^{11} vgシングルAAV8 SaKKH-ABE8eまたは非標的化対照によって処置されたC57BL/6Jマウスにおける血漿Angptl3タンパク質を示す。**P=0.0027。図5Hは、 1×10^{11} vgシングルAAV8 SaKKH-ABE8eによって処置されたヒト化マウスにおける血漿総コレステロールを示す。図5Iは、 1×10^{11} vgシングルAAV8 SaKKH-ABE8e、デュアルAAV8 SpABE8e、または非標的化対照どちらかによって処置されたC57BL/6Jマウスにおける血漿総コレステロールを示す。***P=0.0007。図5Jは、血漿総コレステロール***P=0.0007および血漿トリグリセリド*P=0.0118を示す。図5Kは、 1×10^{11} vgシングルAAV8 SaKKH-ABE8eまたは非標的化対照によって処置されたマウスのC57BL/6Jを示す。図5E~5Kでは、点は平均値を表し、エラーバーはn=5の異なるマウスのSEMを表す。有意性は、図5C~5Dについて、2元配置の対応のないt検定を使用して計算された。図5F~5Gおよび図5I~5Kの有意性は、適宜TukeyまたはSidak多重比較によって2元配置反復測定ANOVAを使用して計算され、全てのグラフについて第4週時点について示されているが、第4週のタンパク質レベルが統計的有意性に達しなかったため第3週の有意性が示されている図5Fを例外とする。全ての場合において、非標的化対照は、マウスゲノム上の無関係な部位のマウスDnmt1を標的化するsgRNAによるデュアルAAV8 SpABE7.10であり、同じ時点、経路、および用量で投与されている。

【0038】

【図6】図6は、マウスNeuro-2Aおよび3T3細胞におけるSaABE標的の検証を示す。塩基エディタおよびPAMがバーの各セットの下に注記されている。点は独立した生物学的反復(n=3)を表し、エラーバーはSEMを示す。

【0039】

【図7】図7は、in vivoのsgRNAカセットAAVのタイトレーションを示す。 4×10^{11} vgの一定用量の全長SaABE8eエディタAAVが、様々な割合のsgRNAカセット含有AAVと共に後眼窩注射によってC57BL/6Jマウスへ送達された。注射の3週間後に組織が採取され、HTSによって分析された。点は個々のマウスを表し(n=3)、エラーバーはSEMを示す。

【0040】

【図8A-8B】図8Aは、肝臓におけるPcsk9 W8RにおけるSaABE8e活性ウィンドウを示す。SaABE8eは、培養細胞における観察と整合したin vivoの広い編集ウィンドウを維持する。図8Bは、インデルが全ての条件下で低く留まり、 8×10^{11} vgシングルAAV SaABE8eの高い用量においては、夫々心臓、筋肉、および肝臓組織において2.4%、1.

10

20

30

40

50

6%、および1.1%のインデルに達するというを示す。点は個々のマウスを表し(n=3)、エラーバーはSEMを示す。

【0041】

【図9A-9C】HEK293T細胞においてPCSK9(図9A)、ならびにマウスNeuro-2a細胞においてPcsk9(図9B)およびAngptl3(図9C)を標的化するガイドを検証。各sgRNAについて、エクソン、標的の型(開始コドン、スプライスドナー、またはスプライスアクセプター)、ABE8eバリエーション(SaABE8eまたはSaKKH-ABE8e)、および22ntプロトスペーサ長さについて指示されている標的を破壊するプロトスペーサ位置が指示されている。指示されている標的を破壊する位置における編集がプロットされている。点は独立した反復を表し(n=2)、エラーバーは標準偏差(SD)を示す。

10

【0042】

【図10A-10B】図10Aおよび10Bは、Pcsk9エクソン1スプライスドナー標的ににおけるSauriABE8eによるNeuro-2A細胞における編集を示す。図10Aは、マウスNeuro-2A細胞におけるSauriABE8eおよびSaKKH-ABE8eによるマウスPcsk9エクソン1スプライスドナーの標的化を示す。標的アデニンは、SauriプロトスペーサについてはAg、SaKKHプロトスペーサについてはA₅である。図10Bは、マウスPcsk9エクソン1スプライスドナーにおける編集活性に対するSaCas9ガイドRNA骨格^{33,74}の比較を示す。SauriCas9の自然状態のsgRNAは知られていないため、SaCas9 sgRNA骨格が相同なSauriCas9タンパク質と共に使用される。

20

【0043】

【図11A-11B】脂質改変実験のための対照AAVのin vivo編集。6~8週齢のC57BL/6Jマウスが後眼窩注射によって注射され、4週間後にHTSによって肝臓全部が分析された。図11Aは、 1×10^{11} vgデュアルAAV8の用量におけるデュアルSpABE7.10によるDnmt1 A41Aにおける編集(サイレントな編集)を示す。図11Bは、 1×10^{11} vgシングルAAV8の用量でシングルSaKKH-ABE8eを使用したPcsk9 W8R置換の組み入れを示す。

【0044】

【図12A-12D】血漿Pcsk9および総コレステロールに対する(Pcsk9エクソン1スプライスドナー部位を標的化するsgRNAによる)シングルAAV8 SaKKH-ABE8eおよびデュアルAAV8 SpABE8eの用量反応。図12Aは循環Pcsk9タンパク質を示し、図12Bは、毎週取られた血漿からの総コレステロールを示す。ベースラインに対して正規化されている。生の(正規化されていない)毎週取られた血漿から、図12Cは循環Pcsk9タンパク質を示し、図12Dは総コレステロールを示す。点は平均値を表し、エラーバーはn=5の異なるマウスのSEMを表す。全てのマウスは、凡例において指示されているAAV8の総用量を後眼窩注射によって6~8週齢において全身投与され、血液試料が4週間にわたって逐次的に取り除かれた。

30

【0045】

【図13A-13E】ヒトPCSK9およびマウスAngptl3標的についての、シングルAAV ABEまたは非標的化対照デュアルAAV ABEマウスどちらかの血漿アナライズの生の(正規化されていない)レベル。図13Aは、ヒト化マウスからの血漿中のヒトPCSK9のELISAを示す。図13Bは、ヒト化PCSK9マウスにおける総血漿コレステロールを示す。図13Cは、C57BL/6Jマウスからの血漿中のマウスAngptl3のELISAを示す。図13Dは、C57BL/6Jマウスにおける総血漿コレステロールを示す。図13Eは、C57BL/6Jマウスからの血漿トリグリセリドを示す。点は平均値を表し、エラーバーはn=5の異なるマウスのSEMを表す。非標的化対照は、Dnmt1を標的化するデュアルAAV ABE7.10である。全てのマウスは、6~8週齢において後眼窩注射によって 1×10^{11} vg AAV8の用量を全身投与され、血液試料が4週間にわたって逐次的に取り除かれた。

40

【0046】

【図14】図14は、ウラシルグリコシラーゼドメインを包含するシトシン塩基エディタを発現するシングルAAVベクターの構築物を示す概略図である。シトシン塩基エディタ

50

のCas9ドメインはCjCas9である。U6によって制御されるsgRNAが3'端に逆向きで位置する。この構築物は、ITRを包含する5.012kbの総長さを有する。

【0047】

【図15】図15は、Pcsk9エクソン1スプライスドナー部位における、シングルAAV SaKKH-ABE8eとデュアルAAV SaKKH-ABE8eとの間の、ガイド依存的なオンターゲット編集の塩基エディタをマッチした比較を示す。

【0048】

【図16A-16C】図16A~16Cは、シングルAAV8 SaKKHとAAV8インテイン分割SaKKH-ABE8eの各半分との間において、in vivoおよび培養におけるガイド依存的なオフターゲットDNA編集分析を示す。図16Aは、シングルAAV ABE処置されたマウスからの肝臓組織におけるin vivo編集を示す。Pcsk9エクソン1スプライスドナーを標的化するSaKKH-ABE8eの上位3つの予測されるオフターゲット(「OT」)部位が、肝臓組織から配列決定された。図16Bは、OT2において観察された編集が用量依存的であるということを示す。OT、オフターゲット;NT、無関係の遺伝子Dnmt1を標的化する用量をマッチした非標的化デュアルAAV8 ABE7.10。図16Cは、細胞培養における編集を示す。Pcsk9エクソン1ドナー部位を標的化するsgRNAおよび全長またはインテイン分割SpABE8eによるN2A細胞のプラスミドトランスフェクション後に、オンおよびオフターゲット部位が配列決定された。全長およびインテイン分割SpABE8eは、多重比較のための補正のためのHolm-Sidak法による対応のない多重t検定によって、オンまたはオフターゲット編集において効率が有意に異ならなかった。

10

20

【0049】

【図17】図17は、in vivo mRNAオフターゲット編集が、シングルAAV ABE8e処置されたマウスにおいて検出不可能であるということを示す。点は、n=4マウスの各アンプリコン上の単一のアデニンを表す。

【0050】

【図18】図18は、肝臓における例示的なシングルAAVにコードされるABEの編集ウィンドウの比較を示す。

【0051】

【図19A-19B】図19A、無処置マウス、および図19B、ヒトPCSK9を標的化する 1×10^{11} vgのシングルAAV8 SaKKH-ABE8eによる処置の4週間後のマウスからの、肝臓のヘマトキシリン・エオジン染色による組織病理学的評価。代表的な画像が示されている。スケールバー、50 μ m。

30

【0052】

【図20】図20は、SaABE8eデュアルAAV(1つのゲノム上に無傷のエディタを有するSaABE8e、第2のゲノム上にsgRNAおよびEGFP)またはシングルAAV(SaABE8eおよびガイドRNA、オールインワン)をコードする組織からのAAVゲノムの定量を示す。両方ともPcsk9 W8Rを組み入れ、AAV9にパッケージングされる。エディタがAAV9にパッケージングされ、後眼窩注射によって、6~8週齢において、凡例において指示されている用量で投与された(デュアルAAVは、エディタAAVおよびsgRNA AAVの凡例に指示されている用量で送達され、シングルAAVは指示されている総用量で送達された)。注射の3週間後に組織が採取され、次いで、エディタAAVゲノムがSaCas9プライマーおよびプロンプを使用してddPCRによって定量され、Gapdhに対して正規化された。点は個々のマウス(n=1~3)を表し、エラーバーはSEMを示す。

40

【0053】

【図21】図21は、パッケージングされたAAVゲノムのアルカリゲル電気泳動を示す。

【0054】

【図22A-22D】図22A~22Dは、オフターゲットmRNA編集を示す。シングルAAV8 SaKKH-ABE8eによって処置されたマウス肝臓および無処置マウス肝臓からRNAが抽出され、逆転写され、Aars、Canx、Ctnnb、およびUsp38 mRNAからのcDNAアンプリコンがHTSによって分析された。点は、配列決定されたアンプリコン上の個々のア

50

デニンを表す($n=3$ 匹のマウス)。

【発明を実施するための形態】

【0055】

発明の詳細な説明

本明細書においては、単一の組換えAAV(rAAV)ベクターにおいて細胞または組織へ塩基エディタタンパク質を送達するための方法および組成物が提供される。本明細書においては、これらの塩基エディタをin vivoで(それを必要とする対象などへ)単一のrAAV粒子において送達するための改善された方法および組成物が企図される。単一のrAAV粒子における送達は、標的組織への送達のためにより少数の注射およびより低い用量を要求し、ならびに標的細胞における塩基エディタの発現に必要な標的組織の首尾良い形質導入の数を半分に低減するという利点を有する。これらのrAAVベクターは、サイズが最小化された塩基エディタと、ベクターがrAAV粒子の4.7kb~4.9kbパッケージング容量以内の長さを有することを可能にする調節構成要素とを含む。開示されるrAAVベクターのいずれかおよびカプシドタンパク質を含有するrAAV粒子、ならびにそれを含む組成物および細胞もまた提供される。かかる組成物および細胞を対象へ投与方法がさらに提供される。さらに、塩基エディタ、ならびにこれらの塩基エディタを含む組成物および細胞が提供される。開示されるシングルAAVアデニン塩基エディタは、in vivoの種々の組織において、デュアルAAVエディタと比較して同程度のまたは増強された編集効率を提供する。

10

【0056】

組換えAAVベクター(またはAAVゲノム)はトランスジーン送達のために広く使用される。トランスジーンは、逆位末端反復(ITR)配列間においてAAVゲノム上に挿入され、AAVウイルス粒子にパッケージングされ、これらが宿主細胞(例として、哺乳動物細胞、ヒト細胞)に形質導入するために使用される。AAVは、ヒト疾患の動物モデルにおいて、治療において、およびFDA承認された薬物において、多くの治療用タンパク質をコードする遺伝子を送達するために使用されている。一連の利用可能なAAV血清型は、マウス、非ヒト霊長目の動物、およびヒトにおける種々の臨床上該当する細胞型へのアクセスを提供する。

20

【0057】

本開示は、先行技術のベクターよりも大きいトランスジーンのパッケージングを許すサイズが最小化された調節エレメントを有するrAAVベクターを提供する。いくつかの態様において、トランスジーンは、アデニン塩基エディタなどの塩基エディタをコードする。いくつかの態様において、トランスジーンは塩基エディタではない。いくつかの態様において、塩基エディタは、コンパクトなタンパク質であるnapDNAbpドメイン、たとえば*S. aureus* Cas9(SaCas9)、*N. meningitidis* 2 Cas9(Nme2Cas9)、*C. jejuni* Cas9(CjCas9)、もしくは*S. auricularis*(SauriCas9)ドメイン、またはそのバリエーションを含む。

30

【0058】

いくつかの側面において、本明細書においては、(i)5'ITR、(ii)第1のプロモータに作動可能に連結された塩基エディタをコードする配列(ここで、塩基エディタは、核酸プログラマブルDNA結合タンパク質(napDNAbp)ドメインおよびデアミナーゼドメインを含む);およびポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む第1の核酸断片;(iii)第2のプロモータに作動可能に連結されたガイドRNA(gRNA)をコードする第2の核酸断片;ならびに(iv)3'ITR、を含む第1の核酸断片を含むrAAVベクターが提供され、ここで、5'ITRと3'ITRとの間の長さは約4.90kb未満である。いくつかの態様において、rAAVベクターは本質的に構成要素(i)~(iv)からなる。

40

【0059】

いくつかの態様において、核酸ベクターは、rAAV粒子にパッケージングされたアデノ随伴ウイルスのゲノムである。いくつかの態様において、第1および/または第2の核酸断片は、第1のプロモータに作動可能に連結される。いくつかの態様において、第1のプロモータは恒常的プロモータである。いくつかの態様において、第1のプロモータは誘導

50

性プロモータである。

【0060】

種々の態様において、第1のプロモータは短いプロモータである。種々の態様において、第1のプロモータは、325ヌクレオチド未満、300ヌクレオチド未満、285ヌクレオチド未満、270ヌクレオチド未満、265ヌクレオチド未満、または250ヌクレオチド未満の長さを有する。この短い長さは、塩基エディタおよび追加の調節エレメントのための最適なパッケージング容量を保証する。いくつかの態様において、第1のプロモータは、200と250との間の長さのヌクレオチド、225と255との間の長さのヌクレオチド、250と275との間の長さのヌクレオチド、275と300との間の長さのヌクレオチド、または300と325との間の長さのヌクレオチドを有する。ある特定の態様において、第1のプロモータは280ヌクレオチドの長さを有する。いくつかの態様において、第1のプロモータは、229ヌクレオチド、253ヌクレオチド、または324ヌクレオチドの長さを有する。

10

【0061】

いくつかの態様において、第1のプロモータは組織特異的プロモータである。第1のプロモータは、心臓組織特異的プロモータ、筋肉組織特異的プロモータ、またはニューロン組織特異的プロモータであり得る。第1のプロモータは、肝臓、筋肉、およびニューロン以外の組織、たとえば眼組織において活性であり得る。いくつかの態様において、第1のプロモータは神経筋組織において活性である。

【0062】

いくつかの態様において、第1のプロモータはEF-1 α (ショート)(「EFS」)プロモータであり、これはEF-1 α のイントロンなしの形態である。いくつかの態様において、第1のプロモータは、ニューロン組織において活性であるMeCP2プロモータである。いくつかの態様において、第1のプロモータは、肝臓組織において活性であるP3プロモータである。いくつかの態様において、第1のプロモータは、肝臓組織において活性であるU1aプロモータである。MeCP2プロモータ、P3プロモータ、およびU1aプロモータについての追加の詳細は、夫夫、Gray et al., Human Gene Therapy, Sep 2011, 1143-1153; Viecelli et al., Hepatology, 60: 1035-1043 (2014); および Ibraheim et al., Genome Biol. 19, 137 (2018)に見出される。これらの各々は参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【0063】

いくつかの態様において、第1の核酸断片は転写ターミネータを含む。種々の態様において、第1の核酸断片は転写後応答エレメント(例としてW3)を含有しない。いくつかの態様において、転写ターミネータは、ウシ成長ホルモン(bGH)シグナル、ヒト成長ホルモン(hGH)シグナル、またはSV40シグナルから選択されるポリAシグナルである。いくつかの態様において、ターミネータはbGHポリAシグナルである。いくつかの態様において、ターミネータはSV40後期ポリAシグナルである。

30

【0064】

いくつかの態様において、第1の核酸断片はマウス最小微小ウイルス(MVM)イントロンを含む。いくつかの態様において、MVMはプロモータの5'およびトランスジーンの3'に位置する。

40

【0065】

いくつかの態様において、第2の核酸断片は、第2のプロモータに作動可能に連結されたgRNAをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様において、第2のプロモータは恒常的プロモータである。いくつかの態様において、第2のプロモータは誘導性プロモータである。いくつかの態様において、第2のプロモータは、ヒトU6プロモータなどのU6プロモータである。いくつかの態様において、第2の核酸断片の転写の方向は、第1の核酸断片の転写の方向に対して相対的に逆転している。

【0066】

プロモータおよびターミネータを含有する第1の核酸断片とガイドRNAをコードし得る第2の核酸断片とを含有する、開示されるrAAVベクターは、開示される塩基エディタの

50

1つ以上をコードするトランスジーンにフィットする長さの5'ITRと3'ITRとの間のパッケージ容量を有する。例えば、開示されるAAVベクターは、4.7kbと4.9kbとの間の5'ITRと3'ITRとの間の長さを含み得る。開示されるAAVベクターは、4.7kbと5.1kbとの間の5'ITRと3'ITRとの間の長さを含み得る。開示されるAAVベクターは、4.6kbと4.9kbとの間、または4.6kbと4.8kbとの間の5'ITRと3'ITRとの間の長さを含み得る。ある特定の態様において、5'ITRと3'ITRとの間の長さは、約4.60kb、約4.65kb、約4.70kb、約4.725kb、約4.75kb、約4.80kb、約4.825kb、約4.85kb、約4.90kb、または約4.95kbである。

【0067】

種々の態様において、長さ、5'ITRと3'ITRとの間の長さは約4.90kb未満である。いくつかの態様において、5'ITRと3'ITRとの間の長さは約4.80kbである。いくつかの態様において、ITR間の長さは4.804kb(4804bp)である。いくつかの態様において、ITR間の長さは4.828kbである。いくつかの態様において、ITR間の長さは4.722kbである。

【0068】

本開示は、サイズが最小化されたアデニン塩基エディタを含むrAAVベクター、およびサイズが最小化されたシトシン塩基エディタを含むrAAVベクターを提供する。本開示の例示的なAAVベクターが図2Aおよび14に示されている。

【0069】

いくつかの側面において、本明細書においては、(i)5'ITR;(ii)第1のプロモータに作動可能に連結されたSaKKH-ABE8e、SauriCas9-ABE8e、CjCas9-ABE8e塩基エディタ、またはNme2Cas9塩基エディタをコードする配列(ここで、第1のプロモータはEFS、MeCP2、P3、およびU1Aプロモータから選択される);およびbGHポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む第1の核酸断片;(iii)U6プロモータに作動可能に連結されたガイドRNA(gRNA)をコードする第2の核酸断片(ここで、第2の核酸断片の転写の方向は核酸分子の転写の方向に対して相対的に逆転している);ならびに(iv)3'ITRを含むrAAVベクターが提供される。いくつかの態様において、rAAVベクターは第1の核酸断片を含み、(i)5'ITR;(ii)EFSプロモータに作動可能に連結されたSauri-ABE8e塩基エディタをコードする配列;およびポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む第1の核酸断片;(iii)U6プロモータに作動可能に連結されたガイドRNA(gRNA)をコードする第2の核酸断片(ここで、第2の核酸断片の転写の方向は核酸分子の転写の方向に対して相対的に逆転している);ならびに(iv)3'ITRを含む。種々の態様において、5'ITRと3'ITRとの間の長さは約4.90kb未満である。いくつかの態様において、ポリ(A)シグナルはbGHポリ(A)シグナルである。

【0070】

ある特定の態様において、rAAVベクターは5'から3'に次を含む:(i)5'ITR;(ii)EFSプロモータに作動可能に連結されたSaKKH-ABE8e塩基エディタをコードする配列;およびbGHポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む第1の核酸断片;(iii)U6プロモータに作動可能に連結されたガイドRNA(gRNA)をコードする第2の核酸断片(ここで、第2の核酸断片の転写の方向は核酸分子の転写の方向に対して相対的に逆転している);ならびに(iv)3'ITR。いくつかの態様において、rAAVベクターは第1の核酸断片を含み、(i)5'ITR;(ii)EFSプロモータに作動可能に連結されたSauri-ABE8e塩基エディタをコードする配列;およびbGHポリアデニル化(ポリA)シグナルを含む第1の核酸断片;(iii)U6プロモータに作動可能に連結されたガイドRNA(gRNA)をコードする第2の核酸断片(ここで、第2の核酸断片の転写の方向は核酸分子の転写の方向に対して相対的に逆転している);ならびに(v)3'ITRを含む。いくつかの態様において、塩基エディタはSauriCas9-ABE8eである。いくつかの態様において、塩基エディタはCjCas9-ABE8eである。

【0071】

いくつかの態様において、rAAVベクターはCBEをコードし、5'から3'に次を含む:(i)5'ITR;(ii)EFSプロモータである第1のプロモータに作動可能に連結されたCjCas9-FER

10

20

30

40

50

NY-BE3.9またはCjCas9-evoFERNY-BE3塩基エディタをコードする配列;およびポリ
アデニル化(ポリA)シグナルを含む第1の核酸断片;(iii)U6プロモータに作動可能に連結
されたガイドRNA(gRNA)をコードする第2の核酸断片(ここで、第2の核酸断片の転写の
方向は核酸分子の転写の方向に対して相対的に逆転している);ならびに(iv)3'ITR。いく
つかの態様において、rAAVベクターはCBEをコードし、5'から3'に次を含む:(i)5'ITR;
(ii)第1のプロモータに作動可能に連結されたCjCas9-FERNY-BE3.9またはCjCas9-ev
oFERNY-BE3塩基エディタをコードする配列(ここで、第1のプロモータはEFS、MeCP
2、P3、およびU1Aプロモータから選択される);およびポリアデニル化(ポリA)シグナル
を含む第1の核酸断片;(iii)U6プロモータに作動可能に連結されたガイドRNA(gRNA)を
コードする第2の核酸断片(ここで、第2の核酸断片の転写の方向は核酸分子の転写の方向
に対して相対的に逆転している);ならびに(iv)3'ITR。いくつかの態様において、ポリ(A)
)シグナルはbGHポリ(A)シグナルである。いくつかの態様において、ポリ(A)シグナルは
SV40ポリ(A)シグナルである。

10

【0072】

種々の態様において、開示されるrAAVベクターのいずれかはAAV8カプシドにカプシ
ド化される。いくつかの態様において、開示されるrAAVベクターはAAV9カプシドにカ
プシド化される。

【0073】

さらに、コードされた塩基エディタの高い発現レベルのための開示されるAAVベクタ
ー上の調節エレメントの実証試験が本明細書において提供される。

20

【0074】

定義

本明細書および請求項に使用されるとき単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、およ
び「その(the)」は、文脈が明確に別様に指示しない限り、単数および複数を包含する。
それゆえに、例えば、「薬剤」の参照は単一の薬剤および複数のかかる薬剤を包含する。

【0075】

「アデノ随伴ウイルス」または「AAV」は、ヒトおよびいくつかの他の霊長目の動物
種に感染するウイルスである。野生型AAVゲノムは、ポジティブまたはネガティブセン
スどちらかの一本鎖デオキシリボ核酸(ssDNA)である。ゲノムは、2つの逆位末端反復(I
TR)をDNAストランドの各端に1つ、ならびに2つのオープンリーディングフレーム(OR
F):repおよびcapをITR間に含む。rep ORFは、AAVライフサイクルに要求されるRep
タンパク質をコードする4つのオーバーラップする遺伝子を含む。cap ORFは、カプシ
ドタンパク質VP1、VP2、およびVP3をコードするオーバーラップする遺伝子を含み、
これらは一緒に相互作用してウイルスカプシドを形成する。VP1、VP2、およびVP3は
1つのmRNA転写物から翻訳され、これらは2つの異なる様式でスプライシングされ得る
。より長いまたはより短いイントロンどちらかが切り出され、mRNAの2つのアイソフォ
ーム:大凡2.3kbおよび大凡2.6kbの長さのmRNAアイソフォームの形成をもたらす得る
。カプシドは、およそ60個の個々のカプシドタンパク質サブユニットの超分子アセンブ
リをノンエンベロープT-1二十面体格子に形成し、AAVゲノムを保護することができる
。成熟カプシドは、約1:1:10の比のVP1、VP2、およびVP3(夫々およそ87、73、お
よび62kDaの分子質量)から組成される。

30

40

【0076】

rAAV粒子は核酸ベクター(例として組換えゲノム)を含み得、これは最小で次を含み得
る:(a)問題のタンパク質もしくはポリペプチド(例として塩基エディタ)または問題のRN
A(例としてgRNA)をコードする配列を含む1以上の異種核酸領域(またはトランスジーン
);および(b)1以上の核酸領域(例として異種核酸領域)をフランキングする逆位末端反復(I
TR)配列(例として、野生型ITR配列または操作されたITR配列)を含む1以上の領域。い
くつかの態様において、核酸ベクターはサイズが4kbと5kbとの間である(例としてサイ
ズが4.2~4.7kb)。いくつかの態様において、核酸ベクターは環状である。いくつかの
態様において、核酸ベクターは一本鎖である。いくつかの態様において、核酸ベクターは

50

二本鎖である。いくつかの態様において、二本鎖核酸ベクターは、例えば、核酸ベクターの別の領域に対して相補的であり、核酸ベクターの二本鎖性の形成を開始する核酸ベクターの領域を含有する自己相補的なベクターであり得る。

【0077】

本明細書に使用されるとき、用語「アデノシンデアミナーゼ」または「アデノシンデアミナーゼドメイン」は、アデノシン(またはアデニン)の脱アミノ化反応を触媒するタンパク質または酵素を言う。用語は交換可能に使用される。ある特定の態様において、本開示は、1以上のアデノシンデアミナーゼドメインを含む塩基エディタを提供する。例えば、アデノシンデアミナーゼドメインは、リンカーによって接続された第1のアデノシンデアミナーゼドメインおよび第2のデアミナーゼドメインのヘテロ二量体を含み得る。本明細書において提供されるアデノシンデアミナーゼ(例として、操作されたアデノシンデアミナーゼまたは進化したアデノシンデアミナーゼ)は、おそらく、DNAまたはRNA上のアデニン(A)をイノシン(I)に変換する酵素であり得る。かかるアデノシンデアミナーゼはA:TからG:Cの塩基対変換に至り得る。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ある生物からの天然に存在するデアミナーゼのバリエーションである。いくつかの態様において、デアミナーゼは天然に存在しない。例えば、いくつかの態様において、デアミナーゼは、天然に存在するデアミナーゼと、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一である。

【0078】

いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、*E. coli*、*S. aureus*、*S. typhi*、*S. putrefaciens*、*H. influenzae*、または*C. crescentus*などの細菌に由来する。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼはTadAデアミナーゼである。いくつかの態様において、TadAデアミナーゼは*E. coli* TadAデアミナーゼ(ecTadA)である。いくつかの態様において、TadAデアミナーゼは、トランケーションされた*E. coli* TadAデアミナーゼである。例えば、トランケーションされたecTadAは、全長ecTadAに対して相対的に1以上のN末端アミノ酸を欠いていてもよい。いくつかの態様において、トランケーションされたecTadAは、全長ecTadAに対して相対的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、6、17、18、19、または20個のN末端アミノ酸残基を欠き得る。いくつかの態様において、トランケーションされたecTadAは、全長ecTadAに対して相対的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、6、17、18、19、または20個のC末端アミノ酸残基を欠き得る。いくつかの態様において、ecTadAデアミナーゼはN末端メチオニンを含まない。2018年3月15日公開の米国特許出願公開第2018/0073012号明細書の参照がなされる。これは参照によって本明細書に組み込まれる。

【0079】

遺伝学において、二本鎖DNA内のある断片の「アンチセンス」鎖は鋳型鎖であり、これは3'から5'方向に伸びると考えられる。対照的に、「センス」鎖は5'から3'に伸びる二本鎖DNA内の断片であり、これは3'から5'に伸びるDNAのアンチセンス鎖または鋳型鎖に対して相補的である。タンパク質をコードするDNA断片のケースでは、センス鎖は、mRNAと同じ配列を有するDNAのストランドである。これは、転写の間にはアンチセンス鎖をその鋳型として取り、最終的に(常にではないが典型的には)タンパク質への翻訳を経過する。それゆえに、アンチセンス鎖は後でタンパク質に翻訳されるRNAを担い、センス鎖はmRNAのものと同一に近い作りを所有する。dsDNAの各断片については、可能性として、どの方向に読むかに依存して、センスおよびアンチセンスの2つのセットがあるということに留意されたい(センスおよびアンチセンスは見方に対して相対的であるため)。究極的には、dsDNAの1つの断片のどのストランドがセンスまたはアンチセンスと言われるかを規定するのは、遺伝子産物またはmRNAである。

【0080】

「塩基編集」は、標的化されたゲノム遺伝子座における特定の核酸塩基から別のものへの変換が関わるゲノム編集テクノロジーを言う。ある特定の態様において、これは、二本鎖DNA切断(DSB)または一本鎖切断(すなわちニック)を要求することなしに達成され得る。今日まで、CRISPRに基づくシステムを包含する他のゲノム編集技術は、問題の遺伝子座におけるDSBの導入から始まる。続いて、細胞のDNA修復酵素が切断部を修繕し、普通には、DSBの部位における塩基のランダムな挿入または欠失(インデル)をもたらす。しかしながら、標的遺伝子座における点突然変異の導入または修正が遺伝子全体の確率的破壊よりもむしろ望まれるときには、これらのゲノム編集技術は不適である。修正率が低く(例として、典型的には0.1%~5%)、主要なゲノム編集産物はインデルであるからである。ランダムなインデルを同時に導入することなしに遺伝子修正の効率を増大させるために、本発明者らは以前にCRISPR/Cas9システムを改変して、DSB形成なしに1つのDNA塩基を別のものに直接変換した。Komor, A.C., et al., Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420-424 (2016)を見よ。この内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【0081】

本明細書に使用されるとき、用語「塩基エディタ(BE)」は、核酸配列(例としてDNAまたはRNA)内の塩基(例として、A、T、C、G、またはU)の改変をなすことができるポリペプチドを含む薬剤を言い、これは、1つの塩基を別のものに変換する(例としてAからG、AからC、AからT、CからT、CからG、CからA、GからA、GからC、GからT、TからA、TからC、TからGに)。いくつかの態様において、塩基エディタは、DNA分子内の塩基などの核酸内の塩基を脱アミノ化することができる。アデニン塩基エディタのケースでは、塩基エディタはDNA上のアデニン(A)を脱アミノ化することができる。かかる塩基エディタは、アデノシンデアミナーゼに融合された核酸プログラマブルDNA結合タンパク質(napDNAbp)を包含し得る。いくつかの塩基エディタは、本明細書に記載される塩基編集方法に利用されるCRISPRによって媒介される融合タンパク質を包含する。いくつかの態様において、塩基エディタはデアミナーゼに融合されたヌクレアーゼ不活性なCas9(dCas9)を含み、これはガイドRNAによってプログラムされる様式でRループの形成を介して核酸に結合するが、核酸を切断しない。例えば、2017年4月27日に国際公開第2017/070632号として公開され、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるPCT/US2016/058344号明細書に記載されるとおり、融合タンパク質のdCas9ドメインは、D10AおよびH840A突然変異を包含し得る(これは、Cas9を、核酸二重鎖の一方のストランドのみを切断することができるようにする)。S. pyogenes Cas9のDNA切断ドメインは、2つのサブドメイン、HNHヌクレアーゼサブドメインおよびRuvC1サブドメインを包含する。HNHサブドメインはgRNAに対して相補的なストランド(「標的化されたストランド」、または編集もしくは脱アミノ化が生起するストランド)を切断し、RuvC1サブドメインはPAM配列を含有する非相補的なストランド(「編集されないストランド」)を切断する。RuvC1変異体D10Aは標的化されたストランドにおけるニックを生成し、HNH変異体H840Aは編集されないストランド上にニックを生成する(Jinek et al., *Science*, 337:816-821(2012); Qi et al., *Cell*, 28;152(5):1173-83 (2013)を見よ。これらの各々は参照によって本明細書に組み込まれる)。

20

30

40

【0082】

いくつかの態様において、塩基エディタは高分子または高分子複合体であり、これは、主として(例として、80%よりも多く、85%よりも多く、90%よりも多く、95%よりも多く、99%よりも多く、99.9%よりも多く、または100%)ポリ核酸配列上の核酸塩基から別の核酸塩基への変換(すなわち、トランジションまたはトランスバージョン)をもたらす、1)ヌクレオチド、ヌクレオシド、または核酸塩基修飾酵素と2)特定の核酸配列に結合するようにプログラムされ得る核酸結合タンパク質との組み合わせを使用する。

【0083】

いくつかの態様において、塩基エディタは、それを標的配列へと導くDNA結合ドメイ

50

ン(例として、dCas9またはnCAs9などのプログラマブルDNA結合ドメイン)を含む。いくつかの態様において、塩基エディタは、プログラマブルDNA結合ドメイン(例として、dCas9またはnCAs9)に融合された核酸塩基修飾酵素を含む。「核酸塩基修飾酵素」は、核酸塩基を修飾し、1つの核酸塩基を別のものに変換し得る酵素である(例として、アデノシンデアミナーゼなどのデアミナーゼ)。ある特定の型の塩基変換(例としてアデノシン(A)からグアニン(G)、CからG)を行う塩基エディタが企図される。

【0084】

いくつかの態様において、塩基エディタはAをGに変換する。いくつかの態様において、塩基エディタはアデノシンデアミナーゼを含む。「アデノシンデアミナーゼ」は、プリン代謝に関わる酵素である。それは、食物からのアデノシンの分解および組織における核酸の代謝回転に必要とされる。ヒトにおけるその一次的な機能は、免疫システムの発生および維持である。アデノシンデアミナーゼは、DNAの文脈において、アデノシンの加水分解的脱アミノ化を触媒する(イノシンを形成し、これはGとして塩基対形成する)。DNAに対して作用する天然のアデノシンデアミナーゼは知られていない。代わりに、知られているアデノシンデアミナーゼ酵素はRNA(tRNAまたはmRNA)に対してのみ作用する。DNA基質を受け取りdAをデオキシイノシンへと脱アミノする進化したデオキシアデノシンデアミナーゼ酵素は、例として、国際公開第2018/027078号として公開された2017年8月3日出願のPCT出願第PCT/US2017/045381号明細書、および2019年11月28日に国際公開第2019/226953号として公開された2019年5月23日出願のPCT出願第PCT/US2019/033848号明細書、2018年10月30日に;米国特許第10,113,163号明細書として発行した2018年3月15日公開の米国特許出願公開第2018/0073012号明細書;2019年1月1日に米国特許第10,167,457号明細書として発行した2017年5月4日公開の米国特許出願公開第2017/0121693号明細書;2017年4月27日公開の国際公開第2017/070633号;2015年6月18日公開の米国特許出願公開第2015/0166980号明細書;2017年12月12日発行の米国特許第9,840,699号明細書;2018年9月18日発行の米国特許第10,077,453号明細書;2019年1月31日公開の国際公開第2019/023680号;2019年11月28日に国際公開第2019/226593号として公開された2019年5月23日出願の国際出願第PCT/US2019/033848号明細書;2018年9月27日公開の国際公開第2018/0176009号、2020年2月27日公開の国際公開第2020/041751号;2020年3月12日公開の国際公開第2020/051360号;2020年5月22日公開の国際公開第2020/102659号;2020年4月30日公開の国際公開第2020/086908号;2020年9月10日公開の国際公開第2020/181180号;2020年10月22日公開の国際公開第2020/214842号;2020年5月7日公開の国際公開第2020/092453号;2020年11月26日公開の国際公開第2020/236982号;2021年6月3日公開の国際公開第2021/108717号、および2021年8月12日公開の国際公開第2021/158921号に記載されている。これらの各々の内容はそれらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0085】

いくつかの態様において、塩基エディタはCをTに変換する。いくつかの態様において、塩基エディタはシチジンデアミナーゼを含む。「シチジンデアミナーゼ」または「シチジンデアミナーゼ」は、化学反応「シトシン+H₂O→ウラシル+NH₃」または「5-メチルシトシン+H₂O→チミン+NH₃」を触媒する酵素を言う。反応式から明らかであり得るとおり、かかる化学反応はCからU/Tへの核酸塩基の変化をもたらす。遺伝子の文脈において、かかるヌクレオチド変化または突然変異は翻ってタンパク質上のアミノ酸変化に至り得、これはタンパク質の機能に影響し得る。例として機能喪失または機能獲得である。いくつかの態様において、シトシン塩基エディタは、シチジンデアミナーゼに融合されたdCas9またはnCAs9を含む。いくつかの態様において、シチジンデアミナーゼドメインは、dCas9またはnCAs9のN末端に融合される。いくつかの態様において、塩基エディタは、ウラシルグリコシラーゼを阻害するドメインおよび/または核局在シグナルをさらに含む。かかる塩基エディタは、当該技術分野において、例として、Rees & Liu, Nat Rev Genet. 2018;19(12):770-788、Rees, et al.Sci.Advances 5, eaax5717 (

2019)、および Koblan et al., Nat Biotechnol. 2018;36(9):843-846;ならびに 2018年10月30日に米国特許第10,113,163号明細書として発行した2018年3月15日公開の米国特許出願公開第2018/0073012号明細書;2019年1月1日に米国特許第10,167,457号明細書として発行した2017年5月4日公開の米国特許出願公開第2017/0121693号明細書;2017年4月27日公開の国際公開第2017/070633号;2015年6月18日公開の米国特許出願公開第2015/0166980号明細書;2017年12月12日発行の米国特許第9,840,699号明細書;2018年9月18日発行の米国特許第10,077,453号明細書;2019年1月31日公開の国際公開第2019/023680号;2018年9月27日公開の国際公開第2018/0176009号、2019年5月23日出願のPCT出願第PCT/US2019/033848号明細書、2019年8月23日出願のPCT出願第PCT/US2019/47996号明細書;2020年4月17日出願のPCT出願第PCT/US2020/028568号明細書;2019年11月15日出願のPCT出願第PCT/US2019/61685号明細書;2019年10月24日出願のPCT出願第PCT/US2019/57956号明細書;2019年10月29日出願のPCT公開第PCT/US2019/58678号明細書;および2021年6月3日公開の国際公開第2021/108717号に記載されている。これらの各々の内容はそれらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【0086】

例示的なアデニンおよびシトシン塩基エディタは、Rees & Liu, Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells, Nat. Rev. Genet. 2018;19(12):770-788;ならびに2018年10月30日に米国特許第10,113,163号明細書として発行した2018年3月15日公開の米国特許出願公開第2018/0073012号明細書;2019年1月1日に米国特許第10,167,457号明細書として発行した2017年5月4日公開の米国特許出願公開第2017/0121693号明細書;2017年4月27日公開の国際公開第2017/070633号;2015年6月18日公開の米国特許出願公開第2015/0166980号明細書;2017年12月12日発行の米国特許第9,840,699号明細書;および2018年9月18日発行の米国特許第10,077,453号明細書にもまた記載され、これらの各々の内容はそれらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【0087】

用語「Cas9」または「Cas9ヌクレアーゼ」は、Cas9ドメインまたはそのフラグメントを含むRNAによってガイドされるヌクレアーゼを言う(例として、Cas9の活性もしくは不活性なDNA切断ドメインおよび/またはCas9のgRNA結合ドメインを含むタンパク質)。本明細書に使用されるとき「Cas9ドメイン」は、Cas9の活性もしくは不活性な切断ドメインおよび/またはCas9のgRNA結合ドメインを含むタンパク質フラグメントである。「Cas9タンパク質」は全長Cas9タンパク質である。Cas9ヌクレアーゼは、場合によってはcasn1ヌクレアーゼまたはCRISPR(クラスター化され、規則的に間隔が空いている短い回文の反復(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat))関連ヌクレアーゼともまた言われる。CRISPRは、可動遺伝因子(ウイルス、転移エレメント、および接合性プラスミド)からの保護を提供する適応免疫システムである。CRISPRクラスターは、祖先可動因子に対して相補的な配列であるスペーサを含有し、侵入核酸を標的化する。CRISPRクラスターはCRISPR RNA(crRNA)へと転写およびプロセシングされる。II型CRISPRシステムにおいて、プレcrRNAの正しいプロセシングは、transでコードされた小さいRNA(tracrRNA)、内因性リボヌクレアーゼ3(rnc)、およびCas9ドメインを要求する。tracrRNAは、プレcrRNAの、リボヌクレアーゼ3によって補助されるプロセシングのためのガイドとして作用する。続いて、Cas9/crRNA/tracrRNAは、スペーサに対して相補的な直鎖または環状dsDNA標的をエンドヌクレアーゼ分解的に切断する。crRNAに対して相補的ではない標的鎖は、最初にエンドヌクレアーゼ分解的にカットされ、次いでエキソヌクレアーゼ分解的に3'-5'トリミングされる。天然では、DNA結合および切断は典型的にはタンパク質および両方のRNAを要求する。しかしながら、シングルガイドRNA(「sgRNA」、または単純に「gRNA」)が、crRNAおよびtracrRNA両方の側面を単一のRNA種に組み込むようにして操作され得る。例として、Jinek M., et al. Science 337:816-821 (2012)を見よ。この内容全体は

30

40

50

参照によって本明細書に組み込まれる。Cas9は、CRISPRリピート配列中の短いモチーフ(PAMまたはプロトスペーサ隣接モチーフ)を認識して、非自己に対して自己を区別することを助ける。Cas9ヌクレアーゼ配列および構造は当業者に知られている(例として、"Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*." Ferretti et al., J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najjar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 4658-4663(2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607(2011); および "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)を見よ。これらの各々の内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる)。Cas9オーソログは、*S. pyogenes* および *S. thermophilus* を包含するがこれらに限定されない種々の種において記載されている(例として、StCas9またはSt1Cas9)。追加の好適なCas9ヌクレアーゼおよび配列は、本開示に基づき当業者には明らかであろう。かかるCas9ヌクレアーゼおよび配列は、Chylinski, Rhun, and Charpentier, "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems" (2013) RNA Biology 10:5, 726-737において開示されている生物および遺伝子座からのCas9配列を包含する; この内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる。いくつかの態様において、Cas9ヌクレアーゼは、DNA切断ドメインを部分的に損なうかまたは不活性化する1以上の突然変異を含む。

【0088】

ヌクレアーゼが不活性化されたCas9ドメインは、交換可能に、「dCas9」タンパク質(ヌクレアーゼ「デッド」Cas9から)と言われ得る。不活性なDNA切断ドメインを有するCas9ドメイン(またはそのフラグメント)を生成するための方法は知られている(例として、Jinek et al., Science. 337:816-821(2012); Qi et al., "Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression" (2013) Cell. 28;152(5):1173-83を見よ。これらの各々の内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる)。例えば、Cas9のDNA切断ドメインは、2つのサブドメイン、HNHヌクレアーゼサブドメインおよびRuvC1サブドメインを包含することが知られている。HNHサブドメインはgRNAに対して相補的なストランドを切断し、RuvC1サブドメインは非相補的なストランドを切断する。これらのサブドメイン内の突然変異は、Cas9のヌクレアーゼ活性をサイレンシングし得る。例えば、突然変異D10AおよびH840Aは*S. pyogenes* Cas9のヌクレアーゼ活性を完全に不活性化する(Jinek et al., Science. 337:816-821(2012); Qi et al., Cell. 28;152(5):1173-83 (2013))。いくつかの態様において、Cas9のフラグメントを含むタンパク質が提供される。例えば、いくつかの態様において、タンパク質は、2つのCas9ドメイン:(1)Cas9のgRNA結合ドメイン; または(2)Cas9のDNA切断ドメインの一方を含む。いくつかの態様において、Cas9またはそのフラグメントを含むタンパク質は「Cas9バリエーション」と言われる。Cas9バリエーションは、Cas9またはそのフラグメントと相同性を共有する。例えば、Cas9バリエーションは、野生型Cas9(例として、配列番号74のSpCas9)と、少なくとも約70%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約96%同一、少なくとも約97%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、少なくとも約99.5%同一、少なくとも約99.8%同一、または少なくとも約99.9%同一である。いくつかの態様において、Cas9バリエーションは、野生型Cas9(例として、配列番号74のSpCas9)と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、

10

20

30

40

50

30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、またはより多くのアミノ酸変化を有し得る。いくつかの態様において、Cas9バリエーションは、フラグメントが野生型Cas9(例として、配列番号74のSpCas9)の対応するフラグメントと少なくとも約70%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約96%同一、少なくとも約97%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、少なくとも約99.5%同一、または少なくとも約99.9%同一であるようなCas9のフラグメント(例として、gRNA結合ドメインまたはDNA切断ドメイン)を含む。いくつかの態様において、フラグメントは、対応する野生型Cas9(例として、配列番号74のSpCas9)のアミノ酸長さの少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%同一、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%である。

10

20

30

40

50

【0089】

本明細書に使用されるとき、用語「nCAs9」または「Cas9ニックアーゼ」は、標的カッ ト部位のストランドの一方のみを切断またはニックし、それによって、二本鎖切断を 作出するよりもむしろ二本鎖DNA分子にニックを導入するCas9またはそのバリエーションを 言う。これは、Cas9の2つのエンドヌクレアーゼ活性の一方を不活性化する野生型Cas9 の適当な突然変異を導入することによって達成され得る。一方のCas9エンドヌクレアー ゼ活性を不活性化するが他方は無傷で残すいずれかの好適な突然変異が企図される。たと えば、野生型*S. pyogenes* Cas9アミノ酸配列におけるD10AもしくはH840A突然変異 または野生型*S. aureus* Cas9アミノ酸配列におけるD10A突然変異の一方が、nCAs9 を形成するために使用され得る。

【0090】

用語「cDNA」はRNA鋳型からコピーされたDNAのストランドを言う。cDNAはRNA 鋳型に対して相補的である。

【0091】

CRISPRは、原核生物に侵入したウイルスによる先行する感染のスニペットを表す細菌 および古細菌におけるDNA配列(すなわちCRISPRクラスター)のファミリーである。DN Aのスニペットは、類似のウイルスによる続いた攻撃からのDNAを検出および破壊する ために原核細胞によって使用され、多様なCRISPR関連タンパク質(Cas9およびそのホモ ログを包含する)およびCRISPR関連RNAと併せて、原核免疫防御システムを有効に組成 する。天然では、CRISPRクラスターはCRISPR RNA(crRNA)へと転写およびプロセシ ングされる。ある特定の型のCRISPRシステム(例としてII型CRISPRシステム)において は、プレcrRNAの正しいプロセシングは、トランスでコードされる小さいRNA(tracrR NA)、内因性リボヌクレアーゼ3(rnc)、およびCas9タンパク質を要求する。tracrRNA は、プレcrRNAの、リボヌクレアーゼ3によって補助されるプロセシングのためのガイ ドとして作用する。続いて、Cas9/crRNA/tracrRNAが、RNAに対して相補的な直鎖 または環状dsDNA標的をエンドヌクレアーゼ分解的に切断する。具体的には、crRNAに 対して相補的でない標的鎖が最初にエンドヌクレアーゼ分解的にカットされ、次いでエキ ソヌクレアーゼ分解的に3'-5'トリミングされる。天然では、DNA結合および切断は典型 的にはタンパク質および両方のRNAを要求する。しかしながら、シングルガイドRNA(「 sgRNA」または単純に「gRNA」)が、crRNAおよびtracrRNA両方の側面を単一のRN A種のガイドRNAに組み込むようにして操作され得る。例として、Jinek M., Chylins ki K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:81 6-821(2012)を見よ。この内容全体は参照によってここに組み込まれる。Cas9は、 CRISPRリピート配列中の短いモチーフ(PAMまたはプロトスペーサ隣接モチーフ)を認 識して、非自己に対して自己を区別することを助ける。CRISPR生物学、ならびにCas9 ヌクレアーゼ配列および構造は、当該技術分野で知られている(例として、"Complete

genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*."Ferretti et al., J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeau x C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663(2001);"CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III."Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607(2011);および"A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity."Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)を見よ。これらの各々の内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる)。Cas9オーソログは、*S. pyogenes*および*S. thermophilus*を包含するがこれらに限定されない種々の種において記載されている。追加の好適なCas9ヌクレアーゼおよび配列は、本開示に基づき当業者には明らかであろう。かかるCas9ヌクレアーゼおよび配列は、Chylinski, Rhun, and Charpentier,"The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems"(2013) RNA Biology 10:5, 726-737(この内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる)において開示されている生物および遺伝子座からのCas9配列を包含する。

10

20

【0092】

用語「デアミナーゼ」または「デアミナーゼドメイン」は、脱アミノ化反応を触媒するタンパク質または酵素を言う。いくつかの態様において、デアミナーゼはアデノシン(またはアデニン)デアミナーゼであり、これはアデニンまたはアデノシンの加水分解的脱アミノ化を触媒する。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、デオキシリボ核酸(DNA)上のアデニンまたはアデノシンからイノシンへの加水分解的脱アミノ化を触媒する。他の態様において、デアミナーゼはシチジン(またはシトシン)デアミナーゼであり、これはシチジンからウラシルへの加水分解的脱アミノ化を触媒する。

【0093】

本明細書に記載されるデアミナーゼは、細菌などのいずれかの生物からであり得る。いくつかの態様において、デアミナーゼまたはデアミナーゼドメインは、ある生物からの天然に存在するデアミナーゼのバリエーションである。いくつかの態様において、デアミナーゼまたはデアミナーゼドメインは天然に存在しない。例えば、いくつかの態様において、デアミナーゼまたはデアミナーゼドメインは、天然に存在するデアミナーゼと、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一である。

30

【0094】

本明細書に使用されるとき、用語「DNA結合タンパク質」または「DNA結合タンパク質ドメイン」は、特定の標的DNAヌクレオチド配列(例としてゲノムの遺伝子座)に局在および結合するいずれかのタンパク質を言う。この用語は、タンパク質と結び付いた1以上の核酸分子(またはそのある部分もしくは領域)に対して相補的である特定の標的ヌクレオチド配列(例としてDNA配列)に局在するようにタンパク質を導くかまたは別様にプログラムする1以上の核酸分子(すなわち、これは、例えばCasシステムのケースではガイドRNAを包含する)と結び付く(例として複合体を形成する)RNAプログラマブルタンパク質を包摂する。例示的なRNAプログラマブルタンパク質は、CRISPR-Cas9タンパク質、ならびに天然に存在するかまたは天然に存在しないか(例として操作もしくは改変されたか)にかかわらず、Cas9同等物、ホモログ、オーソログ、またはパラログであり、CRISPRシステムのいずれかの型(例としてII、V、VI型)からのCas9同等物を包含し、Cpf1(V型CRISPR-Casシステム)(今はCas12aとして知られている)、C2c1(V型CRISPR-C

40

50

asシステム)、C2c2(VI型CRISPR-Casシステム)、C2c3(V型CRISPR-Casシステム)、dCas9、GeoCas9、CjCas9、Nme2Cas9、SaCas9、SaKKH-Cas9、SauriCas9、Cas12b、Cas12d、Cas12d、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13d、Cas14、アルゴノート、およびnCas9を包含し得る。さらなるCas同等物は、Makarova et al., "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector," Science 2016; 353(6299)に記載されている。この内容は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0095】

本明細書に使用されるとき、用語「DNA編集効率」は、編集される意図される塩基対の数または割合を言う。例えば、塩基エディタが、(例として細胞内または細胞集団内の)それが標的化することを意図される塩基対の10%を編集する場合には、次いで塩基エディタは、10%の効率であると記載され得る。編集効率のいくつかの側面は、大きい数またはパーセンテージの挿入または欠失(すなわちインデル)を生成することなしに、DNA内の特定のヌクレオチドの改変(例として脱アミノ化)を包摂する。5%未満のインデル(総標的ヌクレオチド基質にわたって測定される)を生成しながらの編集は、高い編集効率であるということが一般的に認められている。20%よりも多くのインデルの生成は、一般的には不良なまたは低い編集効率として認められる。インデル形成は、配列決定リードのハイスループットスクリーニングを包含する当該技術分野で知られている技術によって測定され得る。

【0096】

本明細書に使用されるとき、用語「オフターゲット編集頻度」は、編集される意図されない塩基対、例としてDNA塩基対の数または割合を言う。オンターゲットおよびオフターゲット編集頻度は、ハイスループット配列決定リードを包含する当該技術分野で知られている技術にさらに鑑みて、本明細書に記載される方法およびアッセイによって測定され得る。本明細書に使用されるときハイスループット配列決定には、問題の標的配列またはオフターゲット配列のすぐ上流または下流の核酸(例としてDNA)領域に対して相補性を有する核酸プライマー(例としてDNAプライマー)のハイブリダイゼーションが関わる。DNA標的配列およびCas9非依存的なオフターゲット配列は、本明細書において開示される方法においては先験的に既知であるため、問題の標的配列およびCas9非依存的なオフターゲット配列の上流または下流の領域に対して十分な相補性を有する核酸プライマーが、PhusionU PCRキット(Life Technologies)、Phusion HS IIキット(Life Technologies)、およびIllumina MiSeqキットなどの当該技術分野で知られている技術を使用して設計され得る。オフターゲットDNA編集の数は、配列決定リードのハイスループットスクリーニング、EndoV-Seq、GUIDE-Seq、CIRCLE-Seq、およびCas-OFFinderを包含する当該技術分野で知られている技術によって測定され得る。Cas9依存的なオフターゲット部位の多くは、問題の標的部位に対して高い配列同一性を有するため、Cas9依存的なオフターゲット部位の上流または下流の領域に対して十分な相補性を有する核酸プライマーが、同様に、当該技術分野で知られている技術およびキットを使用して設計され得る。これらのキットは、中間産物としてアンプリコンを産生するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅を利用する。標的およびオフターゲット配列は、プロトスペーサおよびPAMをさらに含むゲノム遺伝子座を含み得る。従って、本明細書に使用されるとき、用語「アンプリコン」は、ゲノム遺伝子座、プロトスペーサ、およびPAMの集合体を構成する核酸分子を言い得る。本明細書において使用されるハイスループット配列決定技術は、Sanger配列決定およびIlluminaに基づく次世代ゲノム配列決定(NGS)をさらに包含し得る。

【0097】

本明細書に使用されるとき、用語「オンターゲット編集」は、たとえば本明細書に記載される塩基エディタを使用して、標的配列上のヌクレオチド(例としてアデニン)への意図される改変(例として脱アミノ化)の導入を言う。本明細書に使用されるとき、用語「オフターゲットDNA編集」は、古典的塩基エディタ結合ウィンドウ(すなわち、1つのプロト

スパーサ位置から別のものまで。典型的には2～8ヌクレオチドの長さ)外の配列上のヌクレオチド(例としてアデニン)への意図されない改変(例として脱アミノ化)の導入を言う。オフターゲットDNA編集は、標的配列に対するgRNA配列の弱いまたは非特異的な結合からもたらされ得る。本明細書において使用される用語「バースタンダー編集」は、標的塩基に近い(近接する)核酸塩基における同義のオフターゲット点突然変異を言い、意図される突然変異(例として、スプライスアクセプター部位の意図される破壊、未成熟終止コドンの組み込み、または突然変異コドンの復帰)のアウトカムを変化させない。バースタンダー編集は、異なる翻訳されるタンパク質をもたらさない転写物の該当するコドンにおける非サイレント突然変異を包摂し得る。

【0098】

本明細書に使用されるとき塩基エディタの「純度」および「産物純度」という用語は、意図される標的変換が生起する(例として、標的A、かつ標的AのみがGに変換される)編集された配列決定リード(標的核酸塩基が異なる塩基に変換されたリード)の平均、パーセンテージを言う。Komor et al., Sci Adv 3 (2017)を見よ。

【0099】

本明細書に使用されるとき、用語「上流」および「下流」は、5'から3'方向の向きである(一本鎖か二本鎖かにかかわらず)核酸分子上に位置付けられた少なくとも2つの要素の直線的な位置を定める相対性の用語である。特に、第1の要素が第2の要素の5'であるどこかに位置するところでは、第1の要素は核酸分子上において第2の要素の上流にある。例えば、SNPがニック部位の5'側にある場合に、SNPはCas9によって誘導されるニック部位の上流にある。逆に、第1の要素が第2の要素の3'であるどこかに位置するところでは、第1の要素は核酸分子上において第2の要素の下流にある。例えば、SNPがニック部位の3'側にある場合には、SNPはCas9によって誘導されるニック部位の下流にある。核酸分子はDNA(二本鎖または一本鎖)、RNA(二本鎖または一本鎖)、またはDNAおよびRNAのハイブリッドであり得る。分析は一本鎖核酸分子および二本鎖分子について同じである。上流および下流という用語は、二本鎖分子のどのストランドが考えられているかを選択することを必要とするということを例外として、核酸分子の単一のストランドのみを参照しているからである。多くの場合に、少なくとも2つの要素の位置相対性を決定するために使用され得る二本鎖DNAのストランドは、「センス」または「コード」鎖である。遺伝学において、「センス」鎖は、5'から3'に伸び、3'から5'に伸びるDNAのアンチセンス鎖または鋳型鎖に対して相補的である二本鎖DNA内の断片である。それゆえに、例として、SNP核酸塩基がセンス鎖またはコード鎖上のプロモータの3'側にある場合には、SNP核酸塩基はゲノムDNA(これは二本鎖である)上のプロモータ配列の「下流」である。

【0100】

本明細書に使用されるとき、用語「有効量」は、所望の生物学的応答を誘発するために充分である生物学的に活性な薬剤の量を言う。例えば、いくつかの態様において、塩基エディタの有効量は、標的部位ヌクレオチド配列、例としてゲノムを編集するために充分であるエディタの量を言い得る。いくつかの態様において、本明細書に記載される塩基エディタの、例として、ニッカーゼCas9ドメインを含む塩基エディタおよびガイドRNAの有効量は、塩基エディタによって特異的に結合および編集される標的部位の編集を誘導するために充分である塩基エディタの量を言い得る。当業者によって了解されるであろうとおり、薬剤、例として塩基エディタ、ヌクレアーゼ、ハイブリッドタンパク質、タンパク質二量体、タンパク質(またはタンパク質二量体)およびポリヌクレオチドの複合体、またはポリヌクレオチドの有効量は様々であり得、例えば、所望の生物学的応答、例として、編集されるべき特定のアレル、ゲノム、または標的部位、標的化されようとする細胞または組織、および使用されようとする薬剤のような、種々の因子に依存する。

【0101】

用語「機能的同等物」は、第1のバイオ分子と機能は同等だが必ずしも構造は同等ではない第2のバイオ分子を言う。例えば、「Cas9同等物」は、Cas9と同じまたは実質的に

10

20

30

40

50

同じ機能を有するが必ずしも同じアミノ酸配列を有さないタンパク質を言う。本開示の文脈において、本明細書は、全体を通して「タンパク質Xまたはその機能的な同等物」を参照する。この文脈において、タンパク質Xの「機能的な同等物」は、同等な機能を持つタンパク質Xのいずれかのホモログ、パラログ、フラグメント、天然に存在する、操作された、循環置換の、突然変異した、または合成のバージョンを包摂する。

【0102】

本明細書に使用されるとき、用語「融合タンパク質」は、少なくとも2つの異なるタンパク質からのタンパク質ドメインを含むハイブリッドポリペプチドを言う。1つのタンパク質は、融合タンパク質のアミノ末端(N末端)部分にまたはカルボキシ末端(C末端)タンパク質に位置付けられ、それゆえに夫々「アミノ末端融合タンパク質」または「カルボキシ末端融合タンパク質」を形成し得る。タンパク質は、異なるドメイン、例えば、核酸結合ドメイン(例として、標的部位に対するタンパク質の結合を導くCas9のgRNA結合ドメイン)および核酸編集タンパク質の核酸切断ドメインまたは触媒ドメインを含み得る。別の例は、アデノシンデアミナーゼに融合されたCas9またはその同等物を包含する。本明細書に記載されるタンパク質のいずれかは、当該技術分野で知られているいずれかの方法によって産生され得る。例えば、本明細書に記載されるタンパク質は、組換えタンパク質発現および精製を介して産生され得る。これはペプチドリinkerを含む融合タンパク質に特に適している。組換えタンパク質発現および精製のための方法は十分に知られており、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012))によって記載されるものを包含する。これらの内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0103】

用語「ガイド核酸」または「napDNAbpをプログラムする核酸分子」または同等に「ガイド配列」は、napDNAbpタンパク質と結び付き、タンパク質と結び付いた1以上の核酸分子(またはそのある部分または領域)に対して相補的である特定の標的ヌクレオチド配列(例としてゲノムの遺伝子座)に局在するように導くかまたはプログラムし、それによってnapDNAbpタンパク質が特定の標的部位においてヌクレオチド配列に結合することを引き起こす1以上の核酸分子を言う。非限定的な例は、CRISPR-Casゲノム編集システムのCasタンパク質のガイドRNAである。化学的には、ガイド核酸は、全てのRNA、全てのDNA、またはRNAおよびDNAのキメラであり得る。ガイド核酸はヌクレオチドアナログをもまた包含し得る。ガイド核酸は転写産物として発現され得るかまたは合成され得る。

【0104】

本明細書に使用されるとき「ガイドRNA」または「gRNA」は内因性の細菌crRNAおよびtracrRNAの合成融合体を言い、これは標的DNAに対するCas9ヌクレアーゼの標的化特異性と骨格および／または結合能力と両方を提供する。この合成融合体は天然には存在せず、普通にsgRNAともまた言われる。しかしながら、ガイドRNAという用語は、天然に存在するかまたは天然に存在しないか(例として操作されたかもしくは組換えか)にかかわらず、Cas9同等物、ホモログ、オーソログ、またはパラログと結び付き、Cas9同等物を特定の標的ヌクレオチド配列に局在するように別様にプログラムする同等のガイド核酸分子をもまた包摂する。Cas9同等物は、CRISPRシステムのいずれかの型(例としてII、V、VI型)からの他のnapDNAbpを包含し、Cpf1(V型CRISPR-Casシステム)、C2c1(V型CRISPR-Casシステム)、C2c2(VI型CRISPR-Casシステム)、およびC2c3(V型CRISPR-Casシステム)を包含し得る。さらなるCas同等物は、Makarova et al., "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector," Science 2016; 353(6299)に記載されている。この内容は参照によって本明細書に組み込まれる。ガイドRNAの例示的な配列および構造は本明細書において提供される。加えて、適当なガイドRNA配列を設計するための方法が本明細書において提供される。

【0105】

ガイドRNAは、ほとんどは普通にはCRISPR-Cas9のCasタンパク質に関連し、Cas9と結び付き、ガイドRNAのプロトスペーサ配列に対して相補性を包含するDNA分子上の特定の配列へとCas9タンパク質を導く特定の型のガイド核酸である。機能的には、ガイドRNAはCas9と結び付き、ガイドRNAのプロトスペーサ配列に対して相補的な配列を包含するDNA分子上の特定の配列へとCas9タンパク質を導く(またはプログラムする)。

【0106】

本明細書に使用されるとき「スペーサ配列」は、標的(DNA)配列のPAM鎖のプロトスペーサと同じ配列(チミン塩基の代わりにウリジン塩基を例外とする)を有し、標的配列の標的鎖(または非PAM鎖)に対して相補的であるガイドRNAの配列(長さが大凡20nt)である。

10

【0107】

本明細書に使用されるとき「標的配列」は、PAM鎖上のプロトスペーサ配列に対して相補性を有する標的DNA配列上の大凡20ヌクレオチドを言う。標的配列は、ガイドRNAのスペーサ配列にアニーリングするかまたはそれによって標的化される配列である。ガイドRNAのスペーサ配列およびプロトスペーサは同じ配列を有する(スペーサ配列はRNAであり、プロトスペーサはDNAであるということを例外とする)。

【0108】

本明細書に使用されるとき、用語「ガイドRNAコア」、「ガイドRNA骨格配列」、および「バックボーン配列」は、Cas9結合を担うgRNA内の配列を言い、それは、Cas9を標的DNAへとガイドするために使用される20bpスペーサ配列を包含しない。

20

【0109】

本明細書に使用されるとき、用語「宿主細胞」は、本明細書に記載されるとおり、塩基エディタ、ガイドRNA、および／またはそれらの組み合わせをコードするベクターの宿主となり、それを複製し得る細胞を言う。いくつかの態様において、宿主細胞はヒト細胞などの哺乳動物細胞である。本明細書においては、本明細書において提供される1以上のベクター、たとえば本明細書において提供される1以上のウイルス(例としてrAAV)ベクターによって、宿主細胞、たとえばヒト細胞、例として対象におけるヒト細胞を形質導入およびトランスフェクションする方法が提供される。

【0110】

30

本明細書に記載される塩基エディタ、ガイドRNA、およびまたはそれらの組み合わせのいずれかは、安定にまたは一過的にどちらかで、いずれかの好適なやり方で宿主細胞に導入され得るということは了解されるべきである。いくつかの態様において、塩基エディタは宿主細胞へトランスフェクションされ得る。いくつかの態様において、宿主細胞は、塩基エディタをコードする核酸構築物によって形質導入またはトランスフェクションされ得る。例えば、宿主細胞は、塩基エディタをコードする核酸または翻訳された塩基エディタによって(例として、塩基エディタをコードするウイルス粒子によって)形質導入され得る。追加の例として、宿主細胞は、塩基エディタをコードする核酸(例としてプラスミド)または翻訳された塩基エディタによってトランスフェクションされ得る。かかる形質導入またはトランスフェクションは、安定または一過的であり得る。いくつかの態様において、塩基エディタを発現または塩基エディタを含有する宿主細胞は、例えば塩基エディタがCas9(例としてnCas9)ドメインを含むときに、1以上のgRNA分子によって形質導入またはトランスフェクションされ得る。いくつかの態様において、塩基エディタを発現するプラスミドは、エレクトロポレーション、一過的トランスフェクション(例として、Lipofectamine 3000(登録商標)などによるリポフェクション)、安定なゲノムインテグレーション(例としてpiggybac)、ウイルス形質導入、または当業者に知られている他の方法を通して宿主細胞に導入され得る。

40

【0111】

ウイルス粒子のパッケージングのための宿主細胞もまた本明細書において提供される。ベクターがウイルスベクターである態様において、好適な宿主細胞は、ウイルスベクター

50

によって感染され得る、それを複製し得る、および新しい宿主細胞に感染し得るウイルス粒子にそれをパッケージし得る細胞である。それがウイルスベクターの遺伝子の発現、ウイルスゲノムの複製、および／またはウイルス粒子の生成を支持する場合には、細胞はウイルスベクターの宿主となり得る。いくつかの態様において、宿主細胞は、真核細胞、例えば酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞である。宿主細胞の型は当然のことながら採用されるベクターに依存し、好適な宿主細胞／ベクター組み合わせは当業者には容易く明らかであろう。

【0112】

「インティン」は、タンパク質スプライシングとして知られているプロセスにおいて、それ自体を切り出し、残りの部分(エクステイン)をペプチド結合によって繋ぎ合わせることができるタンパク質の断片である。インティンは「タンパク質イントロン」ともまた言われる。インティンがそれ自体を切り出し、タンパク質の残りの部分を繋ぎ合わせるプロセスは、本明細書においては「タンパク質スプライシング」または「インティンによって媒介されるタンパク質スプライシング」と呼称される。いくつかの態様において、前駆体タンパク質(インティンによって媒介されるタンパク質スプライシングに先行するインティン含有タンパク質)のインティンは、2つの遺伝子から来る。かかるインティンは、本明細書においては分割インティンと言われる。例えば、シアノバクテリアにおいては、DNAポリメラーゼIIIの触媒サブユニットαであるDnaEが、2つの別個の遺伝子dnaE-nおよびdnaE-cによってコードされる。dnaE-n遺伝子によってコードされるインティンは本明細書においては「インティン-N」と言われる。dnaE-c遺伝子によってコードされるインティンは本明細書においては「インティン-C」と言われる。開示される核酸分子の種々の態様において、核酸分子はインティンを含有しない。開示される核酸分子の種々の態様において、核酸分子はトランススプライシングインティンを含有しない。

【0113】

他のインティンシステムもまた使用され得る。例えば、dnaEインティンに基づく合成インティン、Cfa-NおよびCfa-Cインティンペアが記載されている(例として、参照によって本明細書に組み込まれるStevens et al., J Am Chem Soc. 2016 Feb 24;138(7):2162-5)。別の例として、Nostoc punctiforme(Npu)インティンペア、dnaEインティンに基づく合成インティンが記載されている(参照によって本明細書に組み込まれるZettler, J., Schutz, V. & Mootz, H. D., The naturally split Npu DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction. FEBS letters 583, 909-914 (2009)を見よ)。いくつかの態様において、インティンは、gp41-8インティンなどの高速スプライシングgp41インティンである。Carvajal-Vallejos et al, Journal of Biological Chemistry 287(34): 28686-28696 (2012)およびPinto, Thornton & Wang, Nat.Comm. (2020) 11:1529の参照がなされる。これらの各々は参照によって本明細書に組み込まれる。本開示に従って使用され得るインティンペアの非限定的な例は次を包含する:Cfa DnaEインティン、Npu DnaEインティン、gp41-8インティン、Ssp GyrBインティン、Ssp DnaXインティン、Ter DnaE3インティン、Ter ThyXインティン、Rma DnaBインティン、およびCne Prp8インティン(例として、参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第8,394,604号明細書に記載されるとおり)。

【0114】

本明細書に使用されるとき、用語「リンカー」は、2つの分子またはドメイン、例としてdCas9およびデアミナーゼを連結する化学基または分子を言う。典型的には、リンカーは、2つの基、分子、または他のドメインの間に位置するかまたはそれらによってフラッキングされ、共有結合を介して各1つに接続され、それゆえに2つを接続する。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸または複数のアミノ酸(例としてペプチドまたはタンパク質)である。いくつかの態様において、リンカーは、有機分子、基、ポリマー、または化学的なドメインである。化学基は、ジスルフィド、ヒドラゾン、およびアジドドメインを包含するが、これらに限定されない。いくつかの態様において、リンカーは、

長さが5～100アミノ酸、例えば、長さが5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、30～35、35～40、40～45、45～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～150、または150～200アミノ酸である。より長いまたはより短いリンカーもまた企図される。いくつかの態様において、リンカーは、長さが32アミノ酸であるXTENリンカーである。いくつかの態様において、リンカーは32アミノ酸リンカーである。他の態様において、リンカーは、30、31、33、または34アミノ酸リンカーである。

【0115】

本明細書に使用されるとき、用語「突然変異」は、別の残基による、ある配列、例として核酸もしくはアミノ酸配列内の残基の置換；配列内の1以上の残基の欠失もしくは挿入；または修正されるべき対象におけるゲノムの配列内の残基の置換を言う。突然変異は、典型的には、本明細書においては、元々の残基、その後に配列内の残基の位置および新たに置換された残基のアイデンティティを同定することによって記載される。本明細書において提供されるアミノ酸置換(突然変異)を作るための種々の方法は当該技術分野において十分に知られており、例えばGreen and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012))によって提供される。突然変異は、1塩基多型、微細重複領域、インデル、および逆位などの種々のカテゴリーを包含し得、決して限定されることを意味されない。突然変異は、タンパク質活性を低減または消失させる突然変異である「機能喪失」突然変異を包含し得る。ほとんどの機能喪失突然変異は劣性である。ヘテロ接合体では、第2の染色体コピーは完全に機能的なタンパク質をコードする遺伝子の突然変異していないバージョンを運搬し、その存在が突然変異の効果を補償するからである。機能喪失突然変異が優性であるいくつかの例外がある。1つの例はハプロ不全であり、ここでは、生物は、ヘテロ接合体が患うタンパク質活性のおよそ50%の低減を忍容することができない。これは、フィブリリンと呼ばれる結合組織タンパク質の遺伝子の突然変異からもたらされるマルファン症候群を包含するヒトにおける少数の遺伝子疾患の説明である。突然変異は「機能獲得」突然変異をもまた包摂する。これは、正常な状態ではさもない存在しないタンパク質または細胞に対する異常な活性を付与するものである。多くの機能獲得突然変異はコード領域よりもむしろ調節配列上にあり、よって、いくつかの帰結を有し得る。それらの性質ゆえに、機能獲得突然変異は通常は優性である。多くの機能喪失突然変異は劣性、常染色体劣性などである。本開示の塩基編集方法が修正することを狙うUSH2A突然変異の多くは、常染色体劣性である。

【0116】

「核酸プログラマブルDNA結合タンパク質」を意味する用語「napDNAbp」は、タンパク質に結び付いた1以上の核酸分子(またはそのある部分または領域)に対して相補的である特定の標的ヌクレオチド配列(例としてゲノムの遺伝子座)に局在するようにタンパク質を導くかまたは別様にプログラムし、それによってタンパク質が特定の標的部位においてヌクレオチド配列に結合することを引き起こす1以上の核酸分子(すなわち、これは広義には「napDNAbpをプログラムする核酸分子」と言われ得、例えばCasシステムのケースではガイドRNAを包含する)と結び付き(例として複合体を形成し)得るいずれかのタンパク質を言う。この用語napDNAbpは、CRISPR-Cas9タンパク質、ならびに天然に存在するかまたは天然に存在しないか(例として操作もしくは改変されたか)にかかわらず、Cas9同等物、ホモログ、オーソログ、またはパラログを包摂し、CRISPRシステムのいずれかの型(例としてII、V、VI型)からのCas9同等物を包含し、Cpf1(V型CRISPR-Casシステム)、C2c1(V型CRISPR-Casシステム)、C2c2(VI型CRISPR-Casシステム)、C2c3(V型CRISPR-Casシステム)、dCas9、GeoCas9、CjCas9、Cas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13d、Cas14、アルゴノート、およびnCas9を包含し得る。さらなるCas同等物は、Makarova et al., "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector," *Science* 2016; 353 (6299)に記載されている。この内容は参照によっ

て本明細書に組み込まれる。しかしながら、本発明に関して使用され得る核酸プログラマブルDNA結合タンパク質(napDNAbp)は、CRISPR-Casシステムに限定されない。本発明は、*Natronobacterium gregoryi*からのアルゴノートタンパク質(NgAgo)などのいずれかのかかるプログラマブルタンパク質を包摂し、これもまたDNAによってガイドされるゲノム編集に使用され得る。NgAgo-ガイドDNAシステムはPAM配列もガイドRNA分子も要求しない。これは、ゲノム編集が、単純に、ジェネリックなNgAgoタンパク質の発現および合成オリゴヌクレオチドの導入によって、いずれかのゲノム配列に対して実施され得るということを意味する。参照によって本明細書に組み込まれるGao et al., DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argon aute. *Nature Biotechnology* 2016; 34(7):768-73を見よ。

10

【0117】

いくつかの態様において、napDNAbpはRNAプログラマブルヌクレアーゼであり、RNAとの複合体であるときに、ヌクレアーゼ:RNA複合体と言われ得る。典型的には、結合したRNA(単数または複数)はガイドRNA(gRNA)と言われる。gRNAは、2以上のRNAの複合体としてまたは単一のRNA分子として存在し得る。単一のRNA分子として存在するgRNAはシングルガイドRNA(sgRNA)と言われ得るが、「gRNA」は、単一の分子としてまたは2以上の分子の複合体としてどちらかで存在するガイドRNAを言うために交換可能に使用される。典型的には、単一のRNA種として存在するgRNAは2つのドメインを含む:(1)標的核酸と相同性を共有する(かつ例として標的に対するCas9(または同等物)複合体の結合を導く)ドメイン;および(2)Cas9タンパク質と結合するドメイン。いくつかの態様において、ドメイン(2)は、tracrRNAとして知られている配列に対応し、ステムループ構造を含む。例えば、いくつかの態様において、ドメイン(2)は、その内容全体が参照によって本明細書に組み込まれるJinek et al., *Science* 337:816-821(2012)の図1Eに示されるとおりtracrRNAと相同である。gRNAの他の例(例としてドメイン2を包含するもの)は、「mRNA-Sensing Switchable gRNAs」と題する米国特許第9,340,799号明細書および2013年9月6日出願の国際公開第2015/035136号として公開され「Delivery System For Functional Nucleases」と題するPCT出願第PCT/US2014/054247に見出され得る。各々の内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる。いくつかの態様において、gRNAは2以上のドメイン(1)および(2)を含み、「延長されたgRNA」と言われ得る。例えば、本明細書に記載されるとおり、延長されたgRNAは例えば2以上のCas9タンパク質に結合し、2以上の別物の領域において標的核酸に結合するであろう。gRNAは標的部位を相補するヌクレオチド配列を含み、これは、該標的部位に対するヌクレアーゼ/RNA複合体の結合を媒介し、ヌクレアーゼ:RNA複合体の配列特異性を提供する。いくつかの態様において、RNAプログラマブルヌクレアーゼは、(CRISPR関連システム)Cas9エンドヌクレアーゼ、例えば*Streptococcus pyogenes*からのCas9(Csn1)である(例として、"Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*."Ferretti J.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:4658-4663(2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III."Deltcheva E. et al., *Nature* 471:602-607(2011);および"A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity."Jinek M. et al., *Science* 337:816-821(2012)を見よ。これらの各々の内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる。

20

30

40

【0118】

napDNAbpヌクレアーゼ(例としてCas9)は標的DNA切断部位に対するRNA:DNAハイブリダイゼーションを使用し、これらのタンパク質は原則としてガイドRNAによって指定されるいずれかの配列へと標的化されることができる。(例としてゲノムを改変するための)部位特異的切断のためにCas9などのnapDNAbpヌクレアーゼを使用する方法は、当該技術分野において知られている(例として、Cong, L. et al. *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science* 339, 819-823 (2013); Mali, P. et al. *RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science*

50

339, 823-826 (2013); Hwang, W.Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* 31, 227-229 (2013); Jinek, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* 2, e00471 (2013); Dicarlo, J.E. et al., Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acid Res.* (2013); Jiang, W. et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology* 31, 233-239 (2013)を見よ。これらの各々の内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる)。

【0119】

用語「ニッカーゼ」は、両方のストランドよりもむしろ標的DNAの一方のストランドのみをカットする単一のヌクレアーゼ活性のみを有するnapDNAbp(例としてCas9)を言う。それゆえに、ニッカーゼ型napDNAbpは二本鎖切断を残さない。例示的なニッカーゼはSpCas9およびSaCas9ニッカーゼを包含する。例示的なニッカーゼは、配列番号107のアミノ酸配列に対して少なくとも99%または100%の同一性を有する配列を含む。

【0120】

核局在シグナルまたは配列(NLS)は、核輸送による細胞核内への搬入のためにタンパク質をタグ付けするか、選定するか、または別様にマークするアミノ酸配列である。典型的には、このシグナルは、タンパク質表面上に露出した正荷電のリジンまたはアルギニンの1以上の短い配列からなる。異なる核局在タンパク質は、同じNLSを共有し得る。NLSは、タンパク質を核の外へと標的化する核外搬出シグナル(NES)とは反対の機能を有する。それゆえに、単一の核局在シグナルは、それが結び付けられている実体を細胞の核へと導き得る。かかる配列は、いずれかのサイズおよび組成、例えば、25よりも多くの、25、15、12、10、8、7、6、5、または4アミノ酸であり得るが、好ましくは、核局在シグナル(NLS)として機能することが知られている少なくとも4~8アミノ酸配列を含むであろう。

【0121】

本明細書に使用されるとき、用語「核酸分子」は、RNAならびに一本鎖および／または二本鎖DNAを言う。核酸分子は、例えばゲノム、転写物、mRNA、tRNA、rRNA、siRNA、snRNA、プラスミド、コスミド、染色体、染色分体、または他の天然に存在する核酸分子の文脈において、天然に存在し得る。他方で、核酸分子は、天然に存在しない分子、例として、組換えDNAもしくはRNA、人工染色体、操作されたゲノムもしくはそのフラグメント、または合成DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッドであり得るか、あるいは天然に存在しないヌクレオチドまたはヌクレオシドを包含し得る。

【0122】

さらにその上、用語「核酸」、「DNA」、「RNA」、および／または類似の用語は、核酸アナログ、例として、ホスホジエステルバックボーン以外を有するアナログを包含する。核酸は、天然の供給源から精製され、組換え発現システムを使用して産生され、任意に精製、化学合成などされ得る。適当なところでは、例として、化学合成分子のケースでは、核酸は、化学修飾された塩基または糖を有するアナログなどのヌクレオシドアナログ、およびバックボーン修飾を含み得る。核酸配列は、別様に指示されない限り、5'から3'方向で提示される。いくつかの態様において、核酸は、天然ヌクレオシド(例としてアデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、およびデオキシシチジン);ヌクレオシドアナログ(例として2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、C5-ブロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、イノシンデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、および2-チオシチジン);化学修飾塩基;生物学的修飾塩基(例として、メチル化塩基、たとえば2'-O-メチル化塩基);インターカレーション塩基;修飾糖(例として2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオ

キシリボース、アラビノース、およびヘキソース);ならびに／または修飾リン酸基(例として、ホスホロチオアートおよび5'-N-ホスホロアミダイト連結部)であるか、またはそれを含む。

【0123】

明細書に使用されるとき、用語「ファージによって支援される連続的進化(PACE)」は、ウイルスベクターとしてファージを採用する連続的進化を言う。PACEテクノロジーの一般的な概念は、例えば、2010年3月11日に国際公開第2010/028347号として公開の2009年9月8日出願のPCT出願第PCT/US2009/056194号明細書;2012年6月28日に国際公開第2012/088381号として公開の2011年12月22日出願のPCT出願第PCT/US2011/066747号明細書;2015年5月5日発行の米国出願特許第9,023,594号明細書、2015年9月11日に国際公開第2015/134121号として公開の2015年1月20日出願のPCT出願第PCT/US2015/012022号明細書、および2016年10月20日に国際公開第2016/168631号として公開の2016年4月15日出願のPCT出願第PCT/US2016/027795号明細書に記載されている。これらの各々の内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0124】

用語「プロモータ」は当該技術分野において認識されており、細胞の転写機構によって認識され、下流遺伝子の転写を開始することができる配列を有する核酸分子を言う。プロモータは、プロモータが所与の細胞の文脈において常に活性であるということの意味する恒常的に活性であり得るか、またはプロモータが特定の条件の存在下でのみ活性であるということの意味する条件的に活性であり得る。例えば、条件的プロモータは、プロモータ上の調節エレメントと結び付いたタンパク質を基本転写機構に接続する特異的タンパク質の存在下においてのみまたは阻害分子の非存在下においてのみ活性であり得る。条件的に活性なプロモータのサブクラスは、活性のために低分子「誘導因子」の存在を要求する誘導性プロモータである。誘導性プロモータの例は、アラビノース誘導性プロモータ、Tet-onプロモータ、およびタモキシフェン誘導性プロモータを包含するが、これらに限定されない。種々の恒常的、条件的、および誘導性プロモータが当業者に知られており、当業者は、本発明を行うことに有用な種々のかかるプロモータを確かめることができるであろう。これはこの点において限定されない。種々の態様において、本開示は、塩基エディタ(またはその1以上の個々の構成要素)をコードする核酸配列の発現を駆動するための適当なプロモータを有するベクターを提供する。

【0125】

本明細書に使用されるとき、用語「プロトスペーサ」は、PAM(プロトスペーサ隣接モチーフ)配列に隣接するDNA上の配列(例として大凡20bpの配列)を言い、これはガイドRNAのスペーサ配列と同じ配列を共有し、これは非PAM鎖の標的配列に対して相補的である。ガイドRNAのスペーサ配列は、非PAM鎖上に位置付けられる標的配列にアニーリングする。Cas9が機能するためには、それは、Cas9遺伝子の細菌種に依存して様々である特異的なプロトスペーサ隣接モチーフ(PAM)をもまた要求する。S. pyogenesに由来する最も普通に使用されるCas9ヌクレアーゼはNGGのPAM配列を認識し、これは、非標的鎖上のゲノムDNA上のプロトスペーサ配列の直接的に下流に見出される。当業者は、当分野の従来技術の文献が、場合によっては、それを「スペーサ」と言うよりもむしろ、ガイドRNAそれ自体の上の大凡20ntの標的的特異的ガイド配列として「プロトスペーサ」を言うということ(ならびにプロトスペーサ(DNA)およびスペーサ(RNA)は同じ配列を有するということ)を了解するであろう。それゆえに、本明細書に使用されるとき、用語「プロトスペーサ」は、用語「スペーサ」と交換可能に使用され得る。「プロトスペーサ」または「スペーサ」どちらかの出現を取り巻く記載の文脈は、用語がgRNAまたはDNA配列の参照であるかどうかについて読者に情報を与えることを助けるであろう。最新技術はこれらのやり方の各々において両方の用語を使用するため、これらの用語の両方の使用法は許容される。

【0126】

本明細書に使用されるとき、用語「プロトスペーサ隣接配列」または「PAM」は、Cas9ヌクレアーゼの重要な標的化構成要素であるおよそ2～6塩基対のDNA配列を言う。典型的には、PAM配列はどちらかのストランド上にあり、Cas9カット部位の5'から3'方向において下流である。古典的PAM配列(すなわち、*Streptococcus pyogenes*のCas9ヌクレアーゼまたはSpCas9に関連するPAM配列)は5'-NGG-3'であり、ここで、「N」は、2つのグアニン(「G」)核酸塩基によって後続されるいずれかの核酸塩基である。異なるPAM配列は、異なる生物からの異なるCas9ヌクレアーゼまたは同等のタンパク質に関連し得る。加えて、いずれかの所与のCas9ヌクレアーゼ、例としてSpCas9は、ヌクレアーゼが代替的なPAM配列を認識するようにしてヌクレアーゼのPAM特異性を変調させるように改変され得る。

10

【0127】

例えば、古典的SpCas9アミノ酸配列が配列番号74であることを参照すると、PAM配列は、次を包含する1以上の突然変異を導入することによって改変され得る:(a)NGANまたはNGNGへPAM特異性を変調させる、D1135V、R1335Q、およびT1337R「VRQRバリエント」、(b)NGAGへPAM特異性を変調させる、D1135E、R1335Q、およびT1337R「EQRバリエント」、ならびに(c)NGCGへPAM特異性を変調させる、D1135V、G1218R、R1335E、およびT1337R「VRERバリエント」。加えて、古典的SpCas9のD1135EバリエントはNGGを依然として認識するが、それは野生型SpCas9タンパク質と比較してより選択的である。

20

【0128】

異なる細菌種からのCas9酵素(すなわちCas9オーソログ)は様々なPAM特異性を有し得るということもまた了解されよう。例えば、*Staphylococcus aureus*からのCas9(SaCas9)はNGRRTまたはNGRRNを認識する。加えて、*Neisseria meningitis*からのCas9(NmeCas)はNNNGATTを認識する。*Staphylococcus auricularis*からのCas9(SauriCas9)はNNGGおよびNNNGGを認識する。*Streptococcus thermophilis*からのCas9(StCas9)はNNAGAAWを認識する。*Treponema denticola*からのCas9(TdCas)はNAAAACを認識する。これらは例であり、限定することを意味されない。非SpCas9が種々のPAM配列に結合し、これは、好適なSpCas9 PAM配列が所望の標的カット部位に存在しないときにそれらを有用にするということはさらに了解されるであろう。さらにその上、非SpCas9は、それらをSpCas9よりも有用にする他の特性を有し得る。例えば、*Staphylococcus aureus*からのCas9(SaCas9)はSpCas9よりも約1キロ塩基小さい。そのため、それはアデノ随伴ウイルス(AAV)にパッケージングされ得る。Shah et al., "Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity," RNA Biology, 10(5): 891-899のさらなる参照がなされ得る(これは参照によって本明細書に組み込まれる)。

30

【0129】

用語「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」は本明細書においては交換可能に使用され、ペプチド(アミド)結合によって一緒に連結されたアミノ酸残基のポリマーを言う。用語は、いずれかのサイズ、構造、または機能のタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドを言う。典型的には、タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは少なくとも3アミノ酸の長さであろう。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、個々のタンパク質またはタンパク質のコレクションを言い得る。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチド上のアミノ酸の1以上は、例えば、化学的実体、たとえば炭水化物基、ヒドロキシル基、リン酸基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基、コンジュゲーション、官能化、または他の修飾のためのリンカーなどの追加によって修飾され得る。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは単一の分子でもまたあり得るかまたは多分子複合体であり得る。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、天然に存在するタンパク質またはペプチドの単なるフラグメントであり得る。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、天然に存在する、組換え、もしくは合成、またはそれらのいずれかの組み合わせであり得る。本開示は、N末端メチオニン(M)残基なしの本明細書において

40

50

提供されるポリペプチド配列のいずれかを提供することが了解されるべきである。

【0130】

遺伝学において、「センス」鎖は、5'から3'に伸び、3'から5'に伸びるDNAのアンチセンス鎖または鋳型鎖に対して相補的である二本鎖DNA内の断片である。タンパク質をコードするDNA断片のケースでは、センス鎖は、mRNAと同じ配列を有するDNAのストランドである。これは、転写の間にはアンチセンス鎖をその鋳型として取り、最終的に(常にではないが典型的には)タンパク質への翻訳を経過する。それゆえに、アンチセンス鎖は後でタンパク質に翻訳されるRNAを担い、センス鎖はmRNAのものと同一に近い作りを所有する。dsDNAの各断片については、可能性として、どの方向に読むかに依存して、センスおよびアンチセンスの2つのセットがあろうということに留意されたい(センスおよびアンチセンスは見方に対して相対的であるため)。究極的には、dsDNAの1つの断片のどのストランドがセンスまたはアンチセンスと言われるかを規定するのは、遺伝子産物またはmRNAである。

10

【0131】

「分割Cas9タンパク質」または「分割Cas9」は、2つの別個のヌクレオチド配列によってコードされるN末端部分(これは本明細書においては交換可能にN末端半分と言われる)およびC末端部分(これは本明細書においては交換可能にC末端半分と言われる)として提供されるCas9タンパク質を言う。Cas9タンパク質のN末端部分およびC末端部分に対応するポリペプチドは、完全なCas9タンパク質を形成するために組み合わせられ(繋ぎ合わせられ)得る。Cas9タンパク質は、無秩序なリンカーによって連結されたバイローブ構造からなることが知られている(例として、参照によって本明細書に組み込まれるNishimasu et al., Cell, Volume 156, Issue 5, pp. 935-949, 2014に記載されるとおり)。いくつかの態様において、「分割」は2つのローブの間において生起し、各々が1つのローブを含有するCas9タンパク質の2つの部分を生成する。

20

【0132】

本明細書に使用されるとき、用語「対象」は、個々の生物、例えば個々の哺乳動物を言う。いくつかの態様において、対象はヒトである。いくつかの態様において、対象は非ヒト哺乳動物である。いくつかの態様において、対象は非ヒト霊長目の動物である。いくつかの態様において、対象はげっ歯類である。いくつかの態様において、対象はヒツジ、ヤギ、ウシ、ネコ、またはイヌである。いくつかの態様において、対象は脊椎動物、両生類、爬虫類、魚、昆虫、ハエ、または線虫である。いくつかの態様において、対象は研究動物である。いくつかの態様において、対象は遺伝子操作されており、例として遺伝子操作された非ヒト対象である。対象はどちらかの性別およびいずれかの発達段階であり得る。いくつかの態様において、対象は家畜である。いくつかの態様において、対象は植物である。

30

【0133】

用語「標的部位」は、本明細書において開示される塩基エディタ(BE)によって編集される核酸分子内の配列を言う。一本鎖の文脈における用語「標的部位」はまた、ガイドRNAのスペーサ配列にアニーリングまたは結合する「標的鎖」を言い得る。ある特定の態様において、標的部位は、PAM鎖(または非標的鎖)および標的鎖上のプロトスペーサ(すなわち、ガイドRNAのスペーサ配列と同じヌクレオチド配列を有する標的部位のストランド)を包含し、プロトスペーサおよびスペーサに対して同様に相補的であり、ガイドRNAのスペーサにアニーリングし、それによって標的部位を標的化するようにCas9塩基エディタを標的化またはプログラムする、二本鎖DNAの断片を言い得る。

40

【0134】

「転写ターミネータ」は、転写が停止することを引き起こす核酸配列である。転写ターミネータは一方方向性または双方方向性であり得る。それは、RNAポリメラーゼによるRNA転写物の特異的終結に関わるDNA配列から構成される。転写ターミネータ配列は、上流プロモータによる下流核酸配列の転写活性化を防止する。転写ターミネータは、望ましい発現レベルを達成するためにまたはある特定の配列の転写を回避するためにin vivoで必

50

要であり得る。転写ターミネータは、それが連結されている配列の転写を終結させることができるときには、ヌクレオチド配列「に作動可能に連結されている」と考えられる。

【0135】

真核システムにおいて、ターミネータ領域は、ポリアデニル化部位を露出するようにして新たな転写物の部位特異的切断を許可する特定のDNA配列を含み得る。これは、転写物の3'端に約200個のA残基のストレッチ(ポリA)を追加するように、特化した内因性ポリメラーゼに合図する。このポリA尾部(シグナル)によって修飾されたRNA分子は、より安定であるように見え、より効率的に翻訳される。それゆえに、真核生物が関わるいくつかの態様において、ターミネータはRNAの切断のためのシグナルを含み得る。いくつかの態様において、ターミネータシグナルはメッセージのポリアデニル化を促進する。ターミネータおよび／またはポリアデニル化部位エレメントは、アウトプット核酸レベルを増強するためのおよび／または核酸間のリードスルーを最小化するために作用し得る。

10

【0136】

いくつかの態様において、転写ターミネータは、転写されるときに発現を増強する三次構造を作出する配列、転写後応答エレメントを含有する。いくつかの態様において、転写後応答エレメントは、ウッドチャック肝炎ウイルス(WHVV)に由来し、すなわちWPRESである。いくつかの態様において、ターミネータは、参照によって本明細書に組み込まれるChoi, J. H., et al. (2014), Mol. Brain 7: 17において最初に報告されたWPRESのガンマサブユニットまたはW3を含有する。WPRESはアルファおよびベータサブユニットをもまた有する。典型的には、転写後応答エレメントは転写ターミネータの5'に挿入される。ある特定の態様において、WPRESはトランケーションされたWPRES配列である。ある特定の態様において、WPRESは全長WPRESである。

20

【0137】

本開示に従う使用のためのターミネータは、本明細書に記載されるかまたは当業者に知られているいずれかの転写ターミネータを包含する。ターミネータの例は、限定なしに、例えばウシ成長ホルモントーミネータなどの遺伝子の終結配列、ならびに例えばSV40ターミネータおよびbGHターミネータなどのウイルス終結配列を包含する。いくつかの態様において、終結シグナルは、配列トランケーションからもたらされるものなどの、転写または翻訳され得ない配列であり得る。

【0138】

本明細書に使用されるとき「トランジション」は、プリン核酸塩基の相互交換(A⇌G)またはピリミジン核酸塩基の相互交換(C⇌T)を言う。このクラスの相互交換には類似の形状の核酸塩基が関わる。本明細書において開示される組成物および方法は、標的DNA分子上に1以上のトランジションを誘導することができる。本明細書において開示される組成物および方法は、同じ標的DNA分子におけるトランジションおよびトランスバージョン両方を誘導することもまたできる。これらの変化には、A⇌G、G⇌A、C⇌T、またはT⇌Cが関わる。Watson-Crick対形成した核酸塩基を有する二本鎖DNAの文脈において、トランジションは以下の塩基対交換を言う:A:T⇌G:C、G:G⇌A:T、C:G⇌T:A、またはT:A⇌C:G。本明細書において開示される組成物および方法は、標的DNA分子上に1以上のトランジションを誘導することができる。本明細書において開示される組成物および方法は、同じ標的DNA分子におけるトランジションおよびトランスバージョン両方、ならびに欠失および挿入を包含する他のヌクレオチド変化を誘導することもまたできる。

30

40

【0139】

本明細書に使用されるとき「トランスバージョン」は、プリン核酸塩基のピリミジン核酸塩基へのまたは逆の相互交換を言い、それゆえに、非類似の形状を有する核酸塩基の相互交換が関わる。これらの変化には、T⇌A、T⇌G、C⇌G、C⇌A、A⇌T、A⇌C、G⇌C、およびG⇌Tが関わる。Watson-Crick対形成した核酸塩基を有する二本鎖DNAの文脈において、トランスバージョンは以下の塩基対交換を言う:T:A⇌A:T、T:A⇌G:C、C:G⇌G:C、C:G⇌A:T、A:T⇌T:A、A:T⇌C:G、G:C⇌C:G、およびG:C⇌T:A。

【0140】

50

用語「処置」、「処置する」、および「処置すること」は、本明細書に記載されるとおり、疾患もしくは障害またはその1以上の症状を逆転させること、緩和すること、その発症を遅延させること、またはその進行を阻害することを狙った臨床的介入を言う。本明細書に使用されるとき、用語「処置」、「処置する」、および「処置すること」は、本明細書に記載されるとおり、疾患もしくは障害またはその1以上の症状を逆転させること、緩和すること、その発症を遅延させること、またはその進行を阻害することを狙った臨床的介入を言う。いくつかの態様において、処置は、1以上の症状が発生した後におよび／または疾患が診断された後に投与され得る。他の態様において、処置は、症状の非存在下において、例として、症状の発症を防止もしくは遅延させるかまたは疾患の発症もしくは進行を阻害するために投与され得る。例えば、処置は、症状の発症に先行して(例として、症状の既往に照らしておよび／または遺伝学的もしくは他の素因因子に照らして)、有素因個体へ投与され得る。処置は、症状が解消した後にもまた、例えばそれらの再発を防止または遅延させるために継続され得る。

10

【0141】

本明細書に使用されるとき、用語「上流」および「下流」は、5'から3'方向の向きである(一本鎖か二本鎖かにかかわらず)核酸分子上に位置付けられた少なくとも2つの要素の直線的な位置を定める相対性の用語である。特に、第1の要素が第2の要素の5'であるどこかに位置するところでは、第1の要素は核酸分子上において第2の要素の上流にある。例えば、SNPがニック部位の5'側にある場合に、SNPはCas9によって誘導されるニック部位の上流にある。逆に、第1の要素が第2の要素の3'であるどこかに位置するところでは、第1の要素は核酸分子上において第2の要素の下流にある。例えば、SNPがニック部位の3'側にある場合には、SNPはCas9によって誘導されるニック部位の下流にある。核酸分子はDNA(二本鎖または一本鎖)、RNA(二本鎖または一本鎖)、またはDNAおよびRNAのハイブリッドであり得る。分析は一本鎖核酸分子および二本鎖分子について同じである。上流および下流という用語は、二本鎖分子のどのストランドが考えられているかを選択することを必要とするということを例外として、核酸分子の単一のストランドのみを参照しているからである。多くの場合に、少なくとも2つの要素の位置相対性を決定するために使用され得る二本鎖DNAのストランドは、「センス」または「コード」鎖である。遺伝学において、「センス」鎖は、5'から3'に伸び、3'から5'に伸びるDNAのアンチセンス鎖または鋳型鎖に対して相補的である二本鎖DNA内の断片である。それゆえに、例として、SNP核酸塩基がセンスまたはコード鎖上のプロモータの3'側にある場合には、SNP核酸塩基はゲノムDNA(これは二本鎖である)上においてプロモータ配列の「下流」にある。

20

30

【0142】

本明細書に使用されるとき、用語「バリエーション」は、その少なくとも1つの機能的な、すなわち結合、相互作用、もしくは酵素能力および／または治療特性を保持する、天然に存在するものから逸れる特性を有するタンパク質を言う。「バリエーション」は、野生型タンパク質と少なくとも約70%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約96%同一、少なくとも約97%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、少なくとも約99.5%同一、または少なくとも約99.9%同一である。例えば、Cas9のバリエーションは、野生型Cas9アミノ酸配列と比較してアミノ酸残基における1以上の変化を有するCas9を含み得る。別の例として、デアミナーゼのバリエーションは、例えばデアミナーゼの祖先配列再構築後に、野生型デアミナーゼアミノ酸配列と比較してアミノ酸残基に1以上の変化を有するデアミナーゼを含み得る。これらの変化は、異なるアミノ酸残基の置換を包含する化学修飾、トランケーション、共有結合的な追加(例としてタグの)、およびいずれかの他の突然変異を包含する。用語は、参照配列の、かつ参照配列と同じまたは実質的に同じ機能的活性(単数または複数)を呈示する循環置換、変異体、トランケーション、またはドメインをもまた包摂する。この用語は野生型タンパク質のフラグメントをもまた包摂する。

40

【0143】

50

特性が保持されるレベルまたは度合いは、野生型タンパク質に対して相対的に低減され得るが、典型的には同じまたは類似の類である。一般的に、バリエーションは総体的に非常に類似であり、多くの領域において、本明細書に記載されるタンパク質のアミノ酸配列と同一である。当業者は、機能的な能力または特性の全てまたは少なくともいくらかを維持するバリエーションをいかに作り使用するかを了解するであろう。バリエーションタンパク質は、例えば、本明細書において提供される野生型タンパク質またはいずれかのタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み得るか、または代替的にはそれからなり得る。

【0144】

クエリアミノ酸配列と少なくとも、例えば95%「同一」のアミノ酸配列を有するポリペプチドによって、対象ポリペプチド配列がクエリアミノ酸配列の各100アミノ酸当たり最高で5アミノ酸の変調を包含し得るということを例外として、対象ポリペプチドのアミノ酸配列はクエリ配列と同一であるということが意図される。換言すると、クエリアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、対象配列上のアミノ酸残基の最高で5%が挿入、欠失、または別のアミノ酸によって置換され得る。参照配列のこれらの変調は、参照アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置においてまたはそれらの末端位置の間のどこかにおいて、参照配列上の残基間に個々にまたは参照配列内に1以上の一続きの群で散在して、生じし得る。

【0145】

現実問題としては、いずれかの特定のポリペプチドが、例えば融合タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるかどうかは、知られているコンピュータプログラムを使用して従来決定され得る。グローバル配列アラインメントとも言われるクエリ配列(本発明の配列)と対象配列との間の最も良い総体的なマッチを決定するための好ましい方法は、Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990))のアルゴリズムに基づいてFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定され得る。配列アラインメントにおいて、クエリ配列および対象配列は、両方ともヌクレオチド配列または両方ともアミノ酸配列どちらかである。該グローバル配列アラインメントの結果は、パーセント同一性として表現される。FASTDBアミノ酸アラインメントにおいて使用される好ましいパラメータは、Matrix=PAM 0、k-tuple=2、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=20、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Window Size=sequence length、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty=0.05、Window Size=500または対象のアミノ酸配列の長さのどちらか短い方である。

【0146】

対象配列が、内部の欠失ゆえにではなくNまたはC末端欠失を原因としてクエリ配列よりも短い場合には、結果に手動の補正がなされなければならない。これは、FASTDBプログラムが、グローバルな同一性パーセントを計算するときに対象配列のNおよびC末端トランケーションを考慮に入れないからである。クエリ配列に対して相対的にNおよびC末端においてトランケーションされた対象配列では、クエリ配列の総塩基のパーセントとして、対応する対象残基とマッチ／アラインメントしない対象配列のNおよびC末端であるクエリ配列の残基の数を計算することによって、パーセント同一性が補正される。残基がマッチ／アラインメントするかどうかは、FASTDB配列アラインメントの結果によって決定される。次いで、このパーセンテージが、指定されたパラメータを使用して上のFASTDBプログラムによって計算されたパーセント同一性から差し引かれて、最終的なパーセント同一性スコアに到達する。この最終的なパーセント同一性スコアが、本発明の目的のために使用されるものである。クエリ配列とマッチ／アラインメントしない対象配列のNおよびC末端の残基のみが、同一性パーセントスコアを手動で調整する目的で考えられる。つまり、対象配列の最も遠いNおよびC末端残基の外側のクエリ残基位置のみである。

【0147】

本明細書に使用されるとき、用語「ベクター」は、問題の遺伝子をコードするように改変され得、かつ宿主細胞に入り宿主細胞内で複製し、次いでベクターの複製された形態を別の宿主細胞に移入することができる核酸を言う。例示的な好適なベクターは、ウイルスベクター、たとえばAAVベクター、またはバクテリオファージおよび繊維状ファージ、ならびに接合性プラスミドを包含する。追加の好適なベクターは、本開示に基づいて当業者には明らかであろう。

【0148】

本明細書に使用されるとき、用語「野生型」は当業者によって理解される専門用語であり、それが天然に存在するとおりの、変異体またはバリエーション形態とは区別される生物、株、遺伝子、または特性の典型的な形態を意味する。

【0149】

napDNABpドメイン

本明細書に記載される塩基エディタは、核酸プログラマブルDNA結合(napDNABp)ドメインを含む。各napDNABpは少なくとも1つのガイド核酸(例としてガイドRNA)と結び付き、これが、ガイド核酸またはそのある部分(例として、ガイドRNAのプロトスペーサ)に対して相補的であるDNAストランド(すなわち標的鎖)を含むDNA配列にnapDNABpを局在させる。換言すると、ガイド核酸は、標的鎖の相補的な配列に局在および結合するようにnapDNABpドメインを「プログラム」する。相補的な配列に対するnapDNABpドメインの結合は、塩基エディタの核酸塩基修飾ドメイン(すなわちアデノシンデアミナーゼドメイン)が標的鎖上の標的塩基にアクセスし酵素的に脱アミノ化することを可能にする。

【0150】

napDNABpはCRISPR(クラスター化され、規則的に間隔が空いている短い回文の反復(clustered regularly interspaced short palindromic repeat))関連ヌクレアーゼであり得る。上で概説されたとおり、CRISPRは、可動遺伝因子(ウイルス、転移エレメント、および接合性プラスミド)からの保護を提供する適応免疫システムである。CRISPRクラスターは、祖先可動因子に対して相補的な配列、スペーサを含有し、侵入核酸を標的化する。CRISPRクラスターはCRISPR RNA(crRNA)へと転写およびプロセッシングされる。II型CRISPRシステムにおいて、プレcrRNAの正しいプロセッシングは、トランスでコードされた小さいRNA(tracrRNA)、内因性リボヌクレアーゼ3(rnc)、およびCas9タンパク質を要求する。tracrRNAは、プレcrRNAの、リボヌクレアーゼ3によって補助されるプロセッシングのためのガイドとして作用する。続いて、Cas9/crRNA/tracrRNAは、スペーサに対して相補的な直鎖または環状dsDNA標的をエンドヌクレアーゼ分解的に切断する。crRNAに対して相補的ではない標的鎖は、最初にエンドヌクレアーゼ分解的にカットされ、次いでエキソヌクレアーゼ分解的に3'-5'トリミングされる。天然では、DNA結合および切断は典型的にはタンパク質および両方のRNAを要求する。しかしながら、シングルガイドRNA(「sgRNA」、または単純に「gRNA」)が、crRNAおよびtracrRNA両方の側面を単一のRNA種に組み込むようにして操作され得る。例としてJinek et al., Science 337:816-821(2012)を見よ。この内容全体は参照によってここに組み込まれる。

【0151】

開示されるアデノシンデアミナーゼに関して使用され得る種々のnapDNABpsの下に記載は、決して限定することを意味されない。塩基エディタは、古典的SpCas9、あるいはいずれかのオーソログCas9タンパク質、あるいはCas9のいずれかの天然に存在するバリエーション、変異体、または別様に操作されたバージョンを包含するいずれかのバリエーションCas9タンパク質を含み得る。これは知られているか、またはこれは指向的な進化的なもしくは別様に変異原性のプロセスを通して作られ得るかまたは進化し得る。種々の態様において、napDNABpはニッカーゼ活性を有する。すなわち、標的DNA配列の一方のストランドのみを切断する。他の態様において、napDNABpは不活性なヌクレアーゼを有し、例として「デッド」タンパク質である。使用され得る他のバリエーションCas9タンパク

10

20

30

40

50

質は、(例として、より容易な送達のために)古典的SpCas9よりも小さい分子量を有するかまたは改変もしくは再配列された一次アミノ酸配列(例として循環置換形態)を有するものである。本明細書に記載される塩基エディタは、Cas12a/Cpf1タンパク質を包含するCas9同等物をもまた含み得る。本明細書において使用されるnapDNAbp(例として、SpCas9、SaCas9、またはSaCas9バリエーションもしくはSpCas9バリエーション)は、それらのPAM特異性を変調／増強する種々の改変をもまた含有し得る。本開示は、本明細書において開示されるCas9タンパク質のいずれかに対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.9%の配列同一性を有するいずれかのCas9、Cas9バリエーション、またはCas9同等物を企図する。いくつかの態様において、napDNAbpドメインは野生型Cas9のニッカーゼバリエーションを含む。いくつかの態様において、napDNAbpドメインは、本明細書において開示されるCas9ニッカーゼのいずれかを含む。

10

【0152】

いくつかの態様において、napDNAbpは、たとえば標的配列内のおよび／または標的配列の相補物内の標的配列の場所における一方または両方の鎖の切断を導く。いくつかの態様において、napDNAbpは、標的配列の第1のまたは最後のヌクレオチドから約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500、またはより多くの塩基対内的一方または両方の鎖の切断を導く。例えば、*S. pyogenes*からのCas9のRuvC I触媒ドメイン上のアスパラギン酸からアラニンの置換(D10A)は、Cas9を、両方のストランドを切断するヌクレアーゼからニッカーゼに変換する(単一のストランドを切断する)。Cas9をニッカーゼにする突然変異の他の例は、限定なしに、古典的SpCas9配列、または他のCas9バリエーションもしくはCas9同等物上の同等のアミノ酸位置を参照して、H840A、N854A、およびN863Aを包含する。

20

【0153】

本明細書に使用されるとき、用語「Casタンパク質」は、天然から得られる全長Casタンパク質、天然に存在するCasタンパク質とは異なる配列を有する組換えCasタンパク質、または開示される方法に必要とされる不可欠の基本的機能、すなわち(i)標的DNAに対するCasタンパク質の核酸プログラマブルな結合の所有および(ii)一方のストランド上の標的DNA配列にニックングする能力の全てもしくは有意な量をなおも保持するCasタンパク質のいずれかのフラグメントを言う。本明細書において企図されるCasタンパク質は、CRISPR Cas9タンパク質、ならびに天然に存在するかまたは天然に存在しないか(例として操作されたかもしくは組換えか)にかかわらず、Cas9同等物、バリエーション(例として、Cas9ニッカーゼ(ncas9)またはヌクレアーゼ不活性Cas9(dCas9))ホモログ、オーソログ、またはパラログを包摂し、CRISPRシステムのいずれかの型(例としてII、V、VI型)からのCas9同等物を包含し、Cpf1(V型CRISPR-Casシステム)、C2c1(V型CRISPR-Casシステム)、C2c2(VI型CRISPR-Casシステム)、およびC2c3(V型CRISPR-Casシステム)を包含し得る。さらなるCas同等物は、Makarova et al., "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector," *Science* 2016; 353(6299)に記載されている。この内容は参照によって本明細書に組み込まれる。

30

40

【0154】

用語「Cas9」または「Cas9ドメイン」は、いずれかの生物からのいずれかの天然に存在するCas9、いずれかの天然に存在するCas9同等物またはその機能的フラグメント、いずれかの生物からのいずれかのCas9ホモログ、オーソログ、またはパラログ、および天然に存在するかまたは操作されたCas9のいずれかの変異体またはバリエーションを包摂する。用語Cas9は特に限定することを意味せず、「Cas9または同等物」と言われ得る。例示的なCas9タンパク質はさらに本明細書において記載され、および／または当該技術分野において記載され、参照によって本明細書に組み込まれる。本開示は、本開示の塩

50

基エディタに採用される具体的なnapDNAbpについて限定されない。

【0155】

本明細書に使用されるとき、用語「コンパクトなCas9タンパク質」、「コンパクトなnapDNAbp」、および「コンパクトなバリエーション[Casタンパク質の]」は、約1250アミノ酸未満のアミノ酸長さを有するCas9タンパク質またはバリエーションを言う。いくつかの態様において、コンパクトなCas9タンパク質またはコンパクトなnapDNAbpは、長さが、1250アミノ酸未満、1240アミノ酸未満、1230アミノ酸未満、1220アミノ酸未満、1210アミノ酸未満、1200アミノ酸未満、1190アミノ酸未満、1180アミノ酸未満、1170アミノ酸未満、1160アミノ酸未満、1150アミノ酸未満、1140アミノ酸未満、1130アミノ酸未満、1120アミノ酸未満、1110アミノ酸未満、1100アミノ酸未満、1050アミノ酸未満、1000アミノ酸未満、950アミノ酸未満、900アミノ酸未満、850アミノ酸未満、800アミノ酸未満、750アミノ酸未満、700アミノ酸未満、650アミノ酸未満、600アミノ酸未満、550アミノ酸未満、または500アミノ酸未満を含有する。これらの用語は、約3750ヌクレオチド未満の長さを有する核酸配列によってコードされるいずれかのCas9タンパク質またはバリエーションをもまた包摂する。本開示の塩基エディタは、コンパクトなnapDNAbpおよび／またはコンパクトなCas9タンパク質を含み得る。いくつかの態様において、コンパクトなCas9タンパク質はSpCas9よりも約350アミノ酸短い。いくつかの態様において、コンパクトなCas9タンパク質は長さが約1000アミノ酸である。いくつかの態様において、コンパクトなタンパク質は、*S. pyogenes* Cas9 (SpCas9)、Cpf1、CasX、CasY、C2c1、C2c2、C2c3、Cas12a、Cas12b、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13b、Cas13c、Cas13d、Cas14、Csn2、Cas3、またはCasΦのコンパクトなバリエーションである。「コンパクトなバリエーション」は、野生型Cas9タンパク質、たとえば野生型SpCas9またはCpf1に対して相対的に、1以上のランケーションまたは1以上の欠失を有するCas9タンパク質を言い得る。

【0156】

追加のCas9配列および構造は当業者に十分に知られており(例として、"Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*." Ferretti et al., J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663 (2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607 (2011); および "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821 (2012) を見よ。これらの各々の内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる)、下でもまた提供される。

【0157】

Cas9およびCas9同等物の例は以下のとおり提供される;しかしながら、これらの具体的な例は限定することを意味されない。本開示の塩基エディタは、いずれかの好適なCas9またはCas9同等物を包含するいずれかの好適なnapDNAbpを使用し得る。

【0158】

napDNAbpニッカーゼ

いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、ニッカーゼを含むnapDNAbpドメインを含み得る。いくつかの態様において、本明細書に記載される塩基エディタはCas9ニッカーゼを含む。「nCas9」の「Cas9ニッカーゼ」という用語は、二本鎖DNA分子標的に一本鎖切断を導入することができるCas9のバリエーションを言う。いくつかの態様において、Cas9ニッカーゼは、単一の機能するヌクレアーゼドメインのみを含む。野生

型Cas9(例として古典的SpCas9)は、2つの別個のヌクレアーゼドメイン、すなわちRuvCドメイン(これは非プロトスペーサDNA鎖を切断する)およびHNHドメイン(これはプロトスペーサDNA鎖を切断する)を含む。1つの態様において、Cas9ニッカーゼは、RuvCヌクレアーゼ活性を不活性化するRuvCドメイン上の突然変異を含む。例えば、アスパラギン酸(D)10、ヒスチジン(H)983、アスパラギン酸(D)986、またはグルタミン酸(E)762における突然変異は、RuvCヌクレアーゼドメインの機能喪失突然変異および機能的なCas9ニッカーゼの作出として報告されている(例として、Nishimasu et al., "Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA," Cell 156(5), 935-949。これは参照によって本明細書に組み込まれる)。それゆえに、RuvCドメイン上のニッカーゼ突然変異はD10X、H983X、D986X、またはE762Xを包含し得、ここで、Xは野生型アミノ酸以外のいずれかのアミノ酸である。ある特定の態様において、ニッカーゼは、D10A、H983Aの、もしくはD986A、もしくはE762A、またはそれらの組み合わせであり得る。

10

【0159】

いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは*S. pyogenes* Cas9ニッカーゼ(SpCas9n)を含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは、配列番号365または370と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の配列同一性であり、それを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは配列番号365のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは配列番号370のアミノ酸配列を含む。

20

【0160】

いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは*S. aureus* Cas9ニッカーゼ(SaCas9n)を含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは、配列番号438と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の配列同一性であり、それを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは配列番号438のアミノ酸配列を含む。

【0161】

30

種々の態様において、Cas9ニッカーゼはRuvCヌクレアーゼドメインに突然変異を有し得、以下のアミノ酸配列の1つ、またはそれに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するそのバリエーションを有し得る。

40

50

【表 A - 1】

説明	配列	配列番号
Cas9ニッカー ゼ	MDKKYSIGLXIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDD SFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV D10Xを有する Streptococcus pyogenes Q99ZW2 Cas 9、ここで、Xは いずれかの代 わりとなるアミ ノ酸である	配列番号361
	DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQT YNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRENLIQAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQED FYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW NFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYN ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDY FKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILE DIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSR KLINGIRDQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQ VSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKGIQTVKVVDDELVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQL QNEKLYLYLLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVHIVPQSFLKDDSID NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN LTKAERGGLSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV GTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF DSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFS KRVLADANLKVLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	10
Cas9ニッカー ゼ	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDD SFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV E762Xを有す るStreptococ cus pyogenes Q99ZW2 Ca s9、ここで、X はいずれかの 代わりとなるア ミノ酸である	配列番号362
	DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQT YNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRENLIQAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQED FYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW NFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYN ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDY FKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILE DIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSR KLINGIRDQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQ VSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKGIQTVKVVDDELVKVMGRHKPENI VIXMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQL	30

10

20

30

40

50

【表 A - 2】

説明	配列	配列番号
	QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYVDHIVPQSFLKDDSID NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN LTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV GTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF DSPTVAYSVLVVAKEKVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVILADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK YFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSTGLYETRIDLSQLGGD	
Cas9ニッカー ゼ H983Xを有す るStreptococ cus pyogenes Q99ZW2 Ca s9、ここで、X はいずれかの 代わりとなるア ミノ酸である	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDD SFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVCKLFIQLVQT YNQLFEENPINASGVDAKILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQED FYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPW NFEFVVDKGASASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYN ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDY FKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILE DIVLTLTLFEDREMIEERLKTIAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSR KLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQ VSGQGDLSHEHIANLAGSPAIIKGLQTVKVVDELVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQL QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYVDHIVPQSFLKDDSID NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN LTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV GTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF DSPTVAYSVLVVAKEKVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVILADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK YFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSTGLYETRIDLSQLGGD	配列番号363
Cas9ニッカー ゼ D986Xを有す るStreptococ cus pyogenes Q99ZW2 Ca	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDD SFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVCKLFIQLVQT YNQLFEENPINASGVDAKILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT	配列番号364

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【表 A - 4】

説明	配列	配列番号
	SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD	
Cas9ニッカー ゼ E762Aを有す るStreptococ cus pyogenes Q99ZW2 Ca s9	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDD SFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRILIY LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQT YNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQED FYPFLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW NFEVVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYN ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDY FKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILE DIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSR KLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQ VSGQGDLSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI VIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQL QNEKLYLYLLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVHIVPQSFLKDDSID NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDN LTKAERGGLSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNAV GTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEGEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKYYGGF DSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL EAKGYKEVKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号366
Cas9ニッカー ゼ H983Aを有す るStreptococ cus pyogenes Q99ZW2 Ca s9	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDD SFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRILIY LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQT YNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLF GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQED FYPFLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW NFEVVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYN ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDY FKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILE DIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSR KLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQ VSGQGDLSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI	配列番号367

10

20

30

40

50

【表 A - 5】

説明	配列	配列番号
	VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQL QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYVDHIVPQSFLKDDSID NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN LTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHAAHDAYLNAV GTALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF DSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFELNGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFLYLASHYEKLKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSTGLYETRIDLSQLGGD	
Cas9ニッカー ゼ D986Aを有す るStreptococ cus pyogenes Q99ZW2 Ca s9	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDD SFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRILIYALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQT YNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLF GNIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLNLLAQIGDQ YADLF LA AKNLS DAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQED FYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYN ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDY FKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILE DIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSR KLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIKQAQ VSGQGDLSHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVDELVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQL QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYVDHIVPQSFLKDDSID NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN LTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN DKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHAAAYLNAV GTALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF DSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFELNGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFLYLASHYEKLKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSTGLYETRIDLSQLGGD	配列番号 368
Cas9ニッカー ゼ D10Aを有する Staphylococ cus aureus(Sa	MGKRNILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGR RSKRGARRLKRHHRIQRVKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVK GLSQKLSSEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISR NSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKV QKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEML MGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYE	配列番号 438

10

20

30

40

50

【表 A - 6】

説明	配列	配列番号
Cas9)	KFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVSTSTGKPEFTNLK VYHDIKDITARKEIENAELLDDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQ EEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPK KVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIE LAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIK LHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNK VLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLA KGKGRIS KTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLRSYFRV NNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEALIIANADF IFKEWKKLDKAKVMENQMFEKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIK HIKDFDKYKYSHRVDKKNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNG YDKDNDKLKLINKSPEKLLMYHHDPTQYQKLKLIMEQYQDEKNPL YKYYEETGNLYTKYSKKNNGPVIKKIKYYGNKLNALHDITDDYPNSR NKVVKLKSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKENYYEVNSKCY EEAKKLKISNQAEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVM IDITYREYLENMNDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKK HPQIIKK	

10

【0162】

改変されたPAM特異性を有するコンパクトなCas9バリエーション

20

いくつかの態様において、napDNABpは、*C. jejuni*、*S. auricularis*、*N. meningitidis*、または*S. aureus*に由来するCas9などのコンパクトなCasタンパク質を含む。例示的な態様において、napDNABpは、CjCas9ニッカーゼ、SauriCas9ニッカーゼ、Nme2Cas9ニッカーゼ、SaCas9ニッカーゼ、またはSaKKH-Cas9ニッカーゼを含む。いくつかの態様において、napDNABpはNme2Cas9タンパク質でもニッカーゼでもない。いくつかの態様において、napDNABpはSaCas9タンパク質でもニッカーゼでもない。

【0163】

本開示の塩基エディタは、改変されたPAM特異性を有するCas9バリエーションをもまた含み得る。本開示のいくつかの側面は、その3'端に古典的PAM(5'-NGG-3'、ここでNはA、C、G、またはTである)を含まない標的配列に対する活性を見せるCas9タンパク質を提供する。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NGG-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NNG-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NNA-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NNC-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NNT-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NGT-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NGA-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NGC-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NAA-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NAC-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。いくつかの態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NAT-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。依然として他の態様において、Cas9タンパク質は、その3'端に5'-NAG-3' PAM配列を含む標的配列に対する活性を見せる。

30

40

【0164】

いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、NGNに対応するPAMを有する

50

SpCas9-NGを含むnapDNAbpドメインを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、SpCas9-NGと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を有するnapDNAbpドメインを含む。SpCas9-NGの配列が下で例解される:

```
MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGET
AEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHER
HPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAALAHMIKFRGHFLIEGD
LNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPG
EKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYAD
LFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPK
YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRT
FDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFA
WMTRKSEETITPWNFEVVDKGGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYEFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFD
SVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEER
LPTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVK
VMGRHKPENIVIEAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQL
QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTNRSDK
NRGKSDNPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK
RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKV
REINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKA
TAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMP
QVNIVKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVA
KVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFEL
ENGRKRMLASARFLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQH
KHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAP
RAFKYFDTTIDRKVYRSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号477)
```

【0165】

いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、*S. aureus* Cas9ニッカーゼKHまたはSaCas9-KKHを含むnapDNAbpドメインを含み、これはNNNRRRTまたはNNGRRTに対応するPAMを有する。このCas9バリエーションは、配列番号377として提出される野生型SaCas9に対して相対的に、アミノ酸置換D10A、E782K、N968K、およびR1015H(「KKH」)を含有する。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、SaCas9-KKHと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を有するnapDNAbpドメインを含む。SaCas9(およびSaKKH-Cas9)の長さは1053アミノ酸である。SaCas9-KKH(ニッカーゼ)の配列が下で例解される:

【0166】

S. aureus Cas9ニッカーゼKKH(SaCas9-KKH)

```
MGKRNYYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKANVENNEGRRSKRGARRLK
RRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKR
RGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFK
TSDYVKEAKQLLKVKQAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEW
YEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEYEFQIIEN
VFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENA
ELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILD
ELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAI
IKKYGLPNDIIEELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEK
IKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENS
```

KKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAAGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKD
FINRNLVDTRYATRGLMNLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG
YKHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQEYKEIF
ITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDK
DNDKLLKLINKSPEKLLMYHHDQPQTYQKLKLIMEQYGDENPLYKYEEETGNLYTK
YSKKDNGPVIKKIKYYGKNLNAHLDDYPNSRNKVVKLSLKPYPYRFDVYLDNGVYK
FVTVKNLVDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLLKISNQAEFIASFYKNDLIKINGELRYVI
GVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPHIIKTIASTQSIKKYSTDILGNLYE
VKSCKHPQIIKKG(配列番号478)

【0167】

10

いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、*Staphylococcus Auricularis*に由来するCas9タンパク質(*S. auri* Cas9または*SauriCas9*)を含むnapDNAbpを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは*SauriCas9*ニッカーゼを含む。*SauriCas9*はNNGGおよびNNNGG PAMを認識する。*SauriCas9*(ニッカーゼ)の配列は配列番号479として提出される。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、配列番号479と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を有するnapDNAbpドメインを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、配列番号479を含むnapDNAbpを含む。このタンパク質の長さは1061アミノ酸である。

MQENQQKQNYILGLAIGITSVGYGLIDSKTREVIDAGVRLFPEADSENNNSNRRSKRGA
RRLKRRRIHRLNRVKDLLADYQMIDLNNVPKSTDPYTIRVKGLREPLTKEEFAIAL
HIAKRRGLHNISVSMGDEEQDNELSTKQQLQKNAQQLQDKYVCELQLERLTNINKV
RGEKNRKFTEDFVKEVKQLCETQRQYHNIDDQFIQQYIDLVSSTRREYFEGPGNGSPY
GWDGDLKWKYEKLMGRCTYFPEELRSVKYAYSADLFNALNDLNNLVVTRDDNPKL
EYKEKYHIIENVFKQKKNP TLKQIAKEIGVQDYDIRGYRITKSGKPQFTSFKLYHDLK
NIFEQAKYLEDVEMLDEIAKILTIYQDEISIKKALDQLPELLTESEKSQIAQLTGYTGT
HRLSLKCIHIVIDELWESPENQMEIFTRLNLKPKKVEMSEIDSIPTTLVDEFILSPVVK
RAFIQSIKVINAVINRFGPLPEDIIEELAREKNSKDRRKFINKLQKQNEATRKKIEQLLA
KYGNTNAKYMIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLSNPTHYVDHIIIPRSVSFDNS
LNNKVLVKQSENSKKGNRTPYQYLSNESKISYNQFKQHILNLSKAKDRISKKKRDM
LLEERDINKFEVQKEFINRNLVDTRYATRELSNLLKTYFSTHDYAVKVKTINGGFTN
HLRKVWDFKKHRNHGYKHAEDALVIANADFLFKTHKALRRTDKILEQPGLEVNDT
TVKVDTEEKYQELFETPKQVKNIKQFRDFKYSHRVDKKPNRQLINDTLYSTREIDGE
TYVVQTLKDLYAKDNEKVKKLFTERPQKILMYQHDPKTFEKLMTILNQYAEAKNPL
AAYYEDKGEYVTKYAKKGNPAIHKIKYIDKKLGSYLDVSNKYPETQNKLVKLSLKS
FRFDIYKCEQGYKMVSIGYLDVLKKDNYYYIPKDKYEAQKKKIKESDLFVGSFYNN
DLIMYEDELFRVIGVNSDINNLLVELNMVDITYKDFCEVNNVTGEKRIKKTIGKRVVLI
EKYTTDILGNLYKTPLPKKPQLIFKRGEL(配列番号479)

20

30

【0168】

いくつかの態様において、napDNAbpは、*SauriCas9*-KKHバリエーションまたは*SauriCas9*-KKHニッカーゼバリエーションを含む。*SauriCas9*-KKHは、対応する三重KKH突然変異:Q788K、Y973K、およびR1020Hを含有する。Hu et al. (2020) PLoS Biol. 18(3): e3000686を見よ。これは参照によって本明細書に組み込まれる。

40

【0169】

いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、*S. pyogenes* Cas9ニッカーゼKKHまたはSpCas9-KKHを含むnapDNAbpドメインを含み、これはNNNRRTに対応するPAMを有する。

【0170】

いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、*Neisseria meningitidis*(*Nme*または*Nme2*)に由来するコンパクトなCas9オースログを含むnapDNAbpを含む。い

50

くつかの態様において、napDNABpはNme2Cas9を含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタはNme2Cas9ニッカーゼを含む。Nme2Cas9は、参照によって本明細書に組み込まれるEdraki et al., Molecular Cell 73, 714-726に記載されているとおり、単純なジヌクレオチドPAM、NNNNCC、またはN₄CC(ここで、Nはいずれかのヌクレオチドである)を認識する。Nme2Cas9の配列は配列番号5として提出される。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、配列番号5と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を有するnapDNABpドメインを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは配列番号5を含むnapDNABpを含む。このタンパク質の長さは1082アミノ酸である。

MAAFKPNPINYILGLAIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRFERAEVPKTGDSL
AMARRLARSVRRLLTRRRRAHRLRLRARRLLKREGVLQAADFDEGLIKSLPNTPWQLR
AAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQ
TGDFRTPAELALNKFEEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAEILLLFEKQKEFGNPHVS
GGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAPKAAKNTYTAERFIWLTKLN
NLRILEQGSRPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDN
AEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRL
KDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKN
TEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRLALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDR
KEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPSKDILKLRLYEQQHKGKCLYSGKEIN
LVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSR
EWQEFKARVETSFRPRSKKQRILLQKFDEDEGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILL
TGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITR
FVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEE
ADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSKRFRVKNH
EKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNP
FYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYF
IVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINC
DSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVR(配
列番号5)

【0171】

NmeCas9のアミノ酸配列は配列番号6として下で提供される。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、配列番号6と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を有するnapDNABpドメインを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、配列番号6を含むnapDNABpを含む。このタンパク質の長さは1083アミノ酸である。

MAAFKPNSINYILGLAIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRFERAEVPKTGDSL
AMARRLARSVRRLLTRRRRAHRLRLRTRRLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLR
AAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVAGNAHALQ
TGDFRTPAELALNKFEEKESGHIRNQRSYDYSHTFSRKDLQAEILLLFEKQKEFGNPHVS
GGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAPKAAKNTYTAERFIWLTKLN
NLRILEQGSRPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDN
AEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRL
KDRIQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKN
TEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRLALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDR
KEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPSKDILKLRLYEQQHKGKCLYSGKEIN
LGRLNEKGYVEIDAALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSR
EWQEFKARVETSFRPRSKKQRILLQKFDEDEGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRM
LTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKIT
RFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFE
EADTLEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARLDE

GVSVLRVPLTQLKLDLEKMNRREREPKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAPFYKYD
KAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVWVRNHNHGIADNATMVRVDVFEKGDYLVPIYS
WQVAKGILPDRAVVQKGDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFGYFAS
CHRG TGNNIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALS FQKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPV
R(配列番号6)

【0172】

いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、*Campylobacter jejuni*に由来するコンパクトなCas9オーソログ(CjCas9)を含むnapDNABpを含む。いくつかの態様において、napDNABpはCjCas9を含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタはCjCas9ニッカーゼを含む。CjCas9はNNNNACAおよびNNNNACAC PAMを認識する。参照によって本明細書に組み込まれるKim et al., Nature Communications 8(14500):1-12 (2017)を見よ。CjCas9(ニッカーゼ)の配列は配列番号379として提出される。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、配列番号379と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を有するnapDNABpドメインを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、配列番号379を含むnapDNABpを含む。このタンパク質の長さは984アミノ酸である。

MARILAF AIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLARSARKRL
ARRKARLNHLKHLIANEFKLN YEDYQSFDES LAKAYKGS LISPYELRFRALNELLSKQ
DFARVILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYQSVGEYLYKEYFQKF
KENSKEFTNVRNKKESYERCIAQSFLKDELKLIFKKQREFGFSFSKKFEEVLSVAFYK
RALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRIINLLNNLNKNTGILYTKDDL
NALLNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGT YFIEFKKYKEFIKALGEHNLSQ
DDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQIDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTP
L MLEGKKYDEACNELNLKVAINEDKKDFLPAFNETY YKDEVTPNPVVLRAIKEYRKVLN
ALLKKYGVH KINIELAREVGKNHSQRAKIEKEQNENYKAKKDAELECEKLGLKINS
KNILKLRL FKEQKEFCAYS GEKIKISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSFDDSYMKNKVLVFT
KQNQEKL NQTPFEAFGND SAKWQKIEVLAKNLPTKKQKRILDKNYKDKEQKNFKDR
NLNDTRYIARLV LNYTKDYLD FLPLSDDENTKLN DTQKGSKVHVEAKSGMLTSALR
HTWGFSAKDRNNHLHHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELD
YKNKRKFFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFYQSYGGKE
GVLKALELGKIRKVNGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFALKVLPNKA
VARSKKGEIKDWILMDENYEFCSLYKDSLILIQTKDMQEPEFVYNAFTSSTVSLIV
SKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVFEKYIVSALGEVTKAEFRQR
EDFKK(配列番号379)

【0173】

追加のコンパクトなCasタンパク質

種々の態様において、核酸プログラマブルDNA結合タンパク質は、限定なしに、Cas9(例としてdCas9およびnCas9)、CasX、CasY、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、GeoCas9、CjCas9、Cas12a、Cas12b、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13b、Cas13c、Cas13d、Cas14、Csn2、xCas9、SpCas9-NG、循環置換されたCas9ドメイン、たとえばCP1012、CP1028、CP1041、CP1249、およびCP1300、アルゴノート(Ago)ドメイン、Cas9-KKH、SmacCas9、SpRY、SpRY-HF1、Spy-macCas9、SpCas9-VRQR、SpCas9-VRER、SpCas9-VQR、SpCas9-EQR、SpCas9-NRRH、SpaCas9-NRTH、SpCas9-NRCH、LbCas12a、AsCas12a、CeCas12a、MbCas12a、CasΦ、SpCas9-NG-CP1041、SpCas9-NG-VRQRのコンパクトなバリエーションを含む。

【0174】

依然として他の態様において、napDNABpは、*Staphylococcus lugdunensis* Cas9(SlugCas9)、*Staphylococcus lutrae* Cas9(SlutrCas9)、または*Staphylococ*

10

20

30

40

50

cus haemolyticus Cas9(ShaCas9)からのコンパクトなCas9オーソログを含み得る。参照によって本明細書に組み込まれるHu et al., Nucleic Acids Research, 49(7), April 2021, 4008-4019を見よ。SlugCas9、SlutrCas9、およびShaCas9タンパク質は、夫々NNGG、NNGG/NNGA、およびNNGG PAMを認識する。

【0175】

依然として他の態様において、Casタンパク質はいずれかのCRISPR関連タンパク質を包含し得る。Cas12a、Cas12b、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(Csn1およびCsx12としてもまた知られている)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、それらのホモログ、またはそれらの改変されたバージョンを包含するが、これらに限定されず、好ましくは、ニッカーゼ突然変異(例として、配列番号326の野生型SpCas9ポリペプチドのD10A突然変異に対応する突然変異)を含む。

【0176】

ある特定の態様において、本明細書において企図される塩基エディタは、古典的SpCas9配列よりも小さい分子量であるCas9タンパク質を包含し得る。いくつかの態様において、より小さいサイズのCas9バリエーションは、例としてAAVベクター、発現ベクター、または他の送達手段による細胞への送達を容易にし得る。古典的SpCas9タンパク質は長さが1368アミノ酸であり、158キロダルトンの予測分子量を有する。本明細書に使用されるとき、用語「小さいサイズのCas9バリエーション」は、約1300アミノ酸未満、または少なくとも1290アミノ酸未満、または1280アミノ酸未満、または1270アミノ酸未満、または1260アミノ酸未満、または1250アミノ酸未満、または1240アミノ酸未満、または1230アミノ酸未満、または1220アミノ酸未満、または1210アミノ酸未満、または1200アミノ酸未満、または1190アミノ酸未満、または1180アミノ酸未満、または1170アミノ酸未満、または1160アミノ酸未満、または1150アミノ酸未満、または1140アミノ酸未満、または1130アミノ酸未満、または1120アミノ酸未満、または1110アミノ酸未満、または1100アミノ酸未満、または1050アミノ酸未満、または1000アミノ酸未満、または950アミノ酸未満、または900アミノ酸未満、または850アミノ酸未満、または800アミノ酸未満、または750アミノ酸未満、または700アミノ酸未満、または650アミノ酸未満、または600アミノ酸未満、または550アミノ酸未満、または500アミノ酸未満だが、少なくとも約400アミノ酸よりも大きく、Cas9タンパク質の要求される機能を保持する、天然に存在するか、操作されたか、または別様のいずれかのCas9バリエーションを言う。

【0177】

種々の態様において、本明細書において開示される塩基エディタは、以下のとおり記載される小さいサイズのCas9バリエーションの1つ、またはいずれかの参照の小さいサイズのCas9タンパク質と少なくとも約70%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約96%同一、少なくとも約97%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、少なくとも約99.5%同一、または少なくとも約99.9%同一を有するそのCas9バリエーションを含み得る。例示的な小さいサイズのCas9バリエーションは、SauriCas9、SaCas9、CjCas9、Nme2Cas9、AsCas12a、およびLbCas12aを包含するが、これらに限定されない。

【0178】

いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは、野生型LbCas12aなどのLbCas12aを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは、配列番号381と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の配列同一性であり、それを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは、配列番号381のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 7 9 】

いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは、野生型AsCas12aなどのAsCas12aを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは、操作されたAsCas12aまたはenAsCas12aなどの変異体AsCas12aを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは、配列番号383と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の配列同一性であり、それを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインは配列番号383のアミノ酸配列を含む。

【表 B - 1】

説明	配列	配列番号
SaCas9	MGKRNILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGR	配列番号377
Staphylococcus aureus	RSKRGARRLRKRRRRHRIQVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVK	
1053AA	GLSQKLSSEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISR	配列番号380
123kDa	NSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKV	
	QKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEML	
	MGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYE	
	KFQIIEENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLK	
	VYHDIKDITARKEIENAEELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQ	
	EEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPK	
	KVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIE	
	LAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIK	
	LHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFNYEVDHIIIPRSVSFDNSFNK	
	VLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAHGKGRIS	
	KTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNNLLRSYFRV	
	NNLDVVKVSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHAEDALIINANADF	
	IFKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIK	
	HIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNLGL	
	YDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYGDENPL	
	YKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNALDITDDYPNSR	
	NKVVKLSLKPYPFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKENYYEVNSKCY	
	EEAKKLKKISNQAEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVM	
	IDITYREYLENMNDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKK	
	HPQIIKK	
GeoCas9	MRYKIGLDIGITSVGWAVMNLDIPRIEDLGVRIFDRAENPQTGESLAL	配列番号380
G. stearothermophilus	PRRLARSARRRLRRRKHLERIRRLVIREGILTKEELDKLFEEKHEID	
1087AA	VWQLRVEALDRKLNNDELARVLLHLAKRRGFKSNRKSESNKENST	
	MLKHIEENRAILSSYRTVGEMIVKDPKFALHKNKGENYNTNTIARDD	
	LEREIRLIFSKQREFGNMSCTEEFENEYITIWASQRPVASKDDIEKKV	
	GFCTFEPKEKRAPKATYTFQSFIWEHINKLRLISPSGARGLTDEER	

【表 B - 2】

説明	配列	配列番号
127kDa	RLLYEQAFQKNKITYHDIRTLLHLPDDTYFKGIVYDRGESRKQENENIR FLELDAYHQIRKAVDKVYGGKSSSFLPIDFTFGYALTFLKDDADI HSYLNRNEYEQNGKRMPLANKVYDNELIEELLNLSFTKFGHLSLKAL RSILPYMEQGEVYSSACERAGYTFTGPKKKQKTMLLPNIPPIANPVV MRALTQARKVVNAIIKKYGSPVSIHIELARDLSQTFDERRKTKKEQD ENRKKNETAIRQLMEYGLTLNPTGHDIVKFKLWSEQNGRCAYSLQPI EIERLLEPGYVEVDHVIPYSRSLDDSYTNKVVLVTRENREKGNRIPA EYLGVGTERWQQFETFVLTKQFSKKKRDRLLRLHYDENEETEFKN RNLNDTRYISRFFANFIREHLKFAESDDKQKVYTVNGRVTAHLRSR WEFNKNREESDLHHAVDAVIVACTTPSDIAKVTAFYQRREQNKELA KKTEPHFPQWPWFADDELRLSKHPKESIKALNLGNYDDQKLESL QPVFYSRMPKRSVTGAHQETLRRYVVIDERSGKIQTIVVTKLSEIK LDASGHFPMYGGKESDPRTYEAIRQRLLLEHNNDPKKAFQEPLYKPKK NGEPGPVIRTVKIIDTKNQVIPLNDGKTVAYNSNIVRVDVFEDGKY CVPVYTMIMKILPNKAIEPNKPYSEWKEMTEDYTFRFSLYPNDLI RIELPREKTVKTAAGEEINVKDVVYKYTIDSANGGLELISHDHRFSL RGVGSRTLKRFEKYQVDVLGNIYKVRGEKRVGLASSAHSKPGKTIR PLQSTRD	
LbCas12a L. bacterium 1228AA 143.9kDa	MSKLEKFTNCYSLSKTLRFKAIPVGKTQENIDNKRLLEVEDEKRAEDY KGVKLLDRYLSFINDVLHSIKLKNLNNYISLFRKKTRTEKENKELE NLEINLRKEIAKAFKNGEGYKSLFKKDIETILPEFLDDKDEIALVNSFN GFTTAF TGFDNRENMFSEEAKSTSIAFRGINENLTRYISNMDIFEKV DAIFDKHEVQEIKEILNSDYDVEDFFEGEFFNFVLTQEGIDVYNIIIG GFVTESGEKIKGLNEYINLYNQTKQKLPKFKPLYKQVLSDRESLSF YGEGYTSDEEVLEVFRTNLKNSEIFSSIKKLEKLFKNFDEYSSAGIF VKNGPAISTISKDIFGEWNVIRDKWNAEYDDIHLKKKAVVTEKYEDDR RKSFKKIGSFSLEQLQEYADADLSVVEKLKEIIQKVDEIYKVYGSSEK LFDADFVLEKSLKKNDVAVAIMKDLLDSVKSFENYKAFKFGGKETN RDESFGDFVLAYDILLKVDHIYDAIRNYVTQKPYSKDKFKLYFQNP QFMGGWDKDKETDYRATILRYGSKYYLAIMDKKYAKCLQKIDKDDV NGNYEKINYKLLPGPNKMLPKVFFSKKWMAYNPSEDIQKIYKNGTF KKGDMFNLNDCHKLIDFFKDSISRYPKWSNAYDFNFSETEKYKDIAG FYREVEEQGYKVSFESASKKEVDKLVEEGKLYMFQIYNKDFSDKSH GTPNLHTMYFKLLFDENNHGQIRLSGGAELFMRRASLKKEELVVHP ANSPIANKNPDPNPKKTTTSLSYDVYKDKRFSSEQYELHIPIAINKCPKN IFKINTEVRVLLKHDDNPYVIGIDRGERNLLYIVVVDGKGNIVEQYSL NEIINNFGIRIKTDYHSLDDKKEKERFEARQNWTSIENIKELKAGYIS QVVHKICELVEKYDAVIALEDLNSGFKNSRVKVEKQVYQKFEKMLID KLNYMVDKKSNPCATGGALKGYQITNKFSFKSMSTQNGFIFYIPA WLTSKIDPSTGFVNLLTKYTSIADSKKFISFDRIMYVPEEDLFEFA LDYKNFSRTDADYIKKWLYSYGNRIRIFRNPKNVDFDWEVCLTS AYKELFNKYGINYQQGDIRALLCEQSDKAFYSSFMALMSLMLQMRN SITGRTDVDFLISPVKNSDGIFYDSRNYEAQENAILPKNADANGAYNI ARKVLWAIGQFKADEKLDKVIAISNKEWLEYAQTSVKH	配列番号381
BhCas12b B. hisashii	MATRSFILKIEPNEEVKKGLWKTHEVLNHGIAYYMNILKIRQEAIYEH HEQDPKNPKKVSKEIAELWDFVLKMQKNSFTHEVDKDEVFNIL RELYEELVPSSVEKKGEANQLSNKFLYPLVDPNSQSGKGTASSGRK PRWYNLKIAGDPSWEEKKKKWEEDKKKDPLAKILGKLAEYGLIPLFIP	配列番号382

10

20

30

40

50

【表 B - 3】

説明	配列	配列番号
1108AA 130.4kDa	YTDSEPIVKEIKWMEKSRNQSVRRDKDMFIQALERFLSWESWNLK VKEEYKVEKEYKTEERIKEDIQALKALEQYEKERQEQLLRDTLNT NEYRLSKRGLRGWREIIQKWLKMDENEPSEKYLEVFKDYQRKHPRE AGDYSVYEFLSKKENHFIWRNHPEYPYLYATFCEIDKKKKDAKQQAT FTLADPINHPLWVRFEERSGSNLNKYRILTEQLHTEKLLKKLTVQLD RLIYPTESGGWEEKGKVDIVLLPSRQFYNQIFLDIEEKGKHAFTYKDE SIKFPLKGTLLGGARVQFDRDHLRRYPHKVESGNVGRIFYNMTVNIEP TESPVSKSLKIHRDDFPKVVNFKPKELTEWIKDSKGKKLKSIESLEI GLRVMSIDLQQRQAAAASIFEVVDQKPDIEGKLFFPIKGTELYAVHR ASFNIKLPGETLVKSREVLRLKAREDNLKL MNQKLNFLRNVLFHQF EDITEREKRVTKWISRQENSVDPLVYQDELIQIRELMYKPKDWVAF LKQLHKLREVEIGKEVKHWRKSLSDGRKGLYGISLKNIDEIDRTRKFL LRWSLRPTEPGEVRRLEPGQRFAIDQLNHLNALKEDRLKKMANTIIM HALGYCYDVRKKKWQAKNPACQIILFEDLSNYPYEERSRFENSKL MKWSRREIPRQVALQGEIYGLQVGEVGAQFSSRFHAKTGSPGIRCS VVTKEKLQDNRRFFKNLQREGRLTLDKIAVLKEGDLYPDKGGEKFISL SKDRKCVTTHADINAAQNLQKRFWTRTHGFYKVYCKAYQVDGQTV YIPESKDQKQKIIIEFGEGYFILKDGVEWVNAGKLIKKGSSKQSSS ELVDSILKDSFDLASELKGEKLMLYRDPSGNVFSPDKWMAAGVFF GKLERILISKLTNQYSISTIEDDSSKQSM	

10

20

【0180】

追加の例示的なCas9同等タンパク質配列は以下を包含し得る：

【表 C - 1】

説明	配列	
AsCas12a(以前はCpf1として知られている)	MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDDHYKELKPIIDRIYKT YADQCLQLVLQLDWENLSAIDSRYKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDFYFIGRTDNLTDA INKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVF SAEDISTAIPHRIQDNFQPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSTIEEV FSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPH	
Acidaminococcus sp.(BV3L6株)	RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLRNENVLETAALFNELNSID LTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINL QEISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQDLSLLGLYHL LDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTL	30
UniProtKB U2UMQ6	ASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGI MPKQKGRYKALSFEPTTEKTSEGFDMYYDYFPD AAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYA KKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYH ISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIK LNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIDTLYQELYDYVNHRLSHDLS D EARALLPNVITKEVSHEIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHP ETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSNLTIQQFDYQKKLDNREKERVAAARQAWSV VGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVLENLNFQFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLI DKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPLYQLTDQFTSFAKMGTSQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGF V DPFVWVKTIKNHESRKHFLEGDFDLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVF EKNETQFDAQGTPPIAGKRIVPVNIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNIL PKLENDSDSHADTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPPEW M	40

50

【表 C - 2】

	DADANGAYHIALKGQLLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN(配列番号383)
AsCas12aニッ カーゼ(例とし てR1226A)	MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDDHYKELKPIIDRIYKT YADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHQDYFIGRTDNLTDA INKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVF SAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEV FSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPH RFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLRNENVLETAEALFNELNSID LTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINL QEIIAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQDLSLLGLYHL LDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFLNFQMPTL ASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTTEKTSEGFDKMYDYFDP AAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYA KKTGDQKGQYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYH ISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIK LNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLDQKTPIDTLYQELYDYVNHRLSHDLS D EARALLPNVITKEVSHEIHKDRRFTSDKFFHHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHP ETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAAARQAWSV VGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLI DKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPNYQLTDQFTSFAKMGTSQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGF V DPFVWKTIKNHESRKHFLGFDLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVF EKNETQFDAQGTPFIAGKRIVPVIEHNRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNIL PKLLENDSDHAIDTMVALIRSVLQMANSAATGEDYINSPVRDLNGVCDFSFRQNPWP M DADANGAYHIALKGQLLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN(配列番号384)
LbCas12a(以 前はCpf1とし て知られてい る)	1 MNYKTGLEDF IGKESLSKTL RNALIPTST KIHMEEMGVI RDELRAEKQ QELKEI MDDY 61 YRTFIEEKLQ IQGGIQWNSL FQKMEETMED ISVRKDLDKI QNEKRKEICC YFTSD KRFKD 121 LFNALKITDI LPNFIKDNKE YTEEEKAEKE QTRVLFRFA TAFTNYFNQR RNNF SEDNIS
Lachnospirac eae bacteriu m GAM79	181 TAISFRIVNE NSEIHLQNMRFQRIEQQYP EEVCGMEEY KDMLQEWQMK HIY SVDIFYDR 241 ELTQPGIEYY NGICGKINEH MNQFCQKNRI NKNDFRMKKL HKQILCKKSS YYEI PFRFES
参照配列WP_ 119623382.1	301 DQEVYDALNE FIKTMKKKEI IRRCVHLGQE CDDYDLGKIY ISSNKYEQIS NALY GSWDTI 361 RKCICEEYMD ALPGKGKEKE EKAEAAAKE EYRSIADIDK IISLYGSEMD RTISA KKCIT 421 EICDMAGQIS IDPLVCNSDI KLLQNKEKTT EIKTILDSFL HVYQWGQTFI VSDIIE KDSY 481 FYSELEDVLE DFEGITTLYN HVRSYVTQKP YSTVKFKLHF GSPTLANGWS QS KEYDNNAI 541 LLMRDQKFYL GIFNVRNKPDKQIIKGHEKE EKGDKKMIY NLLPGPSKML PKV FITSRSQ 601 QETYKPSKHI LDGYNEKRHI KSSPKFDLGY CWDLIDYYKE CIHKHPDWKN YDF HFSDTKD 661 YEDISGFYRE VEMQGYQIKW TYISADEIQK LDEKGQIFLF QIYNKDFSVH STGK

10

20

30

40

50

【表 C - 3】

	DNLHTM 721 YLKNLFSEEN LKDIVLKLNG EAEFFRKAS IKTPIVHKKG SVLVNRSYTQ TVGN KEIRVS 781 IPEEYTEIY NYLNHIGKKG LSSEAQRYLD EGKIKSFTAT KDIVKNYRYC CDHY FLHLPI 841 TINFKAQSDV AVNERTLAYI AKKEDIHIIG IDRGERNLLY ISVVDVHGNI REQRS FNIVN 901 GYDYQQKLKD REKSRDAARK NWEEIEKIKE LKEGYLSMVI HYIAQLVVKY NAV VAMEDLN 961 YGFKTGRFKV ERQVYQKFET MLIEKLHYLV FKDREVCEEG GVLRGYQLTY IPE SLKKVGK 1021 QCGFIFYVPA GYTSKIDPTT GFVNLFSEFN LTNRESQDF VGKFDEIRYD RD KKMFEFSF 1081 DYNMYIKKGT ILASTKWKVY TNGTRLKRIV VNGKYTSQSM EVELTDAMEK ML QRAGIEYH 1141 DGKDLKGQIV EKGIEAEIID IFRLTVQMRN SRSESEDREY DRLISPVLND KGEF FDTATA 1201 DKTLPQDADA NGAYCALKG LYEYKQIKEN WKENEQFPRN KLVQDNKTWF D FMQKKRYL (配列番号385)	10
PcCas12a - Cpf1で以前に 知られている	1 MAKNFEDFKR LYSLSKTLRF EAKPIGATLD NIVKSGLLDE DEHRAASYVK VKKLI DEYHK 61 VFIDRVLDG CLPLENKGNN NSLAEEYESY VSRAQDEDAK KKFKEIQQNL RSVI AKKLTE	20
Prevotella co pri	121 DKAYANLFGN KLIESYKDE DKKKIISDL IQFINTAEST QLDSMSQDEA KELV KEFWGF 181 VTYFYGFFDN RKNMYTAEK STGIAYRLVN ENLPKFIDNI EAFNRAITRP EIQE NMGVLY 241 SDFSEYLNVE SIQEMFQLDY YNMLLTQKQI DVYNAIIGGK TDDEHDVQIK GINE YINLYN 301 QQHKDDKLPK LKALFKQILS DRNAISWLPE EFNSDQEVN AIKDCYERLA ENV LGDKVLK 361 SLLGSLADYS LDGIFIRNDL QLTDISQKMF GNWGVQNAI MQNIKRVAPA RKH KESEEDY 421 EKRIAGIFKK ADSFSISYIN DCLNEADPNN AYFVENYFAT FGAVNTPTMQ REN LFALVQN 481 AYTEVAALLH SDYPTVKHLA QDKANVSKIK ALLDAIKSLQ HFVKPLLKGK DES DKDERFY 541 GELASLWAEI DTVTPLYNMI RNYMTRKPYS QKKIKLNFEN PQLLGWDAN KE KDYATIIL 601 RRNGLYLAI MDKDSRKLLG KAMPSDGECY EKMVYKFFKD VTTMIPKOST QL KDVQAYFK 661 VNTDDYVLNS KAFNKPLTIT KEVFDLNNVL YGKYKKFQKG YLTATGDNVG YT HAVNVWIK 721 FCMDFLNSYD STCIYDFSSL KPESYLSLDA FYQDANLLLY KLSFARASVS YIN QLVEEGK 781 MYLFQIYNKD FSEYSGTPN MHTLYWKALF DERNLADVY KLNGQAEMFY RK KSIENTHP 841 THPANHPILN KNKDNKKES LFDYDLIKDR RYTVDKFMFH VPITMNFKSV GSE	30
参照配列WP_ 119227726.1		40

【表 C - 4】

	NINQDVK 901 AYLRHADDMMH IIGIDRGERH LLYLVVIDLQ GNIKEQYSLN EIVNEYNGNT YHTN YHDLDD 961 VREEERLKAR QSWQTIENTIK ELKEGYLSQV IHKITQLMVR YHAIVVLEDL SKGF MRSRQK 1021 VEKQVYQKFE KMLIDKLNLYL VDKKTDVSTP GGLLNAYQLT CKSDSSQKLG K QSGFLFYIP 1081 AWNTSKIDPV TGFVNLLDTH SLNSKEKIKK FFSKFDAIRY NKDKKWFEFN LDY DKFGKKA 1141 EDTRTKWTLC TRGMRIDTFR NKEKNSQWDN QEVDLTTEMK SLLEHYIDI HG NLKDAISA 1201 QTDKAFFTGL LHILKLTLMQ RNSITGTETD YLVSPVADEN GIFYDSRSCG NQ LPENADAN 1261 GAYNIARKGL MLIEQIKNAE DLNNVKFDIS NKAWLNFAQQ KPYKNG (配列番号386)	10
ErCas12a Cpf1で以前に 知られている	1 MFSAKLISDI LPEFVIHNNN YSASEKEEKT QVIKLSRFA TSFKDYFKNR ANCFSA NDIS 61 SSSCHRIVND NAEIFFSNAL VYRRIVKNLS NDDINKISGD MKDSLKEMSL EEIYS YEKYG	
Eubacterium rectale	121 EFITQEGISF YNDICGKVN LFMNLYCQKNK ENKNLYKLRK LHKQILCIAD TSYE VPKYFE 181 SDEEVYQSVN GFLDNISSKH IVERLRKIGE NYNGYNLDKI YIVSKFYESV SQKT YRDWET	20
参照配列WP_119223642.1	241 INTALEIHYN NILPGNGKSK ADKVKKAVKN DLQKSITEIN ELVSNYKLCP DDNIK AETI 301 HEISHILNNF EAQELKYNPE IHLVESELKA SELKNVLDVI MNAFWCSVF MTEE LVDKDN 361 NFYAELEEIY DEIYPVISLY NLVRNYVTQK PYSTKKIKLN FGIPTLADGW SKSKE YSNN 421 IILMRDNLYY LGIFNAKNKP DKKIIEGNTS ENKGDYKKMI YNLLPGPNKM IPKVF LSSKT 481 GVETYKPSAY ILEGYKQNKH LKSSKDFDIT FCHDLIDYFK NCIAIHPEWK NFGF DFSDTS 541 TYEDISGFYR EVELQGYKID WTYISEKDID LLQEKGQLYL FQIYNKDFSK KSSG NDNLHT 601 MYLKNLFSEE NLKDIVLKL NGEAEIFFRKS SIKNPIHKK GSILVNRTYE AEEKD QFGNI 661 QIVRKTIPEN IYQELYKYFN DKSDKELSDE AAKLKNVVG HHAATNIVKD YRYT YDKYFL 721 HMPITINFKA NKTSFINDRI LQYIAKEKDL HVGIDRGER NLIYVSVIDT CGNIVE QKSF 781 NIVNGYDYQI KLKQQEGARQ IARKEWKEIG KIKEIKEGYL SLVIHEISKM VIKYNA IIAM 841 EDLSYGFKKG RFKVERQVYQ KFETMLINKL NYLVFKDISI TENGGLKGY QLT YIPDKLK 901 NVGHQCGCIF YVPAAYTSKI DPTTGfVNIF KFKDLTVDAK REFIKKFDSI RYDS DKNLFC 961 FTFDYNFIT QNTVMSKSSW SVYTYGVRIK RRFVNGRFSN ESDTIDITKD MEK TLEMTDI	30

10

20

30

40

50

【表 C - 5】

	1021 NWRDGHDLRQ DIIDYEIVQH IFEIFKLTVQ MRNSLSELED RDYDRLISPV LNE NNIFYDS 1081 AKAGDALPKD ADANGAYCIA LKGLYEIKQI TENWKEDGKF SRDKLKISNK DW FDFIQNKR 1141 YL(配列番号387)
CsCas12a - Cpf1で以前に 知られている	1 MNYKTGLEDF IGKESLSKTL RNALIPTST KIHMEEMGVI RDELRAEKQ QELKEI MDDY 61 YRAFIEEKLQ QIQGIQWNSL FQKMEETMED ISVRKDLDKI QNEKRKEICC YFTSD KRFKD
Clostridium s p. AF34-10B H	121 LFNALITDI LPNFIKDNKE YTEEEKAEKE QTRVLFRFA TAFTNYFNQR RNNF SEDNIS 181 TAISFRIVNE NSEIHLQNMN AFQRIEQQYP EEVCGMEEY KDMLQEWQMK HIY LVDFYDR
参照配列WP_ 118538418.1	241 VLTQPGIEYY NGICGKINEH MNQFCQKNRI NKNDFRMKKL HKQILCKKSS YYEI PFRFES 301 DQEVYDALNE FIKTMKEKEI ICRCVHLGQK CDDYDLGKIY ISSNKYEQIS NALY GSWDIT 361 RCKIKEEYMD ALPGKGEKKE EKAEAAAKE EYRSIADIDK IISLYGSEMD RTISA KKCIT 421 EICDMAGQIS TDPLVCNSDI KLLQNKEKTT EIKTILDSFL HVYQWGQTFI VSDII EKDSY 481 FYSELEDVLE DFEGITTLYN HVRSYVTQKP YSTVKFKLHF GSPTLANGWS QS KEYDNNAI 541 LLMRDQKFYL GIFNVRNKPQ KQIKGHEKE EKG DYKKMIY NLLPGPSKML PKV FITSRSG 601 QETYKPSKHI LDGYNEKRHI KSSPKFDLGY CWDLIDYYKE CIHKHPDWKN YDF HFSDTKD 661 YEDISGFYRE VEMQGYQIKW TYISADEIQK LDEKGQIFLF QIYNKDFSVH STGK DNLHTM 721 YLKNLFSEEN LKDIVLKLNG EAELFFRKAS IKTPVVHKKG SVLVNRSYTQ TVG DKEIRVS 781 IPEEYYTEIY NYLNHIGRGK LSTEAQRYLE ERKISFTAT KDIVKNRYC CDHYF LHLPI 841 TINFKAQSDI AVNERTLAYI AKKEDIHIG IDRGERNLLY ISVVDVHGNI REQRSF NIVN 901 GYDYQQKLKD REKSRDAARK NWEEIEKIKE LKEGYLSMVI HYIAQLVVKY NAV VAMEDLN 961 YGFKTGRFKV ERQVYQKFET MLIEKLHYLV FKDREVCEEG GVLRGYQLTY IPE SLKKVGK 1021 QCGFIFYVPA GYTSKIDPTT GFVNLFSEFN LTNRESRQDF VGKFDEIRYD RD KKMFEFSF 1081 DYNMYIKKGT MLASTKWKVY TNGTRLKRIV VNGKYTSQSM EVELTDAMEK M LQRAGIEYH 1141 DGKDLKGQIV EKGIEAEIID IFRLTVQMRN SRSESEDREY DRLISPV LND KGEF FDTATA 1201 DKTLPQDADA NGAYCIALKG LYEYKQIKEN WKENEQFPRN KLVQDNKTWF D FMQKKRYL(配列番号388)
BhCas12b Bacillus hisas	1 MATRSFILKI EPNEEVKKGL WKTHEVLNHG IAYYMNILKL IRQEAIEHH EQDPKN PKKV

10

20

30

40

50

【表 C - 6】

hii	61 SKAEIQAELW DFVLKMQKCN SFTHEVDKDE VFNILRELYE ELVPSSVEKK GEAN QLSNKF
参照配列 WP_095142515.1	121 LYPLVDPNSQ SGKGTASSGR KPRWYNLKIA GDPSWEEEEK KWEEDKKKDP LA KILGKLAE
	181 YGLIPLFIPY TDSNEPIVKE IKWMEKSRNQ SVRRLDKDMF IQALERFLSW ESWN LKVKEE
	241 YEKVEKEYKT LEERIKEDIQ ALKALEQY EK ERQEQLLRDT LNTNEYRLSK RGL RGWREII
	301 QKWLMKDENE PSEKYLEVFK DYQRKHPREA GDYSVYEFLS KKENHFIWRN HP EYPYLYAT
	361 FCEIDKKKKD AKQQATFTLA DPINHLWVR FEERSGSNLN KYRILTEQLH TEK LKKKLTV
	421 QLDRLIYPTE SGGWEEKGKV DIVLLPSRQF YNQIFLDIEE KGKHAFTYKD ESIK FPLKGT
	481 LGGARVQFDR DHLRRYPHKV ESGNVGRIYF NMTVNIEPTE SPVSKSLKIH RDD FPKVVNF
	541 KPKELTEWIK DSKGKKLKSG IESLEIGLRV MSIDLGQRQA AAASIFEVVD QKPD IEGKLF
	601 FPIKGTELYA VHRASFNIK L PGETLVKSRE VLRKAREDNL KLMNQKLNFL RNV LHFQQFE
	661 DITEREKVRT KWISRQENS D VPLVYQDELI QIRELMYKPY KDWVAFKQL HKR LEVEIGK
	721 EVKHWRKSLS DGRKGLYGIS LKNIDEIDRT RKFLLRWSLR PTEPGEVRR L EPG QRFAIDQ
	781 LNHLNALKED RLKKMANTII MHALGYCYDV RKKKWQAKNP ACQIILFEDL SNY NPYEERS
	841 RFENSKLMKW SRREIPRQVA LQGEIYGLQV GEVGAQFSSR FHAKTGSPGI RC SVVTKEKL
	901 QDNRRFFKNLQ REGRLTDKI AVLKEGDLYP DKGGEKFISL SKDRKCVTTH ADI NAAQNLQ
	961 KRFWTRTHGF YKVYCKAYQV DGQTVYIPES KDQKQKIIIE FGEGYFILKD GVV EWNAGK
	1021 LKIKKGSSKQ SSSELVDSI LKDSFDLASE LKGEKLMLYR DPSGNVFPD KW MAAGVFFG
	1081 KLERILISK L TNQYSISTIE DDSSKQSM(配列番号 389)
ThCas12b	1 MSEKTTQRAY TLRLNRASGE CAVCQNNSCD CWHDALWATH KAVNRGAKAF GD WLLTLRGG
Thermomonas hydrothermalis	61 LCHTLVEMEV PAKGNNPPQR PTDQERRDRR VLLALSWLSV EDEHGAPKEF IV ATGRDSAD
参照配列 WP_072754838	121 DRAKKVEEKL REILEKRDFQ EHEIDAWLQD CGPSLKAHIR EDAVWVNRRA LFD AAVERIK
	181 TLTWEEAWDF LEPFFGTQYF AGIGDGKDKD DAEGPARQGE KAKDLVQKAG Q WLSARFGIG
	241 TGADFMSMAE AYEKIAK WAS QAQNGDNGKA TIEKLACALR PSEPPTLDTV LK CISGPGHK
	301 SATREYLKTL DKKSTVTQED LNQLRKLAD E DARNCRKKVG KKGKKPWADE V LKDVENSCE
	361 LTYLQDNSPA RHREFSVMLD HAARRVSM AH SWIKKAEQRR RQFESDAQKL K NLQERAPSA

10

20

30

40

50

【表 C - 7】

	421 VEWLDRFCES RSMITTGANTG SGYRIRKRAI EGWSYVVQAW AEASCDTEDK RI AAARKVQA 481 DPEIEKFGDI QLFEALAADE AICVWRDQEG TQNPSILIDY VTGKTAEHNQ KRFK VPAYRH 541 PDEL RHPVFC DFGNSRWSIQ FAIHK EIRDR DKGAKQDTRQ LQNRHGLKMR LW NGRSMTDV 601 NLHWSSKRLT ADLALDQNP NNPTEVTRAD RLGRAASSAF DHVKIKNVFN EK EWNGRLQA 661 PRAELDRIAK LEEQGKTEQA EKLRKRLRWY VSFSPCLSPS GPFIVYAGQH NIQ PKRSGQY 721 APHAQANKGR ARLAQLILSR LPDLRILSVD LGHRFAAACA VWETLSSDAF RR EIQGLNVL 781 AGGSGEGDLF LHVEMTGDDG KRRTVVYRRI GPDQLLDNTP HPAPWARLDR Q FLIKLQGED 841 EGVREASNEE LWTVHKLEVE VGRTVPLIDR MVRSGFGKTE KQKERLKKLR EL GWISAMPN 901 EPSAETDEKE GEIRSISRVS DELMSSALGT LRLALKRHGN RARIAFAMTA DYK PMPGGQK 961 YVFHEAKEAS KNDDETKRRD NQIEFLQDAL SLWHDLFSSP DWEDNEAKKL WQ NHIATLPN 1021 YQTPEEISAE LKRVERNKKR KENRDKLRTA AKALAENDQL RQHLHDTWKE R WESDDQQWK 1081 ERLRSLKDWI FPRGKAEDNP SIRHVGGLSI TRINTISGLY QILKAFKMRP EPD DLRKNIP 1141 QKGDDLENF NRRLL EARDR LREQRVKQLA SRIIEAALGV GRIKIPKNGK LPK RPRTTVD 1201 TPCHAVVIES LKTYRPDDL RTRRENQLMQ WSSAKVRKYL KEGCELYGLH F LEV PANYTS 1261 RQCSRTGLPG IRCDDVPTGD FLKAPWWRRA INTAREKNGG DAKDRFLVDL Y DHLNNLQSK 1321 GEALPATVRV PRQGGNLFIA GAQLDDTNKE RRAIQADLNA AANIGLRALL DP DWRGRWWY 1381 VPCKDGTSEP ALDRIEGSTA FNDVRS LPTG DNSSRRAPRE IENLWRDPSG D SLESGTWSP 1441 TRAYWDTVQS RVIELLRRHA GLPTS(配列番号390)	
LsCas12b Laceyella sac chari WP_13222189 4.1	1 MSIRSFKLKL KTKSGVNAEQ LRRGLWRTHQ LINDGIAYYM NWLVLLRQED LFIRN KETNE 61 IEKRSKEEIQ AVLLERVHKQ QQRNQWSGEV DEQTLLQALR QLYEEIVPSV IGKS GNASLK 121 ARFFLGPLVD PNNKTTKDVS KSGPTPKWKK MKDAGDPNWV QEYEKYMAER QTLVRLEEMG 181 LIPLFPMYTD EVGDIHWLPQ ASGYTRTWDR DMFQQAIERL LSWESWNRRV RE RRAQFEKK 241 THDFASRFSE SDVQWMNKL R EYEAQQE KSL EENAFAPNEP YALTKKALRG W ERVYHSWMR 301 LDSAASEEAY WQEVATCQTA MRGEFGDPAI YQFLAQKENH DIWRGYPERV ID FAELNHLQ 361 RELRRAKEDA TFTLPDSVDH PLWVRYEAPG GTNIHGYDLV QDTRNLTLI LD KFILPDEN	

10

20

30

40

50

【表 C - 8】

	421 GSWHEVKKVP FSLAKSKQFH RQVWLQEEQK QKKREVVFYD YSTNLPHLGT L AGAKLQWDR 481 NFLNKRTQQQ IEETGEIGKV FFNISVDVRP AVEVKNGLRQ NGLGKALTVL THP DGTKIVT 541 GWKAEQLEKW VGESGRVSSL GLDSLSEGLR VMSIDLQQR T SATVSVFEIT KE APDNPYKF 601 FYQLEGTEMF AVHQRSFLLA LPGENPPQKI KQMREIRWKE RNRIKQQVDQ LS AILRLHKK 661 VNEDERIQAI DKLLQKVASW QLNEEIATAW NQALSQLYSK AKENDLQWNQ AIK NAHHQLE 721 PVVGKQISLW RKDLSTGRQG IAGLSLWSIE ELEATKKLLT RWSKRSREPG VVK RIERFET 781 FAKQIQHHIN QVKENRLKQL ANLIVMTALG YKYDQEQQKW IEVYPACQVV LFE NLSYRF 841 SFERSRRENK KLMESHSRSI PKLVQMGGEL FGLQVADVYA AYSSRYHGRT G APGIRCHAL 901 TEADLRNETN IIEHIEAGF IKEEHRPYLQ QGDLPWSSG ELFATLQKPY DNPR ILTLHA 961 DINAAQNIQK RFWHPSMWFR VNCEVMEGE IVTYVPKNKT VHKKQKGTFR FV KVEGSDVY 1021 EWAKWSKNRN KNTFSSITER KPPSSMILFR DPSGTFFKEQ EWVEQKTFWG K VQSMIAYM 1081 KKTIVQRMEE(配列番号391)	
DtCas12b Dsulfonatru m thiodismut ans WP_03138643 7	1 MVLGRKDDTA ELRRALWTH EHVNLAVAEV ERVLLRCRGR SYWTLDRRGD PVH VPESQVA 61 EDALAMAREA QRRNGWPVVG EDEEILLALR YLYEQIVPSC LLDDLKPLK GDA QKIGTNY 121 AGPLFSDTC RRDEGKDVAC CGPFHEVAGK YLGALPEWAT PISKQEFDGK D ASHLRFKAT 181 GGDDAFFRVS IEKANAWYED PANQDALKNK AYNKDDWKKE KDKGISSWAY KY IQKQLQLG 241 QDPRTEVRRK LWLELGLLPL FIPVFDKTMV GNLWNRLAVR LALAHLLSWE SW NHRVQDQ 301 ALARAKRDEL AALFLGMEDG FAGLREYELR RNESIKQHAF EPVDRPYVVS GR ALRSWTRV 361 REEWLRHGD T QESRKNICNR LQDRLRGKFG DPDVFHWLAE DGQEALWKER D CVTSFSLN 421 DADGLLEK RK GYALMTFADA RLHPRWAMYE APGGSNLRTY QIRKTENGLW A DVVLLSPRN 481 ESAAVEEKT NVRLAPSGQL SNVSFDQIQK GSKMVGRCRY QSANQQFEGL L GGAEILFDR 541 KRIANEQHGA TDLASKPGHV WFKLTLDVRP QAPQGWL DGK GRPALPPEAK H FKTALS NKS 601 KFADQVRPGL RVLSVDLGVR SFAACSVFEL VRGGPDQGT Y FPAADGRTVD D PEKLWAKHE 661 RSKITLPG E NPSRKEE IAR RAAMEELRSL NGDIRRLKAI LRLSVLQEDD PRTE HLRLFM 721 EAIVDDPAKS ALNAELFKGF GDDFRSTPD LWKQHCHFFH DKAKEVVAER FS RWRTE TRP	

10

20

30

40

50

【表 C - 9】

781	KSSSWQDWRE RRGYAGGKSY WAVTYLEAVR GLILRWNMRG RTYGEVNRQD KKQFGTVASA
841	LLHHINQLKE DRIKTGADMI IQAARGFVPR KNGAGWVQVH EPCRLILFED LAR YRFRTDR
901	SRRENSRLMR WSHREIVNEV GMQGELYGLH VDTTEAGFSS RYLASSGAPG V RCRHLVEED
961	FHDGLPGMHL VGELDWLLPK DKDRTANEAR RLLGGMVRPG MLVPWDGGEL FATLNAASQL
1021	HVIHADINAA QNLQRRFWGR CGEAIRIVCN QLSVDGSTRY EMAKAPKARL L GALQQLKNG
1081	DAPFHLTSIP NSQKPENSYV MTPTNAGKKY RAGPGEKSSG EEDELALDIV E QAEELAQGR
1141	KTFFRDPSPGV FFAPDRWLPS EIYWSRIRRR IWQVTLERN SGRQERAEMD E MPY
	(配列番号392)

10

【0181】

本明細書に記載される塩基エディタは、ガイドヌクレオチド配列プログラマブルDNA結合タンパク質ドメインとして使用され得るCas12a/Cpf1(dCpf1)バリエーションをもまた含み得る。Cas12a/Cpf1タンパク質は、Cas9のRuvCドメインに類似であるRuvC様エンドヌクレアーゼドメインを有するが、HNHエンドヌクレアーゼドメインを有さず、Cpf1のN末端はCas9のアルファヘリックス認識ローブを有さない。Zetsche et al., Cell, 163, 759-771, 2015(これは参照によって本明細書に組み込まれる)において、Cpf1のRuvC様ドメインは両方のDNAストランドを切断することを担い、RuvC様ドメインの不活性化はCpf1ヌクレアーゼ活性を不活性化することが示された。

20

【0182】

シチジンデアミナーゼドメイン

いくつかの態様において、塩基エディタは、シトシンデアミナーゼであるデアミナーゼを含む。いくつかの態様において、シトシンデアミナーゼドメインはnapDNABpのN末端に融合される。

30

【0183】

いくつかの態様において、デアミナーゼは、アポリポタンパク質B mRNA編集複合体(APOBEC)ファミリーデアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、APOBEC1デアミナーゼ、APOBEC2デアミナーゼ、APOBEC3Aデアミナーゼ、APOBEC3Bデアミナーゼ、APOBEC3Cデアミナーゼ、APOBEC3Dデアミナーゼ、APOBEC3Fデアミナーゼ、APOBEC3Gデアミナーゼ、APOBEC3Hデアミナーゼ、またはAPOBEC4デアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは活性化誘導デアミナーゼ(AID)である。いくつかの態様において、デアミナーゼはヤツメウナギCDA1(pmCDA1)デアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼは、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、サル、ウシ、イヌ、ラット、またはマウスからである。いくつかの態様において、デアミナーゼはヒトからである。いくつかの態様において、デアミナーゼはラットからである。いくつかの態様において、デアミナーゼはヒトAPOBEC1デアミナーゼである。いくつかの態様において、デアミナーゼはpmCDA1である。いくつかの態様において、デアミナーゼはヒトAPOBEC3Gである。いくつかの態様において、デアミナーゼはヒトAPOBEC3Gバリエーションである。いくつかの態様において、デアミナーゼはラットAPOBEC1である。

40

【0184】

ある特定の態様において、シチジンデアミナーゼドメインは、以下のとおり、配列番号393に従うアミノ酸配列、または配列番号393と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%、もしくは99.5%同一であるアミノ酸配列を有する「FERNY」ポリペプチ

50

ドである:

MFERNYDPRELRKETYLLYEIKWGKSGKLWRHWCQNNRTQHAENVYFLENIFNARRF
NPSTHCSITWYLSWSPCAECSQKIVDFLKEHPNVNLEIYVARLYYHEDERNRQGLRD
LVNSGVTIRIMDLDPDYNVCWKTFVSDQGGDEDYWPGHFAPWIKQYSLKL(配列番号
393)

【0185】

ある特定の他の態様において、シチジンデアミナーゼドメインは、野生型ドメインから進化した、例としてファージによって支援される連続的進化(PACE)を通して進化したドメインである。いくつかの態様において、シチジンデアミナーゼドメインは、以下のとおり、配列番号394に従うアミノ酸配列、または配列番号394と少なくとも85%、90%、95%、98%、99%、もしくは99.5%同一であるアミノ酸配列を有する「evoFERNY」ポリペプチドであり、これは、配列番号393に対して相対的にH102PおよびD104N置換を含有する:

10

【化1】

MFERNYDPRELRKETYLLYEIKWGKSGKLWRHWCQNNRTQHAENVYFLENIFNARRFNPSTHCSITWYL
SWSPCAECSQKIVDFLKEHPNVNLEIYVARLYY**PEN**ERNRQGLRDLVNSGVTIRIMDLDPDYNVCWKTF
VSDQGGDEDYWPGHFAPWIKQYSLKL(配列番号394)。

FERNYおよびevoFERNYデアミナーゼドメインは長さが162アミノ酸である。それゆえに、これらのドメインは、配列番号276~277、281、133~134、292~295、および487のいずれか1つのものよりも短い。

20

【0186】

例示的な態様において、開示されるCBEは、FERNYまたはevoFERNYデアミナーゼドメインを含む。いくつかの態様において、開示されるCBEは、配列番号393または394のアミノ酸配列を含むデアミナーゼドメインを含む。

【0187】

最新技術のシトシン塩基エディタBE3.9は、ラットAPOBEC1(rAPOBEC1)シチジンデアミナーゼドメインを含有する。それらは、高い総体的な活性、GC標的を編集する重度に毀損された活性、およびTC標的における高い編集を有する。代替的なデアミナーゼが塩基エディタとして実証されている。AIDおよびCDA両方はGC標的に対して十分に働くが、一般的にAPOBEC1よりも低い活性を有する。APOBEC3Gはこれらの全てよりも十分には働かない(Komor, A. C. et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. Sci Adv 3, eaao4774 (2017)を見よ。これは参照によって本明細書に組み込まれる)。TARGET-AID塩基編集の実装は、CDAを使用する(Nishida, K. et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. Science 353, aaf8729-aaf8729 (2016)。これは参照によって本明細書に組み込まれる)。「FERNY」は、APOBECファミリー系統樹に基づくNおよびC末端トランケーションされた祖先配列再構築である。rAPOBEC1:229aa;FERNY:161aa。rAPOBEC1に対する配列類似性は55%である。進化したFERNY遺伝子型は、より短いタンパク質であるにもかかわらず、高いGC活性をもたまた有し、APOBECと同程度に活性である。進化したFERNYは、2019年1月31日公開の国際公開第2019/023680号にさらに詳細に記載され、これは参照によって本明細書に組み込まれる。追加の例示的なシチジンデアミナーゼは、2021年6月3日公開の国際公開第2021/108717号において開示されている。

30

40

【0188】

好適なシトシンデアミナーゼドメインの非限定的な例は、配列番号276~277、281、133~134、292~295、および487として下で提供される。いくつかの態様において、デアミナーゼは、下で提出されるアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96

50

%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一である。

【0189】

ヒトAID

MDSLLMNRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGYLRNKNKGCH
VELLFLRYISDWDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGPNPNSLRIFTARL
YFCEDRKAEEPEGLRRLHRAGVQIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHENS
VRLSRQLRRILLPLYEVDDLRLDAFRTLGL (配列番号276)

【0190】

マウスAID

MDSLLMKQKKFLYHFKNVRWAKGRHETLYCYVVKRRDSATSCSLDFGHLRNKSGC
HVELLFLRYISDWDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVAEFLRWNPNSLRIFTA
RLYFCEDRKAEEPEGLRRLHRAGVQIGIMTFKDYFYCWNTFVENRERTFKAWEGLHE
NSVRLTRQLRRILLPLYEVDDLRLDAFRMLGF (配列番号277)

【0191】

ラットAPOBEC-3(rAPOBEC3)

MGPFCLGCSHRKCYSPIRNLISQETFKFHFKNLRYAIDRKDTFLCYEVTRKDCDSPVS
LHHGVFKNKDNIHAEICFLYWFDKVLKVLSPREEFKITWYMSWSPCFECAEQVLR
FLATHHNLSLDIFSSRLYNIRDPENQQNLCRLVQEGAQVAAMDLYEFKKCWKKFVD
NGGRRFRPWKKLLTNFRYQDSKLQEILRPCYIPVPSSSSSTLSNICLTGKLPETRFCV
ERRRVHLLSEEEFYFYNQVRVKHLCYHGVKPYLCYQLEQFNGQAPLKGCLLSEKG
KQHAELFLDKIRSMELSQVIITCYLTWSPCPNCAWQLAAFKRDRPDILHIYTSRLY
FHWKRPFQKGLCSLWQSGILVDVMDLPQFTDCWTNFMVNPKRPFWPWKGLEIISRR
TQRRLHRIKESWGLQDLVNDFGNLQLGPPMS (配列番号281)

【0192】

ヒトAPOBEC-3G

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPPLDAKIFRG
QVYSELKYHPEMRFFHWFWSKWRKLHRDQEYEVTWYISWSPCTKCTRDMATFLAED
PKVTLTIFVARLYYFWDPDYQEALRSLCQKRDGPRATMKIMNYDEFQHCWSKFVYS
QRELFEPWNNLPKYIILLHIMLGEILRHSM DPPTFTFNFNNEPWRGRHETLYCYE
VERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQDYR
VTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNHVSLCIFTARIYDDQGRCQEGLRTLAEAGAKIS
IMTYSEFKHCWDTFVDHQGCPFPWDGLDEHSQDLSGRLRAILQNNEN (配列番号1
33)

【0193】

ヒトAPOBEC-3F

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPRLDAKIFRG
QVYSQPEHHAEMCFLSWFCGNQLPAYKCFQITWFWVSWTPCPDCVAKLAEFLAHP
NVTLTISAARLYYYWERDYRRALCRLSQAGARVKIMDDEEFAYCWENFVYSEGQPF
MPWYKFDDNYAFLHRTLKEILRNPMEAMYPHIFYFHFKNLRKAYGRNESWLCFTM
EVVKHHSPVSWKRGVFRNQVDPETHCHAERCFLSWFCDDILSPNTNYEVTWYTSW
SPCPECAGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLYYFWDTDYQEGLRSLSQEGASVEIMGYK
DFKYCWENFVYNDDEPFKPWKGLKYNFLFLDSKLQEILE (配列番号134)

【0194】

ヒトAPOBEC-1

MTSEKGPSTGDPTLRRRIEPWEFDVFYDPRELRKEACLLYEIKWGMSRKIWRSSGKN
TTNHVEVNFIIKFTSERDFHPSMCSITWFLSWSPCWECQAIREFLSRHPGVTLVI
YVARLFWHMDQQNRQGLRDLVNSGVTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPPGDEAHWP
QYPPLWMMLYALELHCILSLPPCLKISRRWQNHLTFFRLHLQNCHYQTIPPHILLA
TGLIHPSVAWR (配列番号292)

10

20

30

40

50

【0195】

マウスAPOBEC-1

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPREL RKETCLLYEINWGGRRHSVWRHTSQN
TSNHVEVNFLEKFTTERYFRPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRHPYVTLFIY
IARLYHHTDQQRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQEYCYCWRNFVNYPSPNEAYWPRYP
HLWVKLYVLELYCIILGLPPCLKILRRKQPQLTFFTITLQTCHYQRIPPHLLWATGLK
(配列番号293)

【0196】

ラットAPOBEC-1(rAPOBEC1)

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPREL RKETCLLYEINWGGRRHSIWRHTSQN
TNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYI
ARLYHHADPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPPSNEAHWPRYPH
LWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLK(
配列番号294)

【0197】

Petromyzon marinus CDA1(pmCDA1)

MTDAEYVRIHEKLDIYTFKKQFFNNKKS VSHRCYVLFELKRRGERRACFWGYAVNK
PQSGTERGIHAEIFSIRKVEEYLRDNPQGFTINWYSSWSPCADCAEKILEWYNQELR
GNGHTLKIWACKLYYEKNARNQIGLWNLRDNGVGLNVMVSEHYQCCRKIFIQSSHN
QLNENRWLEKTLKRAEKRRSELSIMI QVKILHTTKSPAV(配列番号295)

【0198】

進化したpmCDA1(evoCDA1)

MTDAEYVRIHEKLDIYTFKKQFSNNKKS VSHRCYVLFELKRRGERRACFWGYAVNK
PQSGTERGIHAEIFSIRKVEEYLRDNPQGFTINWYSSWSPCADCAEKILEWYNQELR
GNGHTLKIWVCKLYYEKNARNQIGLWNLRDNGVGLNVMVSEHYQCCRKIFIQSSHN
QLNENRWLEKTLKRAEKRRSELSIMFQVKILHTTKSPAV(配列番号487)

【0199】

アデノシンデアミナーゼドメイン

本開示は、DNA上のデオキシアデノシンヌクレオシドに対する活性を有するアデノシンデアミナーゼバリエントを提供する。従って、本明細書において提供されるバリエントは、デオキシアデノシンデアミナーゼである。いくつかの態様において、開示されるアデノシンデアミナーゼは、野生型ecTadA(配列番号325)と比較して以下の突然変異を含む、知られているアデノシンデアミナーゼTadA7.10のバリエントである:W23R、H36L、P48A、R51L、L84F、A106V、D108N、H123Y、S146C、D147Y、R152P、E155V、I156F、およびK157N。いくつかの態様において、開示されるアデノシンデアミナーゼは、E. coli以外の種、たとえばStaphylococcus aureus、Salmonella typhi、Shewanella putrefaciens、Haemophilus influenzae、Caulobacter crescentus、またはBacillus subtilisに由来するTadAのバリエントである。

【0200】

いくつかの態様において、開示されるアデノシンデアミナーゼドメインは、E. coli TadA 7.10のバリエントTadA-8eを含む。TadA-8e(配列番号433として提出される)はTadA7.10(配列番号315)に対して相対的に以下の置換を含有する:T111、D119、F149、R26、V88、A109、H122、T166、およびD167。TadA-8eは、2021年8月12日公開のPCT公開No. WO 2021/158921において開示されている。これは参照によって本明細書に組み込まれる。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼドメインはTadA-8e(V106W)を含む。これはTadA-8eに対して相対的にV106W置換を含有する。

【0201】

種々の態様において、開示されるアデノシンデアミナーゼは、問題の核酸上の標的化されたアデノシンを加水分解的にイノシンに脱アミノ化し、これはDNAポリメラーゼ酵素

10

20

30

40

50

によってグアノシン(G)として読まれる。

【0202】

これらのバリエーションは、開示される塩基エディタのいずれかのドメイン(すなわち、アデニン塩基エディタのアデノシンデアミナーゼドメイン)を含み得る。いくつかの態様において、開示されるアデニン塩基エディタのいずれかは、核酸配列(例としてDNAまたはRNA)上のアデノシンを脱アミノ化することができる。開示されるアデニン塩基エディタはさらにDNA上のアデニンを脱アミノ化することができる。

【0203】

アデノシンデアミナーゼの例示的な非限定的な態様が本明細書において提供される。いくつかの態様において、開示される塩基エディタのいずれかのアデノシンデアミナーゼドメインは、単一のアデノシンデアミナーゼまたは単量体を含む。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼドメインは、2、3、4または5つのアデノシンデアミナーゼを含む。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼドメインは、2つのアデノシンデアミナーゼまたは二量体を含む。いくつかの態様において、デアミナーゼドメインは、操作された(または進化した)デアミナーゼおよび野生型デアミナーゼ、たとえば野生型 *E. coli* 由来デアミナーゼの二量体を含む。本明細書において提供される突然変異(例として *ecTadA* 上の突然変異)は、他のアデニン塩基エディタ、例えば、2018年8月2日公開の国際公開第2018/027078号;2019年4月25日の国際公開第2019/079347号;2019年11月28日に国際公開第2019/226593号として公開された2019年5月23日出願の国際出願第PCT/US2019/033848号明細書;2018年10月30日に米国特許第10,113,163号明細書として発行した2018年3月15日公開の米国特許出願公開第2018/0073012号明細書;2019年1月1日に米国特許第10,167,457号明細書として発行した2017年5月4日公開の米国特許出願公開第2017/0121693号明細書;2017年4月27日公開の国際公開第2017/070633号;2015年6月18日公開の米国特許出願公開第2015/0166980号明細書;2017年12月12日発行の米国特許第9,840,699号明細書;および2018年9月18日発行の米国特許第10,077,453号明細書;2020年4月16日出願のPCT出願第PCT/US2020/28568号明細書、および2021年8月12日公開の国際公開第2021/158921号において提供されるものにおいて、アデノシンデアミナーゼに適用され得るということが了解されるべきである。これらの全てはそれらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0204】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるアデノシンデアミナーゼのいずれかは、アデニンを脱アミノ化すること、例として、DNAのデオキシアデノシンヌクレオシド上のアデニンを脱アミノ化することができる。アデノシンデアミナーゼはいずれかの好適な生物(例として *E. coli*)に由来し得る。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、本明細書において提供される突然変異(例として *ecTadA* 上の突然変異)のいずれかに対応する1以上の突然変異を包含する天然に存在するアデノシンデアミナーゼである。当業者は、当該技術分野において十分に知られている方法によって、例として配列アラインメントおよび相同残基の決定によって、いずれかの相同タンパク質上のおよび夫々のコード核酸上の対応する残基を同定することができるであろう。 *Bacillus subtilis* (配列番号318として完全に提出される)、 *S. aureus* (配列番号317)、および *S. pyogenes* (配列番号448)に由来する例示的な *TadA* デアミナーゼが提供される。 *E. coli TadA-8e* のアミノ酸置換、ならびに *B. subtilis*、 *S. aureus*、および *S. pyogenes TadA* デアミナーゼ上の相同な突然変異が示される。従って、当業者は、本明細書に記載される突然変異のいずれか、例として *ecTadA* 上に同定される突然変異のいずれかに対応する(例として *ecTadA* に対する相同性を有する)いずれかの天然に存在するアデノシンデアミナーゼ上の突然変異を生成することができるであろう。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは原核生物に由来する。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは細菌からである。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、 *Escherichia coli*、 *Staphylococcus aureus*、 *Salmonella typhi*、 *Shewanella putr*

efaciens、Haemophilus influenzae、Caulobacter crescentus、またはBacillus subtilisからである。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼはE. coliからである。

【0205】

いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼはTadA9またはそのバリエーションを含む。TadA9は、TadA-8eに対して相対的にV82SおよびQ154R置換を含有する。(言い換えると、TadA9はTadA7.10に対して相対的にY147R、Q154R、およびI76Y突然変異を含有する。)いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、TadA9(配列番号33)のアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。TadA9は当該技術分野においてはTadA*8.9と言われ得る。TadA9デアミナーゼを含有するABEは本明細書においてABE9と言われる。TadA9は、Gaudelli et al., Nat Biotechnol. 2020 Jul;38(7):892-900および2021年3月18日公開の国際公開第2021/050571号に追加の詳細が記載されている。これらの各々は参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【0206】

いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼはTadA20またはそのバリエーションを含む。TadA20は、TadA7.10に対して相対的にI76Y、V82S、Y123H、Y147R、およびQ154R置換を含有する。TadA20は、Gaudelli et al., Nat Biotechnol. 2020 Jul;38(7):892-900および2021年3月18日公開のWO 2021/050571に追加の詳細が記載されている。TadA20は当該技術分野においてはTadA*8.20と言われ得る。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、TadA20(配列番号326)のアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。TadA20デアミナーゼを含有するABEは、本明細書においてABE20と言われる。それは、当該技術分野においては、ABE8.20、ABE8.20-d、またはABE8.20-mと言われ得る。

20

【0207】

いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼは、配列番号33、315、317~326、433、または448~449のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【0208】

本明細書において提供されるアデノシンデアミナーゼは1以上の突然変異(例として、本明細書において提供される突然変異のいずれか)を包含し得るということが了解されるべきである。本開示は、ある特定のパーセント同一性プラス本明細書に記載される突然変異またはそれらの組み合わせのいずれかを有するアデノシンデアミナーゼを提供する。本明細書に記載されるアデノシンデアミナーゼのいずれかは、本明細書に記載される他のアデノシンデアミナーゼのいずれか、例として、配列番号33、315、317~326、433、または448~449のアデノシンデアミナーゼのいずれかのランケーションされたバリエーションであり得る。

40

【0209】

例示的なランケーションされたアデノシンデアミナーゼは、N末端から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または15よりも多くのアミノ酸のランケーションを含み得る。他の例示的なランケーションされたアデノシンデアミナーゼは、C末端から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または15よりも多くのアミノ酸のランケーションを含み得る。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼドメインは、配列番号324で提出される野生型ecTadAのランケーションされたバージョンを含む。本明細書に記載されるアデノシンデアミナーゼのいずれかは、N末端メチオニン(M)アミノ酸残基を包含し得る。

50

【0210】

本明細書において提供される突然変異(例として、配列番号315のecTadAアミノ酸配列に基づく)のいずれかは、他のアデノシンデアミナーゼ、たとえば*S. aureus* TadA(*saTadA*)、*A. aeolicus* TadA(*AaTadA*)、または別のアデノシンデアミナーゼ(例として、別の細菌アデノシンデアミナーゼ)、たとえば下で提供される配列に導入され得ることが了解されるべきである。ecTadA上の突然変異した残基と相同である他のアデノシンデアミナーゼからのアミノ酸残基をいかに同定するかは、当業者には明らかであろう。それゆえに、ecTadA上の同定された突然変異のいずれかは、相同なアミノ酸残基を有する他のアデノシンデアミナーゼ上に作られ得る。本明細書において提供される突然変異のいずれかは、個々にまたはいずれかの組み合わせでecTadAまたは別のアデノシンデアミナーゼ上に作られ得る。本明細書において提供される突然変異したデアミナーゼのいずれかは、アデニン塩基エディタの文脈において使用され得る。本明細書において提供されるデアミナーゼのいずれかは、下の配列において示される第1のアミノ酸の前のメチオニン(「M」)で始まる配列を有し得る。

10

【0211】

本開示の例示的なアデノシンデアミナーゼバリエーションが下に記載される。ある特定の態様において、アデノシンデアミナーゼドメインは、以下の1つに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%の配列同一性を有する配列を有するアデノシンデアミナーゼを含む。

20

【0212】

TadA 7.10(*E. coli*)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAH
AEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGA
AGSLMDVLHYPGMNHRVEITEGILADECAALLCYFFRMPRQVFNAQKKAQSSTD(配
列番号315)

【0213】

TadA-8e(*E. coli*)

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAH
AEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRG
AGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSIN(配
列番号433)

30

【0214】

TadA9

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEGEVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLYDPTAH
AEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRG
AGSLMNVLNYPGMDHRVEITEGILANECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSIN(配
列番号33)

【0215】

TadA20

SEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAIGLHDPTAH
AEIMALRQGGLVMQNYRLYDATLYSTTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGA
AGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLCRFFRMPRRVFNAQKKAQSSTD(配
列番号326)

40

【0216】

Staphylococcus aureus TadA:

MGSHMTNDIYFMTLAIIEAKKAAQLGEVPIGAIITKDDEVIARAHNLRETLLQQPTAH
AEHIAIERAAKVLGSRLEGCTLYVTLEPCVMCAGTIVMSRIPRVVYGADDPKGGCS
GSLMNLLQQSNNHRAIVDKGVLKEACSTLLTTFKNNLRANKKSTN(配列番号317)

【0217】

50

Bacillus subtilis TadA:

MTQDELYMKEAIKEAKKAEKGEVPIGAVLVINGEIIARAHNLRETEQRSIAHAEM L
VIDEACKALGTWRLEGATLYVTLEPCPMCAGAVVLSRVEKVVFGAFDPKGGCSGTL
MNLLQEERFNHQAEVVSGVLEEECGGMLSAFFRELRRKKKKAARKNLSE (配列番号318)

【0218】

Salmonella typhimurium(*S. typhimurium*)TadA:

MPPAFITGVTSLSDVELDHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNHRVIGEG
WNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGLVLQNYRLLDTTLYVTLEPCVMCAGAMVHSRIG
RVVFGARDAKTGAAGSLIDVLHHPGMNHRVEIIEGVLRDECATLLSDFFRMRRQEIK
ALKKADRAEGAGPAV (配列番号319)

【0219】

Shewanella putrefaciens(*S. putrefaciens*)TadA:

MDEYWMQVAMQMAEKAEAAAGEVPVGAVLVKDGQGIATGYNLSISQHDPTAHAEIL
CLRSAGKKLENYRLLDATLYITLEPCAMCAGAMVHSRIARVVYGARDEKTGAAGTV
VNLLQHAPFNHQVEVTSGVLAEACSAQLSRFFKRRRDEKKALKLAQRAQQGIE (配列
番号320)

【0220】

Haemophilus influenzae F3031(*H. influenzae*)TadA:

MDAAKVRSEFDEKMMRYALELADKAEALGEIPVGAVLVDDARNIIGEGWNLSIVQS
DPTAHAEIIALRNGAKNIQNYRLLNSTLYVTLEPCTMCAGAILHSRIKRLVFGASDYK
TGAIGSRFHFFDDYKMNHTLEITSGVLAEEC SQKLSTFFQKRREEKKIEKALLKSLSD
K (配列番号321)

【0221】

Caulobacter crescentus(*C. crescentus*)TadA:

MRTDESEDQDHRMMRLALDAARAAAEAGETPVGAVILDPSTGEVIATAGNGPIAAH
DPTAHAEIAAMRAAAAKLGNYRLTDLTLVVTLEPCAMCAGAISHARIGRVVFGADD
PKGGAVVHGPKFFAQPTCHWRPEVTGGVLADESADLLRGFFRARRKAKI (配列番号322)

【0222】

Geobacter sulfurreducens(*G. sulfurreducens*)TadA:

MSSLKKTPIRDDAYWMGKAIREAAKAAARDEVPIGAVIVRDGAVIGRGHNLREGSND
PSAHAEMIAIRQAARRSANWRLTGATLYVTLEPCLMCMGAILARLERVVFGCYDPK
GAAGSLYDLSADPRLNHQVRLSPGVCQEECGTMLSDFFRDLRRRKAKATPALFIDE
RKVPPEP (配列番号323)

【0223】

Streptococcus pyogenes(*S. pyogenes*)TadA

MPYSLEEQT YFMQEALKEAEKSLQKAEIPIGCVIVKDGEEIIGRGHNAREESNQAIMHA
EIMAINANAHEGNWRLD TTFLVTIEPCVMCSGAIGLARIPHVIYGASNQKFGGAD
SLYQILTDERLNHRVQVERGLLAADCANIMQTFFRQGRERKKIAKHLIKEQSDPFD (配列
番号448)

【0224】

Aquifex aeolicus(*A. aeolicus*)TadA

MGKEYFLKVALREAKRAFEKGEVPVGAIIVKEGEIISKAHNSVEELKDPTAHAEMLAI
KEACRRLNTKYLEGCELYVTLEPCIMCSYALVLSRIEKVIFSALDKKHGGVVS VFNIL
DEPTLNHRVKWEYYPLEESELLSEFFKKLRNNII (配列番号449)

【0225】

いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼドメインは、N末端トランケーションされた*E. coli* TadAを含む。ある特定の態様において、アデノシンデアミナーゼは次のアミノ酸配列を含む:

10

20

30

40

50

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPT
AHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEIKAKKAQSSTD
(配列番号324)。

【0226】

いくつかの態様において、TadAデアミナーゼは全長E. coli TadAデアミナーゼ(ecTadA)である。例えば、ある特定の態様において、アデノシンデアミナーゼドメインは次のアミノ酸配列を含むデアミナーゼを含む:

MRRAFITGVFFLSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGAVLVHNNRVIGEG
WNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIG
RVVFGARDAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLSDFFRMRRQEI
KAKKAQSSTD(配列番号325)

10

【0227】

いくつかの態様において、塩基エディタはアデノシンデアミナーゼ単量体を含む。他の側面において、塩基エディタはアデノシンデアミナーゼ二量体を含む。塩基エディタは、第1のアデノシンデアミナーゼおよび第2のアデノシンデアミナーゼのヘテロ二量体を含み得る。いくつかの態様において、第1のアデノシンデアミナーゼは、塩基エディタ上において第2のアデノシンデアミナーゼのN末端にある。いくつかの態様において、第1のアデノシンデアミナーゼは、塩基エディタ上において第2のアデノシンデアミナーゼのC末端にある。いくつかの態様において、第1のアデノシンデアミナーゼおよび第2のデアミナーゼは、互いに直接的にまたはリンカーを介して融合される。いくつかの態様において、第1のアデノシンデアミナーゼはリンカーを介してnapDNAbpのN末端で融合され、第2のデアミナーゼはリンカーを介してnapDNAbpドメインのC末端で融合される。他の態様において、第2のアデノシンデアミナーゼはリンカーを介してnapDNAbpドメインのN末端で融合され、第1のデアミナーゼはリンカーを介してnapDNAbpのC末端で融合される。

20

【0228】

例示的な塩基エディタ アデニン塩基エディタ

いくつかの側面において、本開示の塩基編集方法はアデニン塩基エディタの使用を含む。本開示の例示的なアデニン塩基エディタは、以下のエディタの単量体および二量体バージョンを含む:Sauri-ABE8e、SaKKH-ABE8e、SaABE8e、CjCas9-ABE8eおよびNme2Cas9-ABE8e;SaKKH-ABE8e(V106W)、SauriCas9-ABE8e(V106W)、CjCas9-ABE8e(V106W)、Nme2Cas9-ABE8e(V106W)、およびSaCas9-ABE8e(V106W);SaKKH-ABE9、SauriCas9-ABE9、CjCas9-ABE9、Nme2Cas9-ABE9、およびSaCas9-ABE9;SaKKH-ABE20、SauriCas9-ABE20、CjCas9-ABE20、Nme2Cas9-ABE20、およびSaCas9-ABE20;ならびにSaKKH-ABE7.10、SauriCas9-ABE7.10、CjCas9-ABE7.10、Nme2Cas9-ABE7.10、およびSaCas9-ABE7.10。いくつかの態様において、ABEはSauri-ABE8e、SaKKH-ABE8e、またはSaABE8eである。これらの塩基エディタは、長さが夫々1298、1291、および1291アミノ酸である。追加の塩基エディタは、長さが1221アミノ酸(CjABE8e)および1319アミノ酸(Nme2ABE8e)である。例示的な態様において、ABEはSaKKH-ABE8eである。例示的なABEは、TadA8eを含むアデノシンデアミナーゼドメインを含有し、第2のアデノシンデアミナーゼを含まない(すなわち、アデノシンデアミナーゼドメインはデアミナーゼ単量体からなる)。

30

40

【0229】

追加の例示的なアデニン塩基エディタは、2020年3月12日公開の国際公開第2020/051360号;国際公開第2021/050571号;2020年8月20日公開の国際公開第2020/168132号;および2021年8月12日公開の国際公開第2021/158921号において開示されている。これらの各々は参照によって本明細書に組み込まれる。

50

【0230】

ABE8eは当該技術分野においては「ABE8」または「ABE8.0」と言われ得る。ABE8e塩基エディタおよびそのバリエーションは、*TadA-8e*アデノシンデアミナーゼ単量体(単量体形態)または*TadA-8e*アデノシンデアミナーゼホモ二量体もしくはヘテロ二量体(二量体形態)を含有するアデノシンデアミナーゼドメインを含み得る。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼドメインおよび*napDNABp*を含む塩基エディタのアーキテクチャは以下のとおりである: NH_2 -[アデノシンデアミナーゼ]-[*napDNABp*ドメイン]- COOH ;または NH_2 -[*napDNABp*ドメイン]-[アデノシンデアミナーゼ]- COOH 。ある特定の態様において、塩基エディタは、 NH_2 -[NLS]-[アデノシンデアミナーゼ]-[*napDNABp*ドメイン]-[NLS]- COOH を含むABE8e単量体アーキテクチャを含み、ここで「NLS」は核局在配列である。

10

【0231】

いくつかの側面において、本開示は、アデニン塩基エディタとガイドRNAとの複合体を提供する。例示的な開示される複合体は、以下のABEのいずれかをガイドRNA(たとえばシングルガイドRNA)と共に含む:*Sauri-ABE8e*、*SaKKH-ABE8e*、*SaABE8e*、*CjCas9-ABE8e*および*Nme2Cas9-ABE8e*; *SaKKH-ABE8e(V106W)*、*SauriCas9-ABE8e(V106W)*、*CjCas9-ABE8e(V106W)*、*Nme2Cas9-ABE8e(V106W)*、および*SaCas9-ABE8e(V106W)*; *SaKKH-ABE9*、*SauriCas9-ABE9*、*CjCas9-ABE9*、*Nme2Cas9-ABE9*、および*SaCas9-ABE9*; *SaKKH-ABE20*、*SauriCas9-ABE20*、*CjCas9-ABE20*、*Nme2Cas9-ABE20*、および*SaCas9-ABE20*; ならびに *SaKKH-ABE7.10*、*SauriCas9-ABE7.10*、*CjCas9-ABE7.10*、*Nme2Cas9-ABE7.10*、および*SaCas9-ABE7.10*。他のABEが、開示される複合体に従ってA核酸塩基を脱アミノ化するために使用され得る。

20

【0232】

いくつかの態様において、ABEは*CjCas9-ABE8e*である。アデニン編集評価の間に、このエディタは標的アデニン塩基の5'のヌクレオチド位置においてピリミジンに対するより高い文脈選好性を見せた(YA>>RA)。本明細書に使用されるとき「選好性」および「文脈選好性」は、標的アデノシンについて40%よりも上の産物純度を言う。従って、いくつかの側面において、本開示は、ピリミジン(「Y」)文脈選好性を有するABEを提供し、ここで、「文脈」は、編集されるべきアデニン塩基(または標的アデニン塩基)の直ちに5'のピリミジンまたはプリン(「R」)の存在を言う。たとえば*CjABE8e*エディタおよびそれらのバリエーションである。これらのABEは、5'-YAN-3'の標的核酸配列上のアデノシンを編集することに対して選好性を有し得、ここで、YはCまたはTであり; NはA、T、C、G、またはUであり; Aは標的アデノシンである。従って、いくつかの態様において、5'-YAN-3'の標的核酸配列上のアデノシンを脱アミノ化することに対して文脈選好性を有するABEが提供され、ここで、YはCまたはTであり、Nは、A、T、C、G、またはUであり; Aは、標的アデノシンである。

30

【0233】

例示的なAAVにコードされるアデニン塩基エディタ構築物が図2Aに示されている。この構築物は、EFSプロモータおよびbGHポリA配列によって作動可能に制御される*SaABE8e*塩基エディタを含有する。それは、3'末端とは反対側を指し示す矢印によって指示されるとおり、逆向きにコードされるガイドRNAをもまた含有する。

40

【0234】

開示されるABEの複合体は、標的配列を含む核酸分子と接触させられた後に50%よりも多くのオンターゲット編集効率を所有し得る。さらなる例示的なABE複合体は、標的配列を含む核酸分子と接触させられた後に60%よりも多くのオンターゲット編集効率を所有する。さらなる例示的なABEは、標的配列を含む核酸分子と接触させられた後に、65%よりも多く、70%よりも多く、75%よりも多く、80%よりも多く、82.5%よりも多く、または85%よりも多くのオンターゲット編集効率を所有する。開示されるABE複合体は、標的配列を含有する核酸分子と接触させられた後に、2.5%未満、2.4%未満、

50

2.2%未満、2.0%未満、1.75%未満、1.5%未満、1.3%未満、1.1%未満、または1.0%未満のインデル頻度を見せ得る。

【0235】

いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載されるとおりnapDNABpドメインおよびアデノシンデアミナーゼドメインを含む塩基エディタを提供する。Cas9ドメインは、本明細書において提供されるCas9ドメインまたはCas9タンパク質のいずれか(例として、Cas9ニッカーゼまたはnCas9)であり得る。いくつかの態様において、本明細書において提供されるCas9ドメインまたはCas9タンパク質のいずれか(例としてnCas9)は、本明細書において提供されるアデノシンデアミナーゼドメインのいずれかと融合され得る。

10

【0236】

いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼおよびnapDNABp(例としてCas9ドメイン)を含む塩基エディタは、リンカー配列を包含しない。いくつかの態様において、リンカーは、アデノシンデアミナーゼドメインおよび／またはアデノシンデアミナーゼとnapDNABpとの間に存在する。いくつかの態様において、上の一般的なアーキテクチャにおいて使用される「]-[」は任意のリンカーの存在を指示する。いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼドメインおよびnapDNABpドメインは、本明細書において提供されるリンカーのいずれかを介して融合される。例えば、いくつかの態様において、アデノシンデアミナーゼドメイン(これは1以上のアデノシンデアミナーゼを包含し得る)およびnapDNABpは、下で「リンカー」と題する項において提供されるリンカーのいずれかを介して融合される。

20

【0237】

いくつかの態様において、アデニン塩基エディタは、含むアデノシンデアミナーゼを含み、配列番号433(TadA-8e)に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%、または99.5%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの態様において、アデニン塩基エディタは配列番号433の配列を含む。

【0238】

いくつかの態様において、本開示のアデニン塩基エディタは配列番号181の配列を含む。いくつかの態様において、本開示のアデニン塩基エディタは配列番号182の配列を含む。他の態様において、本開示のアデニン塩基エディタは配列番号183の配列を含む。他の態様において、本開示のアデニン塩基エディタは配列番号171または172の配列を含む。

30

【0239】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるアデニン塩基エディタのいずれかは、配列番号171~172および181~183のいずれかのアミノ酸配列に対して相対的に異なる1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、または30よりも多くのアミノ酸を有するアミノ酸配列を含み得る。これらの違いは、参照配列に対して相対的に挿入、欠失、または置換されたアミノ酸を含み得る。いくつかの態様において、開示されるアデノシンデアミナーゼドメインは、配列番号171~172および181~183のどちらかと共通の約50、約75、約100、約125、約150、約175、約200、約300、約400、約500、または500よりも多くの連続したアミノ酸のストレッチを含有する。

40

【0240】

例示的な塩基エディタは、以下のアミノ酸配列(配列番号171~172および181~183)のいずれかと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一である配列を含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは、以下のアミノ酸配列のいずれかを含有する配列を有する:

【0241】

50

【化 2】

SaABE8e:NLS、リンカー、TadA-8e、SaCas9

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAI
GLHDPTAHAEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAAGS
LMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGSSGGSSGSETPGT
SESATPESSGGSSGSGSGKRNYYLGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA
RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNV
NEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKA
YHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEPSFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYN
ALNDLNNLVITRDENEKLEYEYKFQIIEENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLK
VYHDIKDITARKEIENAEELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKA
ILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPN
DIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPL
EDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLA
KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFT
SFLRRKWKFKKERNKGYKHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQE
YKEIFITPHQIKHIKDFDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKL
INKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYQDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYGNKLN
AHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYPYFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKLKKIS
NQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKK
YSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGSGGSKRTADGSEFEPKKKKRKV (配列番号171)

10

【0 2 4 2】

【化 3】

SaKKH-ABE8e:NLS、リンカー、TadA-8e、SaKKH

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVIGEGWNRAI
GLHDPTAHAEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAAGS
LMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGSSGGSSGSETPGT
SESATPESSGGSSGSGSGKRNYYLGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA
RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNV
NEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKA
YHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEPSFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYN
ALNDLNNLVITRDENEKLEYEYKFQIIEENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLK
VYHDIKDITARKEIENAEELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKA
ILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPN
DIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPL
EDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLA
KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFT
SFLRRKWKFKKERNKGYKHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQE
YKEIFITPHQIKHIKDFDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKL
INKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYQDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYGNKLN
AHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYPYFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKLKKIS
NQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVMIDITYREYLENMNDKRPPHIKTIASKTQSIKK
YSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGSGGSKRTADGSEFEPKKKKRKV (配列番号181)

30

【0 2 4 3】

40

【化 4】

SauriABE8e:NLS、リンカー、TadA-8e、SauriCas9
 MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVNNRVIGEGWNRAL
 GLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAAGS
 LMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGT
 SESATPESSGGSSGGSQENQQKQNYILGLAIGITSVGYGLIDSKTREVIDAGVRLFPEADSENNSNRR
 SKRGARRLKRRIHRLNRVKDLLADYQ MIDLNNVPKSTDPYTIRVKGLREPLTKEEFAIALLHIAKRRG
 LHNISVSMGDEEQDNELSTKQQLQKNAQQLQDKYVCELQLERLTNINKVRGEKNRFTEDFVKEVKQ
 LCETQRQYHNIDDQFIQYIDLVSSTRREYFEGPGNGSPYGWDGDLWKWYEKLMGRCTYFPEELRSVK
 YAYSADLFNALNDLNNLVVTRDDNPKLEYEYKYHIIENVFKQKKNPTLKQIAKEIGVQDYDIRGYRITKS
 GKPQFTSFKLYHDLKNIFEQAKYLEDVEMLEIAKILTIYQDEISIKKALDQLPELLTESEKSQIAQLTGY
 TGTHRLSLKCIHIVIDELWESPENQMEIFTRLNLKPKKVEMSEIDSIPTTLVDEFILSPVVKRAFIQSIVKI
 NAVINRFLPEDIIIELAREKNSKDRRKFINLQKQNEATRKKIEQLLAKYGNTNAKYMIEKIKLHDMQE
 GKCLYSLEAIPLEDLLSNPTHYEVDDHIIPRSVSFDNSLNNKVLVKQSENSKKGNRTPYQYLSNESKIS
 YNQFKQHILNLSKAKDRISKKKRDMLLEERDINKFEVQKEFINRNLVDTRYATRELSNLLKTYFSTHDY
 AVKVKTINGGFTNHLRKVWDFKKHRNHGYKHAEDALVIANADFLFKTHKALRRTDKILEQPGLEVND
 TTVKVDTEEKYQELFETPKQVKNIKQFRDFKYSHRVDKKPNRQLINDTLYSTREIDGETYVVQTLKDL
 YAKDNEKVKKLFTERPQKILMYQHDPKTFEKLMTILNQYAEAKNPLAAYYEDKGEYVTKYAKKGNGP
 AIHKIKYIDKKLGSYLDVSNKYPETQNKLVKLSLKSFRFDIYKCEQGYKMVSIGYLDVLKKDNYIYIPKD
 KYEAEKQKKKIKESDLFVGSFYNDLIMYEDELFRVIGVNSDINNVLNLMVDITYKDFCEVNNVTGEK
 RIKKTIGKRVVLIEKYTTDILGNLYKTPLPKPKQLIFKRGELSGGSKRTADGSEFEPKKRKV (配列番
 号172)

10

【0 2 4 4】

20

【化 5 - 1】

CjABE8e:NLS、リンカー、TadA-8e、CjCas9
 MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVNNRVIGEGWNRAL
 GLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAAGS
 LMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGT
 SESATPESSGGSSGGSARILAFAGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLARSA

【化 5 - 2】

RKRLARRKARLNHLKHLIANEFKLNIEDYQSFDES LAKAYKGLISPYELRFRALNELLSSKQDFARVIL
 HIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYSVGEYLYKEYFQKFKEKSKEFTNVRNKKESYE
 RCIAQSFLKDELKLIFFKQREFGFSFSKKEEEVLSVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPL
 AFMFVALTRIINLLNNLKNTEGILYTKDDLNALLNEVLKNGTLTYKQTKLLGLSDDYEFKGEKGTIFYIE
 FKKYKEFIKALGEHNLSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQIDSLSKLEFKDHLNISFKALK
 LVTPLMLEGKKYDEACNELNLKVAINEDKKDFLPAFNETYYKDEVTNPVVLRAIKEYRKVLNALLKKY
 GKVHKINIELAREVGKNHSQRAKIEKEQNENYKAKKDAELECEKLGKINSKNILKRLFKKEQKEFCAYS
 GEKIKISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSFDDSYMKNVLVFTKQNKQELNQTPFEAFGNDSAKWQKIEVLAK
 NLPTKKQKRILDKNYKDKEQKNFKDRNLNDTRYIARLVNLYTKDYLDLPLSDDENTKLNDTQKGSKV
 HVEAKSGMLTSALRHTWGFSAKDRNNHLHHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISE
 LDYKNKRKFFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFYQSYGGKEGVLKALEL
 GKIRKVNGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFALKVLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYE
 FCFSLYKDSLILIQTKDMQEPEFVYNAFTSSTVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGI
 QNLKVFEKYIVSALGEVTKAEFRQREDFKSGGSKRTADGSEFEPKKRKV (配列番号182)

30

40

【0 2 4 5】

50

【化 6】

Nme2ABE8e:NLS、リンカー、TadA-8e、Nme2Cas9

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALLAKRARDEREVPVGAVLVNLRVIGEGWNRAI
GLHDPTAHAEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVTTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAA
LMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGT
SESATPESSGGSSGSSAAFKPNPINYILGLAIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVVRFERAEVPTG
DSLAMARRLARSVRRLTRRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKL
TPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFES
GHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAEILLLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLG
HCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTCLNNLRILEQQSERPLTDTERATLMDEPYRKSCLTYAQARKLL
GLEDTAFFKGLRYGKDNAAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTD
EDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKI
YLPPIPADEIRNPVVLRLALSQARKVINGVVRYYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDRE
KAAAKFREYFPNFVGEPSKSKDILKRLYEQQHKGCLYSGKEINLVRNEKGYVEIDHALPFSRTWDDS
FNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDDGFKECN
LNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHALLDAVVVACS
TVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEA
DTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSKRFRVKNHNEKISVKRVWLT
EIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKGGQLVKAVEREKTQESG
VLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCSL
HKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAHWDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRP
CRLKKRPPVRSRSGSKRTADGSEFESPKKKRKV (配列番号183)

10

20

【0246】

シトシン塩基エディタ

いくつかの側面において、本開示はシトシン塩基エディタ(CBE)を提供する。これらのCBEの例は、CjCas9-BE3.9、CjCas9-FERNY-BE3.9、およびCjCas9-evoFERNY-BE3.9を包含する。本開示のCBEは、CjCas9-BE3.9、CjCas9-FERNY-BE3.9、およびCjCas9-evoFERNY-BE3.9のいずれかのバリエーションであり得る。

【0247】

いくつかの態様において、開示されるシトシン塩基エディタ(CBE)は、次を含む融合タンパク質を含み得る：(i)核酸プログラミングDNA結合タンパク質(napDNAbpドメイン)；(ii)シチジンデアミナーゼドメイン；および(iii)ウラシルグリコシラーゼドメイン(UGI)。種々の態様において、開示されるCBEは単一のUGIドメインを含有する。開示されるCBEは、次を包含するがこれらに限定されない種々の構成で構造的に整えられ得る：

30

NH₂-[シチジンデアミナーゼドメイン]-[napDNAbpドメイン]-[UGI]-COOH；
 NH₂-[シチジンデアミナーゼドメイン]-[UGI]-[napDNAbpドメイン]-COOH；
 NH₂-[napDNAbpドメイン]-[UGI]-[シチジンデアミナーゼドメイン]-COOH；
 NH₂-[napDNAbpドメイン]-[シチジンデアミナーゼドメイン]-[UGI]-COOH；
 NH₂-[UGI]-[シチジンデアミナーゼドメイン]-[napDNAbpドメイン]-COOH；または
 NH₂-[UGI]-[napDNAbpドメイン]-[シチジンデアミナーゼドメイン]-COOH、ここ

40

で、「」-「」の各場合は任意のリンカーを含む。

【0248】

シングルAAV-CBEをコードする例示的な構築物が図14に示されている。このCBEはBE3.9アーキテクチャを含有し、シチジンデアミナーゼドメインとしてのデアミナーゼFERNY(またはevoFERNY)がnapDNAbpドメインの5'に位置する。この構築物において、シトシン塩基エディタはCjCas9 napDNAbpドメインを含有する。ヒトU6によって制御される(「hU6」)sgRNAは、3'端に、塩基エディタに対して逆向きに位置する。この構築物は、塩基エディタを駆動するEFSプロモータ、およびSV40後期ポリA配列を含有する。構築物は5.012kbの長さを有する。指示されているところでは、「BE3.9」は、BE3.9 CBEアーキテクチャ、すなわちNH₂-[第1の核局在配列]-[シトシンデアミナーゼドメイン]-[32aaリンカー]-[napDNAbpドメイン]-[9aaリンカー]-[第1のUGIドメ

50

イン]-[第2の核局在配列]-COOHを言う。開示されるCBEは1以上の核局在シグナル(NLS)をさらに含み得る。

【0249】

追加の例示的なCBEは、2019年1月31日公開の国際公開第2019/023680号および2021年6月3日公開の国際公開第2021/108717号において開示されている。これらの各々は参照によって本明細書に組み込まれる。追加のCBEは、参照によって本明細書に組み込まれるVilliger, L. et al. *Nature Medicine* 24, 1519-1525 (2018)において開示されている。Villigerらはインティン分割*S. aureus* CBEを開発した。開示されるシングルAAV CBEは、Villigerによって示されたものに対して相対的に改善されていない場合でも同程度の活性を実証する。

10

【0250】

開示されるCBEは、改変された(または進化した)シトシンデアミナーゼドメイン、たとえば、拡張されたPAM配列を認識する、5'-GC標的を脱アミノ化する改善された効率を有する、および／またはより狭い標的ウィンドウ上で編集をなすデアミナーゼドメインを含み得る。いくつかの態様において、開示されるシチジン核酸塩基エディタは、進化した核酸プログラマブルDNA結合タンパク質(napDNAbp)、たとえば進化したCas9を含む。

【0251】

いくつかの側面において、本開示は、シトシン塩基エディタならびにガイドRNAの複合体、例として、CjCas9-BE3.9、CjCas9-FERNY-BE3.9、およびCjCas9-evoFERNY-BE3.9のいずれかならびにsgRNAの複合体を提供する。

20

【0252】

CBEの非限定的な例は配列番号19および20として下で提供され、これらはFERNY-BE3.9エディタである。これらのエディタはnapDNAbpドメインとしてSpCas9を含有する。本開示の例示的なAAVにコードされるCBEは、下で記載されるFERNY-BE3.9エディタのSpCas9ドメインの代わりにCjCas9ドメイン(配列番号379)を含有する。

【0253】

以下の塩基エディタ(配列番号19)は、参照塩基エディタとして使用され得る野生型FERNYを含有する。この塩基エディタは、配列番号20として示されるevoFERNY塩基エディタを生成するように進化した。これらの塩基エディタはbpNLSおよび単一のUGIドメインを含有する。

30

【化7-1】

FERNY-BE3.9のアミノ酸配列

MKRTADGSEFESPKKKRKVSFERNYDPRELRKETYLLEYIKWGKSGKLWRHWCQNNRTQHADEVYFLE
NIFNARRFPSTHCSITWYLSWSPCAEQSKIVDFLKEHPNVNLEIYVARLYYHEDERNRQGLRDLVN
SGVTIRIMDLPDYNYCWKTFVSDQGGDEDYWPGHFAPWIKQYSLKL SGGSSGGSSGSETPGTSESAT
PESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA
EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAY
HEKYPTIYHLRKKLVDDSTDKADLRLLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE

40

50

【化 7 - 2】

NPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS
 KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSAAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK
 ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTF
 DNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP
 WNFEVVVDKGASASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSG
 EQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN
 EDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDF
 LKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIIKGILQTVKVVDLVKV
 MGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQN
 GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTNRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQ
 LLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVK
 VITLKSCLVSDFRKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA
 KSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQV
 NIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSV
 KELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPS
 KYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRD
 KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD S
 GSGSGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSD
 APEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKRKV* (配列番号19)

10

【0254】

以下の塩基エディタは、上で提供された塩基エディタ(配列番号19)に基づいて進化し
 たevoFERNYを含有する。

20

【化 8】

evoFERNY-BE3.9のアミノ酸配列

MKRTADGSEFESPKKKRKVSFERNYDPRELKETYLLYEIKWGKSGKLWRHWCQNNRTQHAEVYFLE
 NIFNARRFNPSTHCSITWYLSWSPCAECSQKIVDFLKEHPNVNLEIYVARLYYPENERNRQGLRDLVN
 SGTVIRIMDLPDYNOCWKTFFVSDQGGDEDYWPGHFAPWIKQYSLKL SGGSSGGSSGSETPGTSESAT
 PESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA
 EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAY
 HEKYPTIYHLRKKLVSDTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE
 NPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS
 KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSAAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK
 ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTF
 DNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP
 WNFEVVVDKGASASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSG
 EQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN
 EDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDF
 LKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIIKGILQTVKVVDLVKV
 MGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQN
 GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTNRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQ
 LLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVK
 VITLKSCLVSDFRKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA
 KSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQV
 NIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSV
 KELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPS
 KYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRD
 KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD S
 GSGSGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSD
 APEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKRKV* (配列番号20)

30

40

【0255】

いくつかの態様において、開示される塩基エディタはCjCas9-FERNY-BE3.9を含み
 、これは配列番号21として下で提供される。いくつかの態様において、開示される塩基
 エディタはCjCas9-evoFERNY-BE3.9を含み、これは配列番号22として下で提供され
 る。開示される塩基エディタのいずれかは、配列番号21および22のいずれかと少なくと

50

も80%、85%、90%、92.5%、95%、97%、98%、または99%の同一性を有する配列を含み得る。塩基エディタは配列番号21または22の配列を含み得る。これらの塩基エディタはbpNLSおよび単一のUGIドメインを含有する。FERNYデアミナーゼはイタリックである。

【0256】

【化9】

CjCas9-evoFERNY-BE3.9

MKRTADGSEFESPKKKRKV *SFERNYDPRELRKETYLLYEIKWGKSGKLWRHWCQNNRTQHAENVYFLE*
NIFNARRFNPSTHCSITWYLSWSPCAECSQKIVDFLKEHPNVNLEIYVARLYYPENERNRQGLRDLVN
SGVTIRIMDLDPDYNWCWKTFFVSDQGGDEDYWPGHFAPWIKQYSLKLSGGSSGGSSGSETPGTSESAT
 PESSGGSSGGSARILAFAGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLARSARKRLA
 RRKARLNHLKHLIANEFKLNIEDYQSFDES LAKAYKGLISPYELRFRALNELL SKQDFARVILHIAKRR
 GYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYSVGEYLYKEYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYERCIAS
 FLKDELKLIFKKQREFGFSFKKFEELVSVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFV
 ALTRIINLLNNLNKNTGILYTKDDLNALLNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGTYFIEFKKYK
 EFIKALGEHNLSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQIDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTP
 MLEGKKYDEACNELNLKVAINEDKKDFLPAFNETYYKDEVTPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYGVHVKI
 NIELAREVGKNHSQRAKIEKEQENYKAKKDAELECGLKINSKNILKRLFKKEQKEFCAYSGEIKI
 SDLQDEKMLEIDHIYPYRSFDDSYMKNVLVFTKQNKQKLNQTPFEAFGNDSAKWQKIEVLAKNLPTK
 KQKRILDKNYKDKEQKNFKDRNLNDTRYIARLVNLTQDYLDLPLSDDENTKLNQTKGSKVHVEAK
 SGMLTSALRHTWGFSADKDRNNHLHHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELDYKN
 KRKFFEPFSGFRQKVLKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEFYQSYGGKEGVLKALELGKIRKV
 NGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFALKVLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYEFCSLY
 KDSLILIQTKDMQEPEFVYNAFTSSTVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKV
 EKYIVSALGEVTKAEFRQREDFKKSGSGSGSGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKP
 ESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKKRKV
 (配列番号21)

10

20

【0257】

【化10-1】

CjCas9-FERNY-BE3.9

MKRTADGSEFESPKKKRKV *SFERNYDPRELRKETYLLYEIKWGKSGKLWRHWCQNNRTQHAENVYFLE*
NIFNARRFNPSTHCSITWYLSWSPCAECSQKIVDFLKEHPNVNLEIYVARLYYHEDERNRQGLRDLVN
SGVTIRIMDLDPDYNWCWKTFFVSDQGGDEDYWPGHFAPWIKQYSLKLSGGSSGGSSGSETPGTSESAT
 PESSGGSSGGSARILAFAGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLARSARKRLA
 RRKARLNHLKHLIANEFKLNIEDYQSFDES LAKAYKGLISPYELRFRALNELL SKQDFARVILHIAKRR
 GYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYSVGEYLYKEYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYERCIAS
 FLKDELKLIFKKQREFGFSFKKFEELVSVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFV
 ALTRIINLLNNLNKNTGILYTKDDLNALLNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGTYFIEFKKYK
 EFIKALGEHNLSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQIDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTP
 MLEGKKYDEACNELNLKVAINEDKKDFLPAFNETYYKDEVTPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYGVHVKI
 NIELAREVGKNHSQRAKIEKEQENYKAKKDAELECGLKINSKNILKRLFKKEQKEFCAYSGEIKI
 SDLQDEKMLEIDHIYPYRSFDDSYMKNVLVFTKQNKQKLNQTPFEAFGNDSAKWQKIEVLAKNLPTK
 KQKRILDKNYKDKEQKNFKDRNLNDTRYIARLVNLTQDYLDLPLSDDENTKLNQTKGSKVHVEAK
 SGMLTSALRHTWGFSADKDRNNHLHHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELDYKN
 KRKFFEPFSGFRQKVLKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEFYQSYGGKEGVLKALELGKIRKV
 NGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFALKVLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYEFCSLY
 KDSLILIQTKDMQEPEFVYNAFTSSTVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKV
 EKYIVSALGEVTKAEFRQREDFKKSGSGSGSGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKP
 ESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKKRKV

30

40

【化10-2】

EKYIVSALGEVTKAEFRQREDFKKSGSGSGSGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKP
 ESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKKRKV
 (配列番号22)

【0258】

組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクター

本開示の側面は、開示される核酸分子のいずれかの送達のために組換えアデノ随伴ウイ

50

ルスベクターを使用することに関する。本開示のrAAV粒子は、ウイルスカプシドタンパク質によってカプシド化されたrAAVベクター(すなわちrAAVの組換えゲノム)を含む。2018年5月10日公開の米国特許出願公開第2018/0127780号明細書、および2020年11月26日公開の国際公開第2020/236982号を見よ。これらの各々の開示は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0259】

いくつかの態様において、AAV核酸ベクターは一本鎖である。いくつかの態様において、AAV核酸ベクターは自己相補的である。種々の態様において、本開示のrAAVベクターはいずれかのインテインを含有しない。

【0260】

いくつかの態様において、インテグレーションを容易にするウイルス配列は、逆位末端反復(ITR)配列を含む。いくつかの態様において、核酸分子は両側においてITR配列によってフランキングされる。いくつかの態様において、核酸ベクターは、さらに、ITRによってフランキングされた領域内または領域外どちらかに含有される本明細書に記載されるAAV Repタンパク質をコードする領域を含む。ITR配列はいずれかのAAV血清型(例として、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10)に由来し得るかまたは1つよりも多くの血清型に由来し得る。いくつかの態様において、ITR配列はAAV8またはAAV9に由来する。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子のいずれかをパッケージングする方法において、Repタンパク質および／またはCap(カプシド)タンパク質をコードする領域を含むヘルパープラスミドなどの核酸プラスミドが提供される。

【0261】

それゆえに、いくつかの態様において、本明細書において開示されるrAAV粒子は、rAAV2粒子、rAAV6粒子、rAAV8粒子、rPHP.B粒子、rPHP.eB粒子、もしくはrAAV9粒子、またはそのバリエーションを含む。特定の態様において、開示されるrAAV粒子はrAAV8またはrAAV9粒子である。

【0262】

本明細書において提供される例示的なrAAV粒子は、rAAV8-Sauri-ABE8e、rAAV9-Sauri-ABE8e、rAAV8-SaKKH-ABE8e、rAAV9-SaKKH-ABE8e、rAAV8-CjCas9-ABE8e、rAAV9-CjCas9-ABE8e、rAAV8-Nme2Cas9-ABE8e、またはrAAV9-Nme2Cas9-ABE8e粒子を包含するが、これらに限定されない。ある特定の態様において、rAAV粒子はrAAV8-SaKKH-ABE8e粒子を含む。いくつかの態様において、rAAV粒子はrAAV9-CjBE3.9粒子またはrAAV8-CjBE3.9粒子を含む。

【0263】

ITR配列およびITR配列を含有するプラスミドは当該技術分野において知られており、市販である(例として、Vector Biolabs, Philadelphia, PA; Cell Biolabs, San Diego, CA; Agilent Technologies, Santa Clara, Ca; および Addgene, Cambridge, MA; ならびに Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. Kessler PD, Podsakoff GM, Chen X, McQuiston SA, Colosi PC, Matelis LA, Kurtzman GJ, Byrne BJ. Proc Natl Acad Sci USA. 1996 Nov 26; 93(24):14082-7; および Curtis A. Machida. Methods in Molecular MedicineTM. Viral Vectors for Gene Therapy Methods and Protocols. 10.1385/1-59259-304-6:201 (著作権) Humana Press Inc. 2003. Chapter 10. Targeted Integration by Adeno-Associated Virus. Matthew D. Weitzman, Samuel M. Young Jr., Toni Cathomen and Richard Jude Samulski; 米国特許第5,139,941号明細書および米国特許第5,962,313号明細書から利用可能な製品およびサービスを見よ。これらの全ては参照によって本明細書に組み込まれる)。

【0264】

いくつかの態様において、本開示のrAAVベクターは、異種核酸領域の発現を制御するための1以上の調節エレメント(例として、プロモータ、転写ターミネータ、および／ま

10

20

30

40

50

たは他の調節エレメント)を含む。いくつかの態様において、第1および／または第2のヌクレオチド配列は、1以上(例として、1、2、3、4、5、またはより多く)の転写ターミネータに作動可能に連結される。本開示に従って使用され得る転写ターミネータの非限定的な例は、ウシ成長ホルモン遺伝子(bGH)、ヒト成長ホルモン遺伝子(hGH)、SV40、CW3、Φ、またはそれらの組み合わせの転写ターミネータ(またはポリアデニル化シグナル)を包含する。例示的な態様において、転写ターミネータはSV40ポリアデニル化シグナルである。例示的な態様において、転写ターミネータは、WPREエレメントなどの転写後応答エレメントを含有しない。

【0265】

いくつかの側面において、本明細書においては、開示されるrAAV粒子のいずれかを作る(または製造するもしくはパッケージングする)方法が提供される。rAAV粒子は、当該技術分野で知られているいずれかの方法に従って製造され得る。パッケージングの方法は当該技術分野において知られており、試薬は市販である(例として、Zolotukhin et al. *Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors*. *Methods* 28 (2002) 158-167;ならびに米国特許出願公開第2007-0015238号明細書および米国特許出願公開第2012-0322861号明細書を見よ。これらは参照によって本明細書に組み込まれる;ならびにATCCおよびCell Biolabs, Inc.から利用可能なプラスミドおよびキット)。例えば、問題の遺伝子を含むプラスミドが、例として、rep遺伝子(例として、Rep78、Rep68、Rep52、およびRep40をコードする)およびcap遺伝子(本明細書に記載されるとおり改変されたVP2領域を包含するVP1、VP2、およびVP3をコードする)を含有する1以上のヘルパープラスミドと組み合わせられ、rAAV粒子がパッケージングおよび続いて精製され得るようにして組換え細胞にトランスフェクションされ得る。

【0266】

宿主細胞に感染することができるウイルス粒子を形成するためには、パッケージング細胞(または宿主細胞)が典型的に使用される。かかる細胞は、アデノウイルスをパッケージングする293細胞およびレトロウイルスをパッケージングするψ2細胞またはPA317細胞を包含する。遺伝子治療に使用されるウイルスベクターは、通常は、核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージングする細胞株を産生することによって生成される。ベクターは、典型的には、パッケージングおよび続いての宿主へのインテグレーションに要求される最小限のウイルス配列を含有し、他のウイルス配列は、発現されるべきポリヌクレオチド(単数または複数)の発現カセットによって置き換えられる。欠けているウイルス機能は典型的にはパッケージング細胞株によってトランスで供給される。例えば、遺伝子治療に使用されるAAVベクターは、典型的には、パッケージングおよび宿主ゲノムへのインテグレーションに要求されるAAVゲノムからのITR配列のみを所有する。ウイルスDNAは、他のAAV遺伝子すなわちrepおよびcapをコードするがITR配列を欠如するヘルパープラスミドを含有する細胞株においてパッケージングされる。細胞株はヘルパーとしてアデノウイルスによってもまた感染させられ得る。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製およびヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ITR配列の欠如を原因として、有意な量でパッケージングされない。アデノウイルスによるコンタミネーションは、例として、アデノウイルスがAAVよりも感受性である熱処置によって低減され得る。細胞への核酸の送達のための追加の方法、たとえば、2003年5月8日公開の米国特許出願公開第2003/0087817号明細書、2016年12月22日公開の国際公開第2016/205764号、および2018年4月19日公開の国際公開第2018/071868号において開示されるものが当業者に知られている。

【0267】

種々の態様において、塩基エディタ構築物は、1以上のrAAVベクターにおける送達のために操作され得る。本明細書において提供される方法および組成物のいずれかに関係するrAAVは、いずれかの誘導体またはシュードタイプを包含するいずれかの血清型であり得る(例として、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、2/1、2/5、2/

8、2/9、3/1、3/5、3/8、または3/9)。rAAVは、細胞へ送達されるべきである遺伝子ペイロード(すなわち、rAAVによって細胞内に運ばれる塩基エディタ全部などの、問題のトランスジーンを発現する組換え核酸ベクター)を含み得る。rAAVはキメラであり得る。

【0268】

本明細書に使用されるときrAAVの血清型は、組換えウイルスのカプシドタンパク質の血清型を言う。誘導体およびシュードタイプの非限定的な例は、rAAV2/1、rAAV2/5、rAAV2/8、rAAV2/9、AAV2-AAV3ハイブリッド、AAVrh.10、AAVrh.74、AAVhu.14、AAV3a/3b、AAVrh32.33、AAV-HSC15、AAV-HSC17、AAVhu.37、AAVrh.8、CHT-P6、AAV2.5、AAV6.2、AAV2i8、AAV-HSC15/17、AAVM41、AAV9.45、AAV6(Y445F/Y731F)、AAV2.5T、AAV-HAE1/2、AAVクローン32/83、AAVShH10、AAV2(Y->F)、AAV8(Y733F)、AAV2.15、AAV2.4、AAVM41、およびAAVr3.45を包含する。キメラVP1タンパク質を有する誘導体およびシュードタイプの非限定的な例はrAAV2/5-1VP1uであり、これはAAV2のゲノム、AAV5のカプシドバックボーン、およびAAV1のVP1uを有する。キメラVP1タンパク質を有する誘導体およびシュードタイプの他の非限定的な例は、rAAV2/5-8VP1u、rAAV2/9-1VP1u、およびrAAV2/9-8VP1uである。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子のカプシドはAAV8(血清型8)である。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子のカプシドはAAV8(血清型9)である。いくつかの態様において、カプシドは血清型2、6、PHP.B、またはPHP.eBである。

10

20

【0269】

開示されるrAAV粒子のいずれかの複数を含む組成物が、本明細書において提供される。例示的な組成物は、開示されるrAAV8粒子、rAAV9粒子、rAAV2粒子、rAAV6粒子、rAAVPHP.B粒子、およびrAAVPHP.eB粒子のいずれかの複数を含有する。

【0270】

いくつかの態様においては、静脈内投与によってrAAV8粒子またはrAAV9粒子の組成物を投与する方法が開示される。他の態様において、静脈内AAV9注射によって十分に形質導入されない組織は、肺のAAV4形質導入などの他の既存のAAVバリエーションによって、または逆行性尿路注入による腎臓細胞のAAV9形質導入などの異なる送達経路によって形質導入され得る。

30

【0271】

AAV誘導体／シュードタイプ、およびかかる誘導体／シュードタイプを産生する方法は、当該技術分野において知られている(例として、Mol. Ther. 2012 Apr;20(4):699-708. doi: 10.1038/mt.2011.287. Epub 2012 Jan 24. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. Asokan A1, Schaffer DV, Samulski RJ.を見よ)。シュードタイプrAAVベクターを産生および使用するための方法は、当該技術分野において知られている(例として、Duan et al., J. Virol., 75:7662-7671, 2001; Halbert et al., J. Virol., 74:1524-1532, 2000; Zolotukhin et al., Methods, 28:158-167, 2002; および Auricchio et al., Hum. Molec. Genet., 10:3075-3081, 2001を見よ)。

40

【0272】

いくつかの側面において、本開示は、開示されるrAAV粒子のいずれかの複数を含有する組成物を提供する。いくつかの側面において、本開示は、開示されるrAAV粒子のいずれかの複数を含有する宿主細胞を提供する。いくつかの態様において、宿主細胞はヒト細胞などの哺乳動物細胞である。他の態様において、宿主細胞は酵母細胞、植物細胞、または細菌細胞である。

【0273】

開示されるrAAV粒子ならびにrAAV粒子を含む組成物および宿主細胞のいずれかの標的細胞または標的組織への送達方法は、当該技術分野において知られている。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子、宿主細胞、または組成物のいずれかは、哺乳動物

50

対象などの対象へ送達される。いくつかの態様において、rAAV粒子はヒト対象へ送達される。

【0274】

いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子および組成物は、単回全身注射などの単回注射で対象へ投与される。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子および組成物は、複数の注射で対象へ投与される。rAAV粒子は数日以内に標的組織を形質導入することが知られているが、典型的には、形質導入、ゲノムインテグレーション、および細胞からのクリアランスを完了するために3~4週間を許される。従って、いくつかの側面において、開示されるrAAV粒子または組成物のいずれかは、3週間の期間、対象へ投与される。いくつかの側面において、開示されるrAAV粒子または組成物のいずれかは、3週間と4週間との間の期間、対象へ投与される。

10

【0275】

いくつかの態様においては、開示されるrAAV粒子または組成物のいずれかは、対象のkg体重当たり約 10^{15} 、約 10^{14} 、約 10^{13} 、約 10^{12} 、約 10^{11} 、または約 10^{11} 未満のベクターゲノム(vg)の治療的有効量で、対象または標的組織へ投与される。いくつかの態様において、rAAV粒子は、kg当たり 10^{15} と 10^{14} との間、 10^{14} と 10^{13} との間、 10^{13} と 10^{12} との間、 10^{12} と 10^{11} との間、または 10^{12} と 10^{11} vgとの間の量で投与される。いくつかの態様において、rAAV粒子はkg当たり 10^{14} と 10^{11} の間の量で投与される。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子または組成物のいずれかは、2020年11月26日公開の国際公開第2020/236982号およびLevy, J.M., et al. Nat Bio med Eng 4, 97-110 (2020)に記載されているものなどのデュアルAAV粒子送達のための従来よりも低い用量で、対象の標的組織へ投与される。

20

【0276】

いくつかの側面において、本開示は、肝臓、ニューロン、心臓、筋肉、または眼組織などの標的組織への塩基エディタのシングルAAVベクター送達を提供する。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子または組成物のいずれかは対象の肝臓(肝)組織へ投与される。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子または組成物のいずれかは対象の心臓組織へ投与される。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子または組成物のいずれかは対象のニューロン組織へ投与される。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子または組成物のいずれかは対象の筋肉または神経筋組織へ投与される。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子または組成物のいずれかは対象の眼組織へ投与される。

30

【0277】

いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子は、標的細胞のゲノム上に所望の突然変異を組み入れるために十分な継続期間にわたってペイロードまたはトランスジーン、例として本開示に従う塩基エディタの発現および翻訳を達成するための標的組織の形質導入を提供する。いくつかの態様において、所望の突然変異はAからGの突然変異である。いくつかの態様において、所望の突然変異はCからTの突然変異である。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子は、忍容可能な度合いのオフターゲット効果、たとえばバイスタンダー編集をもって、ゲノム上に所望の(オンターゲット)突然変異を組み入れるために十分な継続期間にわたって、塩基エディタトランスジーンの充分な発現および翻訳を提供する。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子は、はっきりしたオフターゲット編集なしに、ゲノム上に所望の突然変異を組み入れるために十分な継続期間にわたって、塩基エディタトランスジーンの充分な発現および翻訳を提供する。いくつかの態様において、開示されるrAAV粒子は、はっきりしたバイスタンダー編集なしに、ゲノム上に所望の突然変異を組み入れるために十分な継続期間にわたって、塩基エディタトランスジーンの充分な発現および翻訳を提供する。

40

【0278】

rAAV粒子の開示される組成物を投与する好適な経路は、限定なしに次を包含する:外用、皮下、経皮、皮内、病巣内、関節内、腹腔内、膀胱内、経粘膜、歯肉、歯内、蝸牛内

50

、経鼓膜、臓器内、硬膜外、髄腔内、筋肉内、静脈内、全身、血管内、骨内、眼周囲、腫瘍内、脳内、非経口、および脳室内投与。いくつかの態様において、投与経路は全身的(静脈内)である。いくつかの態様において、本明細書に記載される医薬組成物は、有疾患部位へ局所投与される。

【0279】

いくつかの側面においては、開示される組成物のいずれかおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、医薬組成物は、対象への送達のために、例としてゲノム上の塩基編集のために製剤される。いくつかの態様において、開示される組成物は、対象、例としてヒトへの静脈内または皮下投与に適合した組成物として、通例の手続きに従って製剤される。いくつかの態様において、本明細書において提供される組成物は、対象内の標的化されたゲノム改変を成就するために、対象、例えばヒト対象への送達のために製剤される。いくつかの態様においては、細胞が対象から得られ、本明細書において提供される医薬組成物のいずれかと接触させられる。いくつかの態様において、対象から取り除かれ、*ex vivo*で医薬組成物と接触させられた細胞は、任意に所望のゲノム改変が細胞において成就または検出された後に、対象へ再導入される。医薬組成物の投与が企図される対象は、ヒトおよび／または他の霊長目の動物；哺乳動物、家畜、ペット、および商業上該当する哺乳動物、たとえばウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウス、および／またはラット；ならびに／あるいはニワトリ、アヒル、ガチョウ、および／またはシチメンチョウなどの商業上該当する鳥を包含する鳥を包含するが、これらに限定されない。

10

20

【0280】

本明細書に記載される医薬組成物の製剤は、薬理学の当該技術分野において知られているまたはこれから開発されるいずれかの方法によって調製され得る。一般的に、かかる調製方法は、活性成分(単数または複数)を賦形剤および／または1以上の他の補助的な成分と結び付け、次いで、必要および／または望ましい場合には産物を所望のシングルまたはマルチドーズユニットに成形および／またはパッケージングするステップを包含する。医薬製剤は、加えて、薬学的に許容される賦形剤を含み得る。本明細書に使用されるときこれは、所望の具体的な剤形に適したいずれかのおよび全ての溶媒、分散媒、希釈剤、または他の液体基剤、分散または懸濁助剤、界面活性剤、等張化剤、増粘または乳化剤、保存料、固体結合剤、潤滑剤等を包含する。

30

【0281】

いくつかの態様において、注射による投与のためのrAAV粒子の医薬組成物は、無菌の等張の水性緩衝剤中の溶液である。必要なところでは、医薬品は、可溶化剤、および注射部位における痛みを和らげるためのリグノカインなどの局所麻酔薬をもまた包含し得る。一般的には、成分は別個に供給されるか、または、例えば、活性な薬剤の数量を指示するアンプルもしくは薬袋などの気密容器中の乾燥した凍結乾燥粉末もしくは水不含濃縮物としてユニット剤形で一緒に混合されるかどちらかである。医薬品が輸液によって投与されるべきであるところでは、それは、無菌の医薬品グレードの水または生理食塩水を含有する輸液ボトルによって投与され得る。医薬組成物が注射によって投与されるところでは、注射のための無菌の水または生理食塩水のアンプルが、成分が投与に先行して混合されるようにして提供され得る。

40

【0282】

本明細書において使用される用語「薬学的に許容される担体」は、薬学的に許容される材料、組成物、または基剤、たとえば、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤(例として、潤滑剤、タルク、ステアリン酸マグネシウム、カルシウム、もしくは亜鉛、またはステアリン酸)、または溶媒カプセル化材料を意味し、体のある部位(例として送達部位)から別の部位(例として、体の臓器、組織、もしくは部分)へ化合物を運搬または輸送することに関わる。薬学的に許容される担体は、製剤の他の成分と適合性でありかつ対象の組織に対して傷害性がない(例として、生理学的に適合性、無菌、生理的pHなど)という意味で「許容される」。薬学的に許容される担体として作用し得る材料のいくつ

50

かの例は、次を包含する：(1)糖、たとえばラクトース、グルコース、およびスクロース；(2)デンプン、たとえばコーンスターチおよび馬鈴薯デンプン；(3)セルロースおよびその誘導体、たとえばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロース、および酢酸セルロース；(4)粉末状トラガント；(5)麦芽；(6)ゼラチン；(7)潤滑剤、たとえばステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、およびタルク；(8)賦形剤、たとえばカカオバターおよび坐剤ワックス；(9)油、たとえばピーナッツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、および大豆油；(10)グリコール、たとえばプロピレングリコール；(11)ポリオール、たとえばグリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール(PEG)；(12)エステル、たとえば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；(13)寒天；(14)緩衝剤、たとえば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；(15)アルギン酸；(16)パイロジェンフリー水；(17)等張生理食塩水；(18)リンゲル液；(19)エチルアルコール；(20)pH緩衝溶液；(21)ポリエステル、ポリカーボネート、および／またはポリ無水物；(22)増量剤、たとえばポリペプチドおよびアミノ酸；(23)血清構成要素、たとえば血清アルブミン、HDL、およびLDL；(22)C2～C12アルコール、たとえばエタノール；ならびに(23)医薬製剤に採用される他の非毒性の適合性の物質。湿潤剤、着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、保存料、および抗酸化剤もまた、製剤中に存在し得る。「賦形剤」、「担体」、または「薬学的に許容される担体」等などの用語は、本明細書においては交換可能に使用される。

10

20

【0283】

本開示のrAAV粒子医薬組成物は、例えばユニットドーズとして投与またはパッケージングされ得る。本開示の医薬組成物を参照して使用されるとき用語「ユニットドーズ」は、対象のための単位投与量として好適な物理的に別々のユニットを言い、各ユニットは、要求される希釈剤すなわち担体または基剤と結び付けられた所望の治療効果を産生するように計算された所定数量の活性材料を含有する。

【0284】

rAAVベクター配列

いくつかの側面において、本開示は、下で提出されるrAAVベクター核酸配列を提供する。いくつかの態様において、開示されるベクターは、配列番号100～102のいずれかに対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%の配列同一性を有する核酸配列を含む。ある特定の態様において、開示されるベクターは、配列番号100～102のいずれかの核酸配列である。各配列の構成要素は、ITRからITRの長さとして併せて指示されている。

30

【0285】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるベクターのいずれかは、配列番号100～102のいずれかの配列に対して相対的に異なる1～5、5～10、10～15、15～20、20～25、25～30、30～35、35～40、40～45、45～50、または50よりも多くのヌクレオチドを有する核酸配列を含み得る。これらの違いは、配列番号100～102のいずれかに対して相対的に、挿入、欠失、または置換されたヌクレオチドを含み得る。いくつかの態様において、開示されるベクターは、配列番号100～102のいずれかと共通の約50、約75、約100、約125、約150、約175、約200、約300、約400、約500、または500よりも多くの連続したヌクレオチドのストレッチを含有する。

40

【0286】

50

【化 1 1 - 1】

シングルAAV SaABE8e

ITR-EFSプロモーター-SaABE8e(開始コドン-BPNLS-TadA-SaCas9 D10A-BPNLS-終止コドン)-bG
HポリA-sgRNA(プロトスペーサは太字)-U6-ITR(クローニングのための制限部位)[4804bpはITRか
らITRの長さである]

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGG
TCGCCCGGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG
GTTCTCTCGGGCTCTAGAATTGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTG
CCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGGCA
ATTGATCCGGTGCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGC
TCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAAGTAGTCGCCGTGAACGTT
TTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGACCGGTGCCACCATGAAACGGACAGCCGAC
GGAAGCGAGTTCGAGTCACCAAAGAAGAAGCGGAAAGTCTCTGAGGTGGAGTTTTCCACGAG
TACTGGATGAGACATGCCCTGACCCTGGCCAAGAGGGCACGGGATGAGAGGGAGGTGCCTGTG
GGAGCCGTGCTGGTGCTGAACAATAGAGTGATCGGCGAGGGCTGGAACAGAGCCATCGGCCTG
CACGACCCAACAGCCCATGCCGAAATTATGGCCCTGAGACAGGGCGGCCTGGTCATGCAGAAC
TACAGACTGATTGACGCCACCCTGTACGTGACATTGAGCCTTGCGTGATGTGCGCCGGCGCC
ATGATCCACTCTAGGATCGGCCCGCTGGTGTTTGGCGTGAGGAACTCAAAAAGAGGCGCCGCA
GGCTCCCTGATGAACGTGCTGAACTACCCCGGCATGAATCACCGCGTCGAAATTACCGAGGGA
ATCCTGGCAGATGAATGTGCCGCCCTGCTGTGCGATTTCTATCGGATGCCTAGACAGGTGTTCA
ATGCTCAGAAGAAGGCCAGAGCTCCATCAACTCCGGAGGATCTAGCGGAGGCTCCTCTGGCT
CTGAGACACCTGGCACAAGCGAGAGCGCAACACCTGAAAGCAGCGGGGGCAGCAGCGGGGGG
TCAGGGAAGCGAAATTACATTCTGGGGCTGGCCATTGGCATTACATCAGTGGGCTATGGCATCA
TTGACTACGAGACAAGGGACGTGATCGACGCCGGCGTGAGACTGTTCAAGGAGGCCAACGTGG
AGAACAATGAGGGCCGGAGATCCAAGAGGGGAGCAAGGCGCCTGAAGCGGAGAAGGCGCCAC
AGAATCCAGAGAGTGAAGAAGCTGCTGTTTCGATTACAACCTGCTGACCGACCACTCCGAGCTG
TCTGGCATCAATCCTTATGAGGCCAGAGTGAAGGGCCTGTCCCAGAAGCTGTCTGAGGAGGAG
TTTAGCGCCGCCCTGCTGCACCTGGCAAAGAGGAGAGGCGTGACACAACGTGAATGAGGTGGAG
GAGGACACCGGCAACGAGCTGTCCACAAAGGAGCAGATCAGCCGCAATTCCAAGGCCCTGGAG
GAGAAGTATGTGGCCGAGCTGCAGCTGGAGCGGCTGAAGAAGGATGGCGAGGTGAGGGGCTCC
ATCAATCGCTTCAAGACCTCTGACTACGTGAAGGAGGCCAAGCAGCTGCTGAAGGTGCAGAAG
GCCTACCACAGCTGGATCAGTCCTTTATCGATACATATATCGACCTGCTGGAGACAAGGCGCA
CATACTATGAGGGACCAGGAGAGGGCTCTCCCTTCGGCTGGAAGGACATCAAGGAGTGGTACG
AGATGCTGATGGGCCACTGCACCTATTTTCAGAGGAGCTGAGAAGCGTGAAGTACGCCTATAA
CGCCGATCTGTACAACGCCCTGAATGACCTGAACAACCTGGTCATCACCAGGGATGAGAACGA

10

20

30

40

50

【化 1 1 - 2】

GAAGCTGGAGTACTATGAGAAGTTCCAGATCATCGAGAACGTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCT
ACACTGAAGCAGATCGCCAAGGAGATCCTGGTGAACGAGGAGGACATCAAGGGCTACCGCGTG
ACCTCCACAGGCAAGCCAGAGTTACCAATCTGAAGGTGTATCACGATATCAAGGACATCACA
GCCCGGAAGGAGATCATCGAGAACGCCGAGCTGCTGGATCAGATCGCCAAGATCCTGACCATC
TATCAGAGCTCCGAGGACATCCAGGAGGAGCTGACCAACCTGAATAGCGAGCTGACACAGGAG
GAGATCGAGCAGATCAGCAATCTGAAGGGCTACACCGGCACACACAACCTGAGCCTGAAGGCC
ATCAATCTGATCCTGGATGAGCTGTGGCACACAAACGACAATCAGATCGCCATCTTTAACGGGC
TGAAGCTGGTGCCAAAGAAGGTGGACCTGTCCAGCAGAAGGAGATCCCAACCACACTGGTGG
ACGATTTTCATCCTGTCTCCCGTGGTGAAGCGGAGCTTCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGC
CATCATCAAGAAGTACGGCCTGCCAATGATATCATCATCGAGCTGGCCAGGGAGAAGAACTC
CAAGGACGCCCAGAAGATGATCAATGAGATGCAGAAGAGGAACCGCCAGACCAATGAGCGGAT
CGAGGAGATCATCAGAACCACAGGCAAGGAGAACGCCAAGTACCTGATCGAGAAGATCAAGCT
GCACGATATGCAGGAGGGCAAGTGTCTGTATTCTCTGGAGGCCATCCCTCTGGAGGACCTGCT
GAACAATCCATTCAACTACGAGGTGGATCACATCATCCCCCGAGCGTGAGCTTCGACAATTCT
TTTAAACAATAAGGTGCTGGTGAAGCAGGAGGAGAACAGCAAGAAGGGCAATAGGACCCCTTTC
CAGTACCTGTCTAGCTCCGATTCTAAGATCAGCTACGAGACATTCAAGAAGCACATCCTGAATC
TGGCCAAGGGCAAGGGCCGCATCAGCAAGACCAAGAAGGAGTACCTGCTGGAGGAGCGGGACA
TCAACAGATTCTCCGTGCAGAAGGACTTCATCAACCGGAATCTGGTGGACACCAGATACGCCA
CACGCGGCCTGATGAATCTGCTGCGGTCTTATTTAGAGTGAACAATCTGGATGTGAAGGTGAA
GAGCATCAACGGCGGCTTCACCTCCTTTCTGCGGAGAAAAGTGAAGTTTAAAGAAGGAGCGCAA
CAAGGGCTATAAGCACCCACGCCGAGGATGCCCTGATCATCGCCAATGCCGACTTCATCTTTAA
GGAGTGGAAGAAGCTGGACAAGGCCAAGAAAGTGATGGAGAACCAGATGTTTCGAGGAGAAGCA
GGCCGAGAGCATGCCCCGAGATCGAGACAGAGCAGGAGTACAAGGAGATTTTCATCACACCTCA
CCAGATCAAGCACATCAAGGACTTCAAGGACTACAAGTATTCTCACAGGGTGGATAAGAAGCC
CAACCGCGAGCTGATCAATGACACCCTGTATAGCACACGGAAGGACGATAAGGGCAATACCCT
GATCGTGAACAATCTGAACGGCCTGTACGACAAGGATAATGACAAGCTGAAGAAGCTGATCAA
CAAGTCTCCCGAGAAGCTGCTGATGTACCACACGATCCTCAGACATATCAGAAGCTGAAGCT
GATCATGGAGCAGTACGGCGACGAGAAGAACCCACTGTATAAGTACTATGAGGAGACAGGCAA
CTACCTGACAAAGTATAGCAAGAAGGATAATGGCCCCGTGATCAAGAAGATCAAGTACTATGGC
AACAAGCTGAATGCCACCTGGACATCACCGACGATTACCCTAACTCTCGCAATAAGGTGGTG
AAGCTGAGCCTGAAGCCATACCGGTTGACGCTGTACCTGGACAACGGCGTGTATAAGTTTGTG
ACAGTGAAGAATCTGGATGTGATCAAGAAGGAGAACTACTATGAGGTGAACAGCAAGTGCTACG
AGGAGGCCAAGAAGCTGAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGTTTCATCGCCTCTTTTTACAACA
ATGACCTGATCAAGATCAATGGCGAGCTGTATAGAGTGATCGGCGTGAACAATGATCTGCTGAA
CAGAATCGAAGTGAATATGATCGACATCACCTACAGGGAGTATCTGGAGAACATGAATGATAAG
AGGCCCCCTCGCATCATCAAGACCATCGCCTCTAAGACACAGAGCATCAAGAAGTACAGCACA
GACATCCTGGGGAACCTGTATGAAGTCAAGAGCAAGAAACATCCTCAGATTATCAAGAAAGGCT
CTGGCGGCTCAAAAAGAACCAGCCGACGGCAGCGAATTTCGAGCCCAAGAAGAAGGAAAGTCT
AATAGATCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCCTC
CTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCAT
TGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGAT
TGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCGAGCGGCCCAAGCT
TAAAAAAATCTCGCCAACAAGTTGACGAGATAAACACGGCATTTCCTTGTGTTTAGTAGATTTC
TGTAATTTTCATTACAGAGTACTAAAACCGCCGTTGCTCCAAGGTATGGCGGTGTTTCGTCTCT
TCCACAAGATATATAAAGCCAAAGAAATCGAAATACCTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTC
CATTTTAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTACCGTAT
TTTGTAATAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTAACAGCCTTGAT
CGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCGACCTTGCGGGCCG
CCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTG
GTGCCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG

10

20

30

40

【化 1 1 - 3】

GGTTCCCT(配列番号100)

【0 2 8 7】

50

【化 1 2 - 1】

シングルAAV SaKKH-ABE8e

ITR-EFSプロモーター-SaKKHABE8e(開始コドン-BPNLS-TadA-SaKKHCas9 D10A-BPNLS-終止コドン)-bGHポリA-sgRNA(プロトスペーサは太字)-U6-ITR(間の灰色の配列はクローニングのための制限部位を含有する)[4804bpはITRからITRの長さである]

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG
TCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCATCACTAGGG
GTTCTCTCGGGCCTCTAGAATTCTGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGCGGAATTGGCTCCGGTGC
CCGTCACTGGGCGAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGCA
ATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTACTGGC
TCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCACTAGTCGCCGTGAACGTTT
TTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGACCGGTGCCACCATGAAACGGACAGCCGAC
GGAAGCGAGTTTCAGTCCACAAAGAAGAAGCGGAAAGTCTCTGAGGTGGAGTTTTCCACGAG
TACTGGATGAGACATGCCCTGACCCTGGCCAAGAGGGCACGGGATGAGAGGGAGGTGCCTGTG
GGAGCCGTGCTGGTGTGAACAATAGAGTGATCGGCGAGGGCTGGAACAGAGCCATCGGCCTG
CACGACCCAACAGCCCATGCCGAAATTATGGCCCTGAGACAGGGCGGCCTGGTTCATGCAGAAC
TACAGACTGATTGACGCCACCCTGTACGTGACATTTCGAGCCTTGCGTGATGTGCGCCGGCGCC
ATGATCCACTCTAGGATCGGCCGCGTGGTGTGTTGGCGTGAGGAACTCAAAAAGAGGCGCCGCA
GGCTCCCTGATGAACGTGCTGAACTACCCCGGCATGAATCACCGCGTCGAAATTACCGAGGGA
ATCCTGGCAGATGAATGTGCCGCCCTGCTGTGCGATTTCTATCGGATGCCTAGACAGGTGTTCA
ATGCTCAGAAGAAGGCCAGAGCTCCATCAACTCCGGAGGATCTAGCGGAGGCTCCTCTGGCT
CTGAGACACCTGGCACAAGCGAGAGCGCAACACCTGAAAGCAGCGGGGCGAGCAGCGGGGG
TCAGGGAAGCGAAATTACATTCTGGGGCTGGCCATTGGCATTACATCAGTGGGCTATGGCATCA
TTGACTACGAGACAAGGGACGTGATCGACGCGCGCGTGAGACTGTTCAAGGAGGCCAACGTGG
AGAACAATGAGGGCCGGAGATCCAAGAGGGGAGCAAGGCGCCTGAAGCGGAGAAGGCGCCAC
AGAATCCAGAGAGTGAAGAAGCTGCTGTTTCGATTACAACCTGCTGACCGACCACTCCGAGCTG
TCTGGCATCAATCCTTATGAGGCCAGAGTGAAGGGCCTGTCCAGAAAGCTGTCTGAGGAGGAG
TTTAGCGCCGCCCTGCTGCACCTGGCAAAGAGGAGAGGCGTGCACAACGTGAATGAGGTGGAG
GAGGACACCGGCAACGAGCTGTCCACAAAGGAGCAGATCAGCCGCAATTCCAAGGCCCTGGAG
GAGAAGTATGTGGCCGAGCTGCAGCTGGAGCGGCTGAAGAAGGATGGCGAGGTGAGGGGCTCC
ATCAATCGCTTCAAGACCTCTGACTACGTGAAGGAGGCCAAGCAGCTGCTGAAGGTGCAGAAG
GCCTACCACAGCTGGATCAGTCCTTTATCGATACATATATCGACCTGCTGGAGACAAGGCGCA
CATACTATGAGGGACCAGGAGAGGGCTCTCCCTTCGGCTGGAAGGACATCAAGGAGTGGTACG
AGATGCTGATGGGCCACTGCACCTATTTTCCAGAGGAGCTGAGAAGCGTGAAGTACGCCTATAA
CGCCGATCTGTACAACGCCCTGAATGACCTGAACAACCTGGTTCATCACCAGGGATGAGAACGA
GAAGCTGGAGTACTATGAGAAGTTCCAGATCATCGAGAAGCTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCT
ACACTGAAGCAGATCGCCAAGGAGATCCTGGTGAACGAGGAGGACATCAAGGGCTACCGCGTG
ACCTCCACAGGCAAGCCAGAGTTTACCAATCTGAAGGTGTATCACGATATCAAGGACATCACA
GCCCGGAAGGAGATCATCGAGAACGCCGAGCTGCTGGATCAGATCGCCAAGATCCTGACCATC
TATCAGAGCTCCGAGGACATCCAGGAGGAGCTGACCAACCTGAATAGCGAGCTGACACAGGAG
GAGATCGAGCAGATCAGCAATCTGAAGGGCTACACCGGCACACACAACCTGAGCCTGAAGGCC
ATCAATCTGATCCTGGATGAGCTGTGGCACACAAACGACAATCAGATCGCCATCTTTAACGGGC
TGAAGCTGGTGCCAAAGAAGGTGGACCTGTCCAGCAGAAGGAGATCCCAACCACACTGGTGG
ACGATTTTCATCCTGTCTCCCGTGGTGAAGCGGAGCTTCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGC
CATCATCAAGAAGTACGGCCTGCCAATGATATCATCATCGAGCTGGCCAGGGAGAAGAACTC
CAAGGACGCCCAGAAGATGATCAATGAGATGCAGAAGAGGAACCGCCAGACCAATGAGCGGAT
CGAGGAGATCATCAGAACCACAGGCAAGGAGAACGCCAAGTACCTGATCGAGAAGATCAAGCT
GCACGATATGCAGGAGGGCAAGTGTCTGTATTCTCTGGAGGCCATCCCTCTGGAGGACCTGCT

10

20

30

40

50

【化 1 2 - 2】

GAACAATCCATTCAACTACGAGGTGGATCACATCATCCCCGGAGCGTGAGCTTCGACAATTCT
 TTTAACAATAAGGTGCTGGTGAAGCAGGAGGAGAACAGCAAGAAGGGCAATAGGACCCCTTTC
 CAGTACCTGTCTAGCTCCGATTCTAAGATCAGCTACGAGACATTCAAGAAGCACATCCTGAATC
 TGGCCAAGGGCAAGGGCCGCATCAGCAAGACCAAGAAGGAGTACCTGCTGGAGGAGCGGGACA
 TCAACAGATTCTCCGTGCAGAAGGACTTCATCAACCCGAATCTGGTGGACACCAGATACGCCA
 CACGCGGCTGATGAATCTGCTGCGGTCTTATTTTCAAGTGAACAATCTGGATGTGAAGGTGAA
 GAGCATCAACGGCGGCTTCACCTCCTTTCTGCGGAGAAAGTGGAAGTTTAAGAAGGAGCGCAA
 CAAGGGCTATAAGCACCCAGCCGAGGATGCCCTGATCATCGCCAATGCCGACTTCATCTTTAA
 GGAGTGGAAGAAGCTGGACAAGGCCAAGAAAGTGGAGAGAACAGATGTTTGGAGGAGAACCA
 GGCCGAGAGCATGCCCGAGATCGAGACAGAGCAGGAGTACAAGGAGATTTTTCATCACACCTCA
 CCAGATCAAGCACATCAAGGACTTCAAGGACTACAAGTATTCTCACAGGGTGGATAAGAAGCC
 CAACCGCAAGCTGATCAATGACACCTGTATAGCACACGGAAGGACGATAAGGGCAATACCCT
 GATCGTGAACAATCTGAACGGCCTGTACGACAAGGATAATGACAAGCTGAAGAAGCTGATCAA
 CAAGTCTCCCGAGAAGCTGCTGATGTACCACCAGGATCCTCAGACATATCAGAAGCTGAAGCT
 GATCATGGAGCAGTACGGCGACGAGAAGAACCCTGTATAAGTACTATGAGGAGACAGGCAA
 CTACCTGACAAAGTATAGCAAGAAGGATAATGGCCCCGTGATCAAGAAGATCAAGTACTATGGC
 AACAAGCTGAATGCCACCTGGACATCACCGACGATTACCCTAACTCTCGCAATAAGGTGGTG
 AAGCTGAGCCTGAAGCCATACCGGTTTCGACGTGTACCTGGACAACGGCGTGTATAAGTTTGTG
 ACAGTGAAGAATCTGGATGTGATCAAGAAGGAGAAGTACTATGAGGTGAACAGCAAGTGCTACG
 AGGAGGCCAAGAAGCTGAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGTTCATCGCCTCTTTTTACAAGA
 ATGACCTGATCAAGATCAATGGCGAGCTGTATAGAGTGATCGGCGTGAACAATGATCTGCTGAA
 CAGAATCGAAGTGAATATGATCGACATCACCTACAGGGAGTATCTGGAGAACATGAATGATAAG
 AGGCCCCCTCATATCATCAAGACCATCGCCTCTAAGACACAGAGCATCAAGAAGTACAGCACA
 GACATCCTGGGGAACCTGTATGAAGTCAAGAGCAAGAAACATCCTCAGATTATCAAGAAAGGCT
 CTGGCGGCTCAAAAAGAACCGCCGACGGCAGCGAATTCGAGCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTC
 AATAGATCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTC
 CTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCAT
 TGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGAT
 TGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTCGAGCGGCCCAAGCT
 TAAAAAATCTCGCCAACAAGTTGACGAGATAAACACGGCATTGCTGCTTTTGTAGTAGATTC
 TGTAATTTTATTACAGAGTACTAAAACCGCCGTTGCTCCAAGGTATGGCGGTGTTTCGTCCTT
 TCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTC
 CATTTTAAAACATAATTTTAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTACGATAT
 TTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTTAACAGCCTTGAT
 CGTATATGCAAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCTGCCCCGACCTT GCGGCCG
CCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGGCAAAGCCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTG
GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGG
GGTTCCT (配列番号101)

10

20

30

【0 2 8 8】

【化 1 3 - 1】

シングルAAV SauriABE8e

ITR-EFS プロモーター-SauriABE8e(開始コドン-BPNLS-TadA-SauriCas9 D10A-BPNLS-終止コドン)-bGHポリA-sgRNA(プロトスペーサは太字)-U6-ITR(間の灰色の配列はクローニングのための制限部位を含む)[4828bpはITRからITRの長さである]

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGGCAAAGCCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGG
TGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGG
GTTCTGCGGCCTCTAGAATTGCTAGCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTG
CCGTCACTGGGCAGAGCGCACATCGCCCCACAGTCCCCGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCA
ATTGATCCGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGC
TCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTG

40

50

【化 1 3 - 2】

TTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGACCGGTGCCACCATGAAACGGACAGCCGAC
GGAAGCGAGTTCGAGTCAACAAAGAAGAAGCGGAAAGTCTCTGAGGTGGAGTTTTCCACGAG
TACTGGATGAGACATGCCCTGACCCTGGCCAAGAGGGCACGGGATGAGAGGGAGGTGCCTGTG
GGAGCCGTGCTGGTGCTGAACAATAGAGTGATCGGCGAGGGCTGGAACAGAGCCATCGGCCTG
CACGACCCAACAGCCCATGCCGAAATTATGGCCCTGAGACAGGGCGGCCTGGTCATGCAGAAC
TACAGACTGATTGACGCCACCCCTGTACGTGACATTCGAGCCTTGCGTGATGTGCGCCGGCGCC
ATGATCCACTCTAGGATCGGCCCGCGTGGTGTGGCGTGAGGAACTCAAAAAGAGGCGCCGCA
GGCTCCCTGATGAACGTGCTGAACTACCCCGGCATGAATCACCGCGTCGAAATTACCGAGGGA
ATCCTGGCAGATGAATGTGCCGCCCTGCTGTGCGATTTCATCGGATGCCTAGACAGGTGTTCA
ATGCTCAGAAGAAGGCCAGAGCTCCATCAACTCCGGAGGATCTAGCGGAGGCTCCTCTGGCT
CTGAGACACCTGGCACAAGCGAGAGCGCAACACCTGAAAGCAGCGGGGGCAGCAGCGGGGGG
TCAATGCAGGAGAACCAGCAGAAGCAGAAGTACATCCTGGGCCTGGCCATCGGAATCACCAGC
GTGCGCTACGGACTGATCGATAGCAAGACAAGAGAAGTGATCGACGCCGGCGTTAGACTCTTT
CCAGAAGCTGATAGCGAGAACAACCTCCAACCGCAGAAGCAAGCGGGGCGCCAGACGGTTAAAA
CGGAGAAGAATCCACCGGCTGAACCGGGTCAAAGACCTGCTCGCTGATTACCAGATGATCGAT
CTTAACAATGTTCTAAGAGCACCGACCCCTACACCATCAGAGTGAAGGGCCTCCGGGAGCCT
CTGACAAAAGAAGATTGCGCATCGCCCTCCTGCATATCGCTAAGAGAAGAGGCCTGCACAAC
ATCAGTGTGCCATGGGCGACGAAGAGCAGGACAATGAACTGAGCACCAAGCAGCAGCTGCAA
AGAATGCCCAGCAACTGCAGGACAAGTATGTGTGCGAACTGCAGTTAGAACGGCTGACCAAC
ATCAACAAGTGCAGAGGCGAGAAGAACAGATTTAAGACAGAGGACTTTGTGAAAGAAGTGAAAC
AGCTGTGCGAAACCCAGAGACAGTACCACAACATCGACGACCAATTCATCCAGCAGTACATCG
ACCTGGTGTCTACAAGACGGGAGTACTTCGAGGGCCCCGGCAACGGCTCTCCATACGGCTGGG
ACGGCGACCTGCTGAAGTGGTACGAGAAGCTGATGGGCAGATGCACCTATTTCCCGAAGAAC
TGAGGTCCGTGAAGTACGCCCTACAGCGCCGACCTCTTCAACGCCCTGAACGACCTGAACAACC
TCGTTGTGACCAGGGATGACAATCCAAAGCTTGAGTACTACGAGAAGTACCACATTATTGAGAA
CGTGTTCAGCAAAAAGAAGATCCACACTCAAACAAATCGCCAAAGAGATCGGCGTGCAAGA
TTACGACATCCGGGGCTATAGAATCACAAGAGCGGCAACCTCAGTTCACCTCTTTTAAGCTG
TATCAGCAGCTGAAGAACATCTTCGAGCAGGCCAAATACCTGGAAGATGTGGAAATGCTGGAC
GAGATCGCCAAGATCCTGACCATCTACCAGGATGAGATTAGCATCAAGAAAGCCCTGGACCAG
CTGCCCGAAGTCTGACAGAGAGCGGAGAAATCTCAGATCGCACAGCTCACCGGCTATACAGGC
ACCCACAGACTGAGCCTGAAGTGCATCCACATTGTGATCGACGAGCTGTGGGAGAGCCCCGAG
AACCAGATGGAAATCTTTACCAGACTGAATCTGAAACCTAAGAAGGTGGAATGAGCGAGATCG
ACAGCATACCCACCACCCTGGTCGACGAGTTCATCCTCTCACCTGTGGTGAAGCGGGCCTTCA
TCCAGAGCATCAAGGTAATCAACGCAGTGATCAATCGGTTCCGGCTGCCAGAGGACATCATCAT
CGAGCTGGCCAGAGAAAAAGTAAGCAAGGATCGGAGAAAAGTTCATTAAAGCTGCAGAAACA
AAATGAGGCCACAAGAAAGAAAATCGAACAGCTGCTGGCCAAGTACGGCAACACCAATGCCAA
GTACATGATCGAGAAGATCAAGCTGCACGACATGCAGGAGGGCAAGTGCCTGTACAGCCTGGA
GGCTATTCCTCTGGAAGACCTGCTGAGCAACCCGACACACTACGAAGTTGACCACATTATCCC
CAGATCTGTGAGCTTTGACAACAGCCTGAACAACAAAGTGCTGGTGAACAAAGCGAAAACAG
CAAGAAGGGCAATCGACCCCTTACCAGTACCTGAGCAGCAACGAGTCTAAGATTAGCTACAA
CCAGTTTAAGCAGCACATCCTGAACCTGAGCAAGGCCAAGGACAGAATCAGCAAGAAAAAAG
AGATATGCTGCTGGAAGAGAGAGATATCAACAAGTTTCAAGTGACAGAAGGAATTCATTAACCGG
AACCTGGTGGATACACGGTACGCCACCAGAGAACTGTCTAACCTGCTGAAGACCTACTTCAGC
ACCCATGACTACGCCGTGAAGGTGAAGACCATCAACGGCGGCTTCACTAACCACTGAGGAAG
GTGTGGGATTTCAAGAAGCACAGAAACCACGGCTACAAGCACACGCCGAAGATGCCCTGGTG
ATCGCCAACGCCGACTTCCTGTTTAAGACACATAAGGCCCTGCGGAGAACCGATAAGATCCTG
GAACAACCTGGCCTGGAAGTGAATGATACAACCGTGAAGTGAGACACCGAGGAAAAATACCAG
GAGCTGTTTCGAGACACCTAAGCAAGTGAAGAACATCAAGCAGTTCCGGGACTTCAAGTACAGC
CACCGAGTGACAAGAAGCCTAACCGGCAGCTTATCAACGACACACTGTACTCCACCAGAGAG
ATTGATGGCGAAACCTACGTGGTGACAGCCCTTAAGGATCTGTACGCCAAGGACAACGAGAAA

10

20

30

40

50

【化 1 3 - 3】

GTGAAGAAGCTGTTACCGAAAGACCTCAGAAGATCCTGATGTACCAGCACGACCCTAAGACC
 TTCGAGAAACTGATGACAATCCTGAACCACTACGCTGAGGCCAAGAACCCTCTGGCTGCTTATT
 ACGAGGACAAAGGCGAGTACGTGACCAAGTACGCCAAGAAAGGCAATGGACCTGCCATCCACA
 AGATCAAGTATATCGATAAGAAGCTTGGATCTTACCTGGATGTTAGCAACAAGTATCCTGAGAC
 ACAGAACAAAGCTTGTGAAGCTGTCCCTGAAGAGCTTTAGATTTCGACATCTACAAGTGTGAACAG
 GGCTACAAGATGGTGTCCATCGGATACCTGGACGTGCTGAAGAAAGATAACTACTACTACATCC
 CTAAGGACAAGTACGAGGCCGAGAAGCAGAAAAAGAAGATCAAGGAATCTGATCTTTTTGTGGG
 CAGCTTCTACTACAACGACCTCATCATGTACGAGGATGAACTGTTGAGAGTGATAGGAGTGAAC
 AGCGACATCAACAATCTGGTTGAGCTAAACATGGTCGACATTACCTACAAGGACTTCTGCGAGG
 TGAACAACGTGACAGGCCGAGAAAAGAATCAAAAAGACTATCGGCAAGCGCGTGGTCTGATCG
 AGAAGTACACCACAGATATTCTAGGCAACCTGTACAAGACTCCCCTGCCTAAGAAGCCCCAGC
 TTATCTTCAAGCGGGGAGAACTGTCTGGCGGCTCAAAAAGAACC GCCGACGGCAGCGAATTCTG
 AGCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTC **TAATAGATCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGT**
TGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCCTTCCCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTAA
TAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGG
GGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCT
CTATGGCTCGAGCGGCCCAAGCTTAAAAAATCTCGCCAACAAGTTGACGAGATAAACACGGC
ATTTTGCCCTGTTTTAGTAGATTCTGTAATTTTCATTACAGAGTACTAAAACCGTTGCTCCAAGG
TATGGGTGCGGTGTTTCGTCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAA
GTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAA
TTATTACTTTCTACGTCACTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAAT
TATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCT
TCCTGCCCGACCTT GCGGCCGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAAGC
CCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTGGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA
GTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTCT (配列番号102)

10

20

【0289】

標的核酸分子を編集する方法

いくつかの側面において、本明細書においては、開示されるAAVにコードされる塩基エディタのいずれかを、核酸分子、例として、標的配列を含む核酸分子(例としてDNA)と接触させる方法が提供される。いくつかの態様において、核酸分子は、DNA、例として一本鎖DNAまたは二本鎖DNAを含む。核酸分子の標的配列は、アデニン(A)を含有する標的核酸塩基対を含み得る。核酸分子の標的配列は、シトシン(C)を含有する標的核酸塩基対を含み得る。標的配列は、ゲノム配列、例としてヒトゲノム配列であり得る。標的配列は、疾患または障害に関連する配列、例として点突然変異を有する標的配列を含み得る。点突然変異を有する標的配列は心血管疾患に関連し得る。

30

【0290】

いくつかの態様において、標的ヌクレオチド配列は、ゲノム、例として真核生物ゲノム上のDNA配列である。ある特定の態様において、標的ヌクレオチド配列は哺乳動物(例としてヒト)ゲノム上にある。ある特定の態様において、標的ヌクレオチド配列はヒトゲノム上にある。他の態様において、標的ヌクレオチド配列は、マウスまたはラットなどのげっ歯類のゲノム上にある。他の態様において、標的ヌクレオチド配列は、ウマ、ネコ、イヌ、またはウサギなどの家畜のゲノム上にある。いくつかの態様において、標的ヌクレオチド配列は研究動物のゲノム上にある。いくつかの態様において、標的ヌクレオチド配列は、遺伝子操作された非ヒト対象のゲノム上にある。いくつかの態様において、標的ヌクレオチド配列は植物のゲノム上にある。いくつかの態様において、標的ヌクレオチド配列は細菌などの微生物のゲノム上にある。

40

【0291】

いくつかの態様において、開示されるAAVにコードされる塩基エディタは、低いオフターゲット効果、たとえば低いオフターゲット編集頻度を見せる。いくつかの態様において、開示されるAAVにコードされる塩基エディタは、高いオンターゲット編集効率を見せながら、低いオフターゲット編集頻度を見せる。いくつかの態様において、開示されるAAVにコードされるアデニン塩基エディタのいずれかにおけるTadA-8eデアミナーゼま

50

たはTadA-8e(V106W)デアミナーゼの使用は、約80%以上のオンターゲット編集効率を維持しながら、0.32%以下のオフターゲット編集頻度を見せ得る。2021年8月12日に公開の国際公開第2021/158921号を見よ。

【0292】

開示される塩基エディタは、評価中の1以上の塩基エディタの標的核酸塩基対において50%よりも多大なまたは60%よりも多大な(たとえば、70%よりも多大な、75%よりも多大な、80%よりも多大な、または85%よりも多大な)オンターゲット編集効率を提供し(または生じ)得る。開示される編集方法のいずれかは、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、または少なくとも約85%のオンターゲット編集効率を生じ得る。

10

【0293】

いくつかの態様において、開示されるBE、および標的DNA配列を含む細胞を開示されるBEのいずれかと接触させるステップを含む編集方法は、約2.0%以下、1.75%以下、1.5%以下、1.2%以下、1%以下、0.9%以下、0.8%以下、0.75%以下、0.7%以下、0.65%以下、または0.6%以下の実際のまたは平均のオフターゲットDNA編集頻度をもたらす。これらのオフターゲット編集頻度は、標的配列に対していずれかのレベルの配列同一性を有する配列において得られ得る。オフターゲットDNA編集頻度を言うために本明細書に使用されるとき修飾語「平均」は、所与の標的核酸塩基対以外の部位において検出された(例として、ハイスループット配列決定によって検出された)全ての編集事象からの平均値を言う。

20

【0294】

種々の態様において、開示される編集方法は、標的核酸塩基対において少なくとも約35%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%のオンターゲットDNA塩基編集効率をもたらす。接触させるステップは、少なくとも約60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、または75%のDNA塩基編集効率をもたらし得る。特に、接触させるステップは、75%よりも多大なオンターゲット塩基編集効率をもたらす。接触させるステップは、60と85%との間のDNA塩基編集効率をもたらし得る。ある特定の態様において、85%よりも多大な塩基編集効率の実現され得る。

30

【0295】

これらの編集効率は、肝臓組織、心臓組織、筋肉組織、ニューロン組織、または眼組織などのいずれかの標的組織において、開示されるAAVにコードされる塩基エディタのいずれかの投与後に実現され得る。

【0296】

心臓組織または筋肉組織(例として骨格筋組織)への開示されるrAAVベクターまたは粒子のいずれかの投与によって、少なくとも約20%、少なくとも約22%、少なくとも約24%、少なくとも約27%、少なくとも約30%、少なくとも約33%、または少なくとも約36%の編集効率の実現され得る。これらの編集効率は、デュアルAAVベクターについて報告された心臓および筋肉組織における編集効率に対して相対的に2と2.5と倍の間の増大に相当する。心臓組織または筋肉組織(例として心臓組織)への開示されるrAAVベクターまたは粒子のいずれかの投与によって、心臓細胞または筋肉細胞における2.5%以下、2.0%以下、1.5%以下、1.2%以下、または1.0%以下のインデル率の実現され得る。

40

【0297】

種々の態様において、開示される編集方法は、約25:1、50:1、65:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1、100:1、110:1、125:1、または125:1よりも多くのオンターゲット:オフターゲット編集の比をもたらす。種々の態様において、開示される編集方法は、約150:1、200:1、300:1、400:1、500:1、600:1、700:1、800:1、900:1、1000:1、1100:1、1200:1、1250:1、1275:1、1300:1、1325:1、1350:1、1400:1、1500:1、または1500:1よりも多くのオンターゲット:オフターゲット編集

50

の比をもたらす。本明細書に使用されるときオンターゲット:オフターゲット編集の比は、既知のもしくは予測されるオフターゲット部位または候補オフターゲット部位の脱アミノ化に対して相対的な、オンターゲット脱アミノ化を反映する配列決定リードの比と同等である。候補オフターゲット部位が同定され得、ゆえに、オンターゲット:オフターゲット編集の比が、実験アッセイまたは計算アルゴリズム(例としてCas-OFFinder)を使用して測定され得る。例えば、候補オフターゲット部位は、EndoV-Seq、GUIDE-Seq、またはCIRCLE-Seqなどの実験アッセイを使用して同定され得る。いくつかの態様において、オンターゲット編集:オフターゲット編集の比はEndoV-Seqの使用に依拠する。

【0298】

いくつかの態様において、開示される編集方法は、最小限の度合いのバイスタンダー編集(すなわち、標的塩基に近い、意図される編集方法のアウトカムを変化させない核酸塩基における同義のオフターゲット点突然変異)をもたらし、開示される塩基エディタはそれを生成する。いくつかの態様において、開示される編集方法は、10未満、9未満、8未満、7未満、6未満、5未満、4未満、3未満、2未満、1未満、または0の非サイレントなバイスタンダー編集をもたらす。例えば、肝臓組織における開示されるシングルAAVにコードされるSaKKH-ABE8eエディタを使用する編集方法は、少数の(すなわち最小限の)非サイレントなバイスタンダー編集しかもたらし得ない。

【0299】

本開示のいくつかの側面は、本明細書において提供されるアデニン塩基エディタのいずれかが、有意な割合のインデルを生成することなしに特定のDNA塩基を改変することができるという認識に基づく。本明細書に使用されるとき「インデル」は、DNA基質内のヌクレオチド塩基の挿入または欠失を言う。かかる挿入または欠失は遺伝子のコード領域内のフレームシフト突然変異に至り得る。いくつかの態様においては、核酸上に多数の挿入または欠失(すなわちインデル)を生成することなしに(同時に、既存のアデニン塩基エディタよりも低いRNA編集効果を有しながら)、DNA内の特定のヌクレオチドを効率的に改変する(例として突然変異または脱アミノ化する)アデニン塩基エディタを生成することが望ましい。

【0300】

いくつかの態様において、開示されるBEを使用する開示される編集方法は、標的配列を含む核酸(例としてDNA)において20%、19%、18%、16%、14%、12%、10%、8%、6%、4%、2%、1.5%、1%、0.5%、0.2%、または0.1%未満のインデル形成をもたらし得る。いくつかの態様において、開示される編集方法は、2.5%以下、2.0%以下、1.5%以下、1.2%以下、または1.0%以下のインデル率をもたらす。図11A、11B、および15を見よ。

【0301】

いくつかの態様において、開示される編集方法は、少なくとも約5:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、または約15:1よりも多大な塩基編集:インデル比をもたらす。

【0302】

本開示のいくつかの側面は、本明細書において提供される塩基エディタのいずれかが、有意な数の意図されない突然変異、たとえば意図されない点突然変異を生成することなしに、DNA(例として対象のゲノム内のDNA)上の点突然変異などの意図される突然変異を効率的に生成することができるという認識に基づく。いくつかの態様において、意図される突然変異は、意図される突然変異(例として脱アミノ化)を生成するように特異的に設計されたgRNAに結合した特定の塩基エディタによって生成される突然変異である。いくつかの態様において、意図される突然変異は、鎌状赤血球症などの疾患または障害に関連する突然変異である。いくつかの態様において、意図される突然変異は、疾患または障害に関連するアデニン(A)からグアニン(G)の点突然変異である。いくつかの態様において、意図される突然変異は、疾患または障害に関連するチミン(T)からシトシン(C)の点突然変異である。いくつかの態様において、意図される突然変異は、遺伝子のコード領域内の

アデニン(A)からグアニン(G)の点突然変異である。いくつかの態様において、意図される突然変異は、遺伝子のコード領域内のチミン(T)からシトシン(C)の点突然変異である。

【0303】

いくつかの態様において、意図される突然変異は、終止コドン、例えば、遺伝子のコード領域内の未成熟終止コドンを生成する脱アミノ化である。いくつかの態様において、意図される突然変異は、終止コドンをなくす突然変異である。いくつかの態様において、意図される突然変異は、核酸配列5'-TAG-3'、5'-TAA-3'、または5'-TGA-3'を含む終止コドンをなくす。

【0304】

いくつかの態様において、意図される突然変異は、遺伝子の調節配列(例として遺伝子プロモータまたは遺伝子リプレッサ)を変調させる脱アミノ化である。いくつかの態様において、意図される突然変異は、遺伝子プロモータに導入される脱アミノ化である。特定の態様において、遺伝子プロモータに導入される脱アミノ化は、遺伝子プロモータに作動可能に連結された遺伝子の転写の減少に至る。他の態様において、脱アミノ化は、遺伝子プロモータに作動可能に連結された遺伝子の転写の増大に至る。

【0305】

いくつかの態様において、意図される突然変異は、遺伝子配列または遺伝子のスプライシングを変調させる脱アミノ化である。従って、いくつかの態様において、意図される脱アミノ化は、遺伝子上のスプライス部位の導入をもたらす。他の態様において、意図される脱アミノ化は、スプライス部位の取り除きをもたらす。いくつかの態様において、意図される脱アミノ化は、遺伝子上の終止コドンの導入をもたらす。他の態様において、意図される脱アミノ化は、終止コドンの取り除きをもたらす。

【0306】

いくつかの態様において、本明細書において提供される塩基エディタのいずれかは、1:1よりも多大である意図された突然変異対意図されない突然変異の比(例として、意図された点突然変異:意図されない点突然変異)を生成することができる。いくつかの態様において、本明細書において提供される塩基エディタは、少なくとも1.5:1、少なくとも2:1、少なくとも2.5:1、少なくとも3:1、少なくとも3.5:1、少なくとも4:1、少なくとも4.5:1、少なくとも5:1、少なくとも5.5:1、少なくとも6:1、少なくとも6.5:1、少なくとも7:1、少なくとも7.5:1、少なくとも8:1、少なくとも10:1、少なくとも12:1、少なくとも15:1、少なくとも20:1、少なくとも25:1、少なくとも30:1、少なくとも40:1、少なくとも50:1、少なくとも100:1、少なくとも150:1、少なくとも200:1、少なくとも250:1、少なくとも500:1、または少なくとも1000:1、またはより多くである、意図される突然変異対意図されない突然変異(例として、意図される点突然変異:意図されない点突然変異)の比を生成することができる。この項および本開示の以下の項に記載される塩基エディタの特性は、本明細書において提供される塩基エディタまたは塩基エディタを使用する方法のいずれかに適用され得ることが了解されるべきである。

【0307】

本明細書において開示される本開示のAAVにコードされる塩基エディタは、低減されたおよび／または低いRNA編集効果を有する。いくつかの態様において、塩基エディタは、低減されたRNA編集効果を有するように進化または操作される。本明細書に使用される時、用語「RNA編集効果」は、細胞RNA、例としてメッセンジャーRNA(mRNA)内のヌクレオチドの改変の導入(例として脱アミノ化)を言う。DNA塩基編集効率の重要な目標は、RNA内に類似のヌクレオチドの改変を導入することなしに、DNA内の特定のヌクレオチドの改変(例として脱アミノ化)である。RNA編集効果は、検出される突然変異が0.3%以下の頻度でRNA分子に導入されるときには「低い」かまたは「低減される」。

【0308】

本開示は、さらに、開示される塩基エディタを投与する方法を提供し、ここで、方法は、低減されたおよび／または低いRNA編集効果を生ずる。本開示は、さらに、低いおよび／

10

20

30

40

50

び／または検出不可能なRNA編集効果を誘導する(または生ずる、提供する、もしくは引き起こす)塩基エディタ(開示されるABEなど)を提供する(図17を見よ)。いくつかの態様において、塩基エディタは、0.3%以下という細胞mRNA転写物上の平均のアデノシン(A)からイノシン(I)(AからI)の編集頻度を提供する。いくつかの態様において、塩基エディタは、約0.3%以下というRNA上の平均のアデノシン(A)からイノシン(I)(AからI)の実際のおよび／または一貫した編集頻度を提供する。塩基エディタは、約0.5%以下、0.4%以下、0.35%以下、0.25%以下、0.2%以下、0.15%以下、0.12%以下、0.1%以下、0.08%以下、または0.075%以下というRNA上の実際または平均のAからIの編集頻度を提供し得る。

【0309】

ガイド配列(例としてガイドRNA)

本開示は、開示される編集方法に従う使用のためのガイドRNAをさらに提供する。本開示は、標的配列を認識するように設計されているガイドRNAを提供する。かかるgRNAは、標的配列内のプロトスペーサに対して相補性を有するガイド配列(または「スペーサ」)を有するように設計され得る。

【0310】

ガイドRNAは、例として核酸分子を編集する開示される方法における開示される塩基エディタの1以上との使用のためにもまた提供される。かかるgRNAは、編集されるべき標的配列内のプロトスペーサに対して相補性を有するガイド配列を有するように、かつ開示される塩基エディタのCas9ニッカーゼドメインなどの開示される塩基エディタのいずれかのnapDNAbpドメインと特異的に相互作用するバックボーン配列を有するように設計され得る。開示される編集方法に従うガイドRNAは、表1に列挙されるプロトスペーサ配列(配列番号430~565)のいずれかに対して相補性を有し得る。

【0311】

種々の態様において、塩基エディタは、1以上のガイド配列と(例として、いずれかの型の共有結合または非共有結合を介して)複合体化、結合、または別様に結び付けられ得る。ガイド配列は、塩基エディタに結び付けられたまたは結合された状態になり、ガイド配列またはそのある部分に対して相補性を有する特定の標的配列へのその局在を導く。ガイド配列の具体的な設計態様は、たとえばPAM配列の場所、標的配列のパーセントG/C含量、マイクロホモロジー領域の度合い、二次構造などの他の因子の中でも、ゲノム標的配列のヌクレオチド配列(すなわち、編集されるべき所望の部位)および塩基エディタ上に存在するnapDNAbpの型(例としてCas9タンパク質の型)に依存するであろう。

【0312】

一般的に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイゼーションし、標的配列に対するnapDNAbp(例としてCas9またはCas9バリエーション)の配列特異的結合を導くために十分な標的ポリヌクレオチド配列との相補性を有するいずれかのポリヌクレオチド配列である。いくつかの態様において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の度合いは、好適なアラインメントアルゴリズムを使用して最適にアラインメントされるときに、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%以上、または約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%超もしくはそれよりも多い。最適なアラインメントは、配列をアラインメントするためのいずれかの好適なアルゴリズムを使用して決定され得る。これの非限定的な例は、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler変換に基づくアルゴリズム(例としてBurrows Wheeler Aligner)、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies、ELAND(Illumina, San Diego, Calif.)、SOAP(soap.genomics.org.cnにおいて利用可能)、およびMaq(maq.sourceforge.netにおいて利用可能)を包含する。

【0313】

いくつかの態様において、ガイド配列は、長さが約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、4

10

20

30

40

50

0、45、50、75ヌクレオチド以上、または約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75ヌクレオチド超もしくはそれよりも多い。いくつかの態様において、ガイド配列は、長さが約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12ヌクレオチド未満、またはより少数である。いくつかの態様において、ガイドRNAは、長さが15~300、25~300、50~300、25~250、25~200、15~200、または15~100ヌクレオチドである。いくつかの態様において、ガイドRNAは長さが約25と200ヌクレオチドの間である。いくつかの態様において、ガイドRNAは長さが約15と200との間、または15と100との間のヌクレオチドである。

【0314】

標的配列に対する塩基エディタの配列特異的結合を導くガイド配列の能力は、いずれかの好適なアッセイによって評価され得る。例えば、試験されるべきガイド配列を包含する塩基エディタの構成要素は、たとえば本明細書において開示される塩基エディタの構成要素をコードするベクターによるトランスフェクションによって、対応する標的配列を有する宿主細胞へ提供され、その後、標的配列内における選好的切断の評価がされ得る。類似に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、標的配列、試験されるべきガイド配列を包含する塩基エディタの構成要素、および試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を提供すること、試験および対照ガイド配列反応間において標的配列における結合または切断率を比較することによって、*in situ*で評価され得る。他のアッセイが可能であり、当業者には思い浮かぶであろう。

【0315】

ガイド配列は、いずれかの標的配列を標的化するように選択され得る。いくつかの態様において、標的配列は細胞のゲノム内の配列である。例示的な標的配列は、標的ゲノム上において固有であるものを包含する。

【0316】

いくつかの態様において、ガイド配列は、ガイド配列内の二次構造の度合いを低減するように選択される。二次構造は、いずれかの好適なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムによって決定され得る。いくつかのプログラムは、最小ギブス自由エネルギーを計算することに基づく。1つのかかるアルゴリズムの例は、Zuker & Stiegler (Nucleic Acids Res. 9 (1981), 133-148)に記載されているmFoldである。別の例のフォールディングアルゴリズムは、University of ViennaのInstitute for Theoretical Chemistryにおいて開発されたオンラインウェブサーバRNAfoldであり、セントロイド構造予測アルゴリズムを使用する(例として、A.R. Gruber et al., 2008, Cell 106(1): 23-24;およびPA Carr & GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27(12): 1151-62を見よ)。追加のアルゴリズムは、Chuai, G. et al., DeepCRISPR: optimized CRISPR guide RNA design by deep learning, Genome Biol. 19: 80 (2018)、ならびに米国出願公開第61/836,080号明細書および2014年10月28日発行の米国特許第8,871,445号明細書に見出され得る。これらの各々の全体は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0317】

gRNAのガイド配列はtracr mate(「バックボーン」としてもまた知られている)配列に連結され、これは翻ってtracr配列とハイブリダイゼーションする。tracr mate配列は、次の1以上を促進するためにtracr配列に対する十分な相補性を有するいずれかの配列を包含する:(1)対応するtracr配列を含有する細胞におけるtracr mate配列によってフランキングされるガイド配列の切り出し;および(2)標的配列における複合体の形成(ここで、複合体は、tracr配列とハイブリダイゼーションしたtracr mate配列を含む)。一般的に、相補性の度合いは、2つの配列の短い方の長さに沿って、tracr mate配列およびtracr配列の最適なアラインメントの参照による。最適なアラインメントは、いずれかの好適なアラインメントアルゴリズムによって決定され得、さらに、tracr配列またはtracr mate配列内どちらかの自己相補性などの二次構造を考慮に入れ得る。いくつかの態

様において、最適にアラインメントされたときの2つの短い方の長さに沿ったtracr配列とtracr mate配列との間の相補性の度合いは、約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%以上、または約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%超もしくはそれよりも多い。いくつかの態様において、tracr配列は、長さが約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50ヌクレオチド以上、または約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50ヌクレオチド超もしくはそれよりも多い。いくつかの態様において、tracr配列およびtracr mate配列は、2つの間のハイブリダイゼーションがヘアピンなどの二次構造を有する転写物を産生するようにして単一の転写物内に含有される。ヘアピン構造における使用のための好ましいループ形成配列は、長さが4ヌクレオチドであり、最も好ましくは配列GAAAを有する。しかしながら、より長いまたはより短いループ配列が代替配列として使用され得る。配列は、好ましくは、ヌクレオチドトリプレット(例としてAAA)および追加のヌクレオチド(例としてCまたはG)を包含する。ループ形成配列の例はCAAAおよびAAAGを包含する。本発明のある態様において、転写物または転写されるポリヌクレオチド配列は、少なくとも2以上のヘアピンを有する。ある特定の態様において、転写物は、2、3、4、または5つのヘアピンを有する。本発明のさらなる態様において、転写物は多くても5つのヘアピンを有する。いくつかの態様において、単一の転写物は転写終結配列をさらに包含する;好ましくは、これは、ポリT配列、例えば6つのTヌクレオチドである。

10

20

【0318】

いくつかの態様において、開示される編集方法に従う使用のためのガイドRNAは、修飾リボヌクレオチドを含有する合成シングルガイドRNA(sgRNA)を含む。いくつかの態様において、ガイドRNAは、2'-O-メチル化ヌクレオチドおよびホスホロチオアート連結部などの修飾を含有する。いくつかの態様において、ガイドRNAは、最初の3ヌクレオチドと最後の3ヌクレオチドとにおける2'-O-メチル修飾、ならびに最初の3と最後の3ヌクレオチドとの間のホスホロチオアート結合を含有する。例示的な修飾された合成sgRNAは、参照によって本明細書に組み込まれるHendel A. et al., Nat. Biotechnol. 33, 985-989 (2015)において開示されている。

【0319】

いくつかの態様において、本開示の編集方法に従う使用のためのガイドRNAは、Nme2Cas9ドメインなどのN. meningitis Cas9タンパク質またはドメインによって認識されるバックボーン構造を含む。Nme2Cas9タンパク質によって認識されるバックボーン構造(または骨格)は、下で提供される配列を含み得る:5'-[ガイド配列]-gtttagctcccttctcatttcggaacgaaatgagaaccgttgctacaataaggccgtctgaaaagatgtgccgcaacgctctgcccccttaaagcttctgctttaaggggcatcgttta-3'(配列番号719)。この骨格配列は、NmeCas9、Nme1Cas9、Nme2Cas9、およびNme3Cas9タンパク質によって認識される。Nme2Cas9ドメインおよびそのバリエーションを含有する塩基エディタによる編集のための例示的なガイドRNAは、参照によって本明細書に組み込まれるEdraki et al., Molecular Cell 73, 714-726に記載されている。

30

40

【0320】

他の態様において、開示される編集方法に従う使用のためのガイドRNAは、S. pyogenes Cas9タンパク質またはドメイン、たとえば開示される塩基エディタのSpCas9ドメインによって認識されるバックボーン構造を含む。SpCas9タンパク質によって認識されるバックボーン構造は、配列5'-[ガイド配列]-guuuuagagcuagaaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcuuuuu-3'(配列番号339)を含み得る。ここで、ガイド配列は、標的配列のプロトスペーサに対して相補的である配列を含む。2015年6月18日公開の米国特許出願公開第2015/0166981号明細書を見よ。その開示は参照によって本明細書に組み込まれる。ガイド配列は典型的には20ヌクレオチドの長さである。

50

【0321】

他の態様において、開示される編集方法に従う使用のためのガイドRNAは、*C. jejuni* Cas9タンパク質またはドメイン、たとえば開示される塩基エディタのCjCas9ドメインによって認識されるバックボーン構造を含む。CjCas9タンパク質によって認識されるバックボーン構造は、配列5'-[ガイド配列]-gttttagtcctgaaaagggactaaaataaagagtttgcgggactctgcggggttacaatcccctaaaaccgctttttt-3'(配列番号340)を含み得る。ここで、ガイド配列は、標的配列のプロトスペーサに対して相補的である配列を含む。

【0322】

他の態様において、開示される編集方法に従う使用のためのガイドRNAは、*S. aureus* Cas9タンパク質によって認識されるバックボーン構造を含む。SaCas9タンパク質によって認識されるバックボーン構造は、配列5'-[ガイド配列]-guuuuaguacucuguaau gaaaauuacagaauacuacuaaaacaaggcaaaaugccguguuuauaucugucaacuuguuggcg agauuuuuuu-3'(配列番号78)を含み得る。これは、SaKKH-Cas9およびSaCas9オーソログ、SauriCas9によって認識されるバックボーン構造でもまたある。

【0323】

開示される編集方法に従う使用のためのガイドRNAは、表2(配列番号566~571)に列挙されるバックボーン構造を含み得る。

【0324】

開示されるBEを特定のゲノム標的部位へと標的化するための好適なガイドRNAの配列は、本開示に基づいて当業者には明らかであろう。かかる好適なガイドRNA配列は、典型的には、編集されるべき標的核酸塩基対の上流または下流の50ヌクレオチド以内の核酸配列に対して相補的であるガイド配列を含む。提供されるBEのいずれかを特定の標的配列へと標的化することに好適なくつかの例示的なガイドRNA配列が、本明細書において提供される。追加のガイド配列は当該技術分野において知られており、本明細書に記載される塩基エディタと共に使用され得る。追加の例示的なガイド配列は、例えば、Jinek M., et al., *Science* 337:816-821(2012); Mali P, Esvelt KM & Church G M (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology, *Nature Methods*, 10, 957-963; Li JF et al., (2013) Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9, *Nature Biotechnology*, 31, 688-691; Hwang, W.Y. et al., Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system, *Nature Biotechnology* 31, 227-229 (2013); Cong L et al., (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, 339, 819-823; Cho SW et al., (2013) Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease, *Nature Biotechnology*, 31, 230-232; Jinek, M. et al., RNA-programmed genome editing in human cells, *eLife* 2, e00471 (2013); Dicarlo, J.E. et al., Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acid Res.* (2013); Briner AE et al., (2014) Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality, *Mol Cell*, 56, 333-339において開示されている。これらの各々の内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0325】

Casバリエーションおよび塩基エディタを生成する方法

本発明は、さらに、種々の側面において、細胞におけるより多大な発現レベルを達成するためのコドン最適化、および細胞核内への発現された塩基エディタの局在を増大させるための核局在配列(NLS)、好ましくは少なくとも2つのNLS、例として2つの双節型NLSの使用を包含するがこれらに限定されない種々の操作様式によって、開示される改善された塩基エディタを作る方法に関する。

【0326】

細胞における増大した発現のための塩基エディタの調製

本明細書において企図される塩基エディタは、例えばコドン最適化を通して、増大した発現をもたらす改変を包含し得る。

【0327】

いくつかの態様において、塩基エディタ(またはその構成要素)は、真核細胞などの具体的な細胞における発現のためにコドン最適化される。真核細胞は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、または非ヒト霊長目の動物を包含するがこれらに限定されない哺乳動物などの具体的な生物のものであるかまたはそれに由来し得る。一般的に、コドン最適化は、自然状態の配列の少なくとも1つのコドン(例として、約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50コドン以上、または約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50コドン超もしくはそれよりも多い)を、その宿主細胞の遺伝子により頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンによって置き換えながら、自然状態のアミノ酸配列を維持することによって、問題の宿主細胞における増強された発現のために核酸配列を改変するプロセスを言う。種々の種は、特定のアミノ酸のある特定のコドンへの特定のバイアスを見せる。コドンバイアス(生物間のコドン使用頻度の違い)は、多くの場合にメッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳の効率と相関する。これは、翻って、とりわけ、翻訳されようとするコドンの特性および具体的なトランスファーRNA(tRNA)分子の利用可能性に依存すると思われる。細胞における選択されたtRNAの優勢は、一般的に、最も頻繁にペプチド合成に使用されるコドンの反映である。従って、遺伝子は、コドン最適化に基づいて所与の生物における最適な遺伝子発現のために詠えられ得る。コドン使用頻度表は、例えば「Codon Usage Database」において容易く利用可能であり、これらの表はいくつもの方法で適合され得る。Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)を見よ。特定の宿主細胞における発現のために特定の配列をコドン最適化するためのコンピュータアルゴリズムもまた利用可能である。たとえば、Gene Forge(Aptagen; Jacobus, PA)もまた利用可能である。いくつかの態様において、CRISPR酵素をコードする配列上の1以上のコドン(例として、1、2、3、4、5、10、15、20、25、50以上または全てのコドン)は、特定のアミノ酸のための最も頻繁に使用されるコドンに対応する。

【0328】

核局在配列および追加の塩基エディタ構成要素

いくつかの態様において、本明細書において提供される塩基エディタは、さらに、1以上の核標的化配列、例えば核局在配列(NLS)を含む。いくつかの態様において、NLSは、(例として核輸送による)細胞核内へのNLSを含むタンパク質の輸入を容易にするアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、本明細書において提供される塩基エディタのいずれかは、1以上の核局在配列(NLS)をさらに含む。ある特定の態様において、塩基エディタのいずれかは2つのNLSを含む。いくつかの態様において、NLSの1以上は双節型NLS(「bpNLS」)である。ある特定の態様において、開示される塩基エディタは2つの双節型NLSを含む。いくつかの態様において、開示される塩基エディタは2つよりも多くの双節型NLSを含む。

【0329】

いくつかの態様において、NLSは塩基エディタのN末端に融合される。いくつかの態様において、NLSは塩基エディタのC末端に融合される。いくつかの態様において、NLSはnapDNAbpのC末端に融合される。いくつかの態様において、NLSはアデノシンデアミナーゼのN末端に融合される。いくつかの態様において、NLSはアデノシンデアミナーゼのC末端に融合される。いくつかの態様において、NLSは1以上のリンカーを介して塩基エディタに融合される。いくつかの態様において、NLSはリンカーなしで塩基エディタに融合される。

【0330】

いくつかの態様において、NLSは、本明細書において提供または参照されるNLS配列のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、NLSは、配列番号408

または配列番号409で提出されるアミノ酸配列を含む。追加の核局在配列は当該技術分野において知られており、当業者に明らかであろう。例えば、NLS配列はPlank et al. のPCT/EP2000/011690号明細書に記載されており、その内容は、例示的な核局在配列の開示について参照によって本明細書に組み込まれる。いくつかの態様において、NLSは、アミノ酸配列PKKKRKV(配列番号408)、MDSLLMNRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC(配列番号409)、KRTADGSEFESPKKRKV(配列番号410)、またはKRTADGSEFEPKKRKV(配列番号411)を含む。他の態様において、NLSは、アミノ酸配列NLSKRPAAIKKAGQAKKKK(配列番号482)、PAAKRVKLD(配列番号483)、RQRRNELKRSF(配列番号484)、またはNQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY(配列番号485)を含む。

10

【0331】

いくつかの態様において、塩基エディタはbpNLSを含む。bpNLSは、KRTADGSEFEPKKRKV(配列番号398)、KRPAATKKAGQAKKKK(配列番号344)、KKTELQTTNAENKTKKL(配列番号345)、KRGINDRNFWRGENGRKTR(配列番号346)、およびRKSGKIAAIVVKRPRK(配列番号347)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み得る。ある特定の態様において、bpNLAは、配列番号344または398で提出されるアミノ酸配列を含む。

【0332】

いくつかの態様において、本明細書において提供される塩基エディタはリンカーを含まない。いくつかの態様において、リンカーは、ドメインまたはタンパク質(例としてデアミナーゼ、napDNAbp、および／またはNLS)の1以上の間に存在する。いくつかの態様において、上の一般的なアーキテクチャにおいて使用される「]-[」は任意のリンカーの存在を指示する。

20

【0333】

いくつかの態様において、第1のアデノシンデアミナーゼ、第2のアデノシンデアミナーゼ、およびnapDNAbpドメインを有する例示的な塩基エディタの一般的なアーキテクチャは、以下の構造のいずれか1つを含み、ここで、NLSは核局在配列(例として、本明細書において提供されるいずれかのNLS)であり、NH₂は塩基エディタのN末端であり、COOHは塩基エディタのC末端である。

【0334】

デアミナーゼ、napDNAbpドメイン、およびNLS(例として、本明細書において提供されるいずれかのNLS)を含む例示的な塩基エディタは、以下のアーキテクチャを有し得る:

NH₂-[デアミナーゼドメイン]-[napDNAbpドメイン]-[NLS]-COOH;
NH₂-[napDNAbpドメイン]-[デアミナーゼドメイン]-[NLS]-COOH;
NH₂-[NLS]-[デアミナーゼドメイン]-[napDNAbpドメイン]-COOH;または
NH₂-[NLS]-[napDNAbpドメイン]-[デアミナーゼドメイン]-COOH。

【0335】

特定の態様において、開示される塩基エディタは以下のABEアーキテクチャを含み、ここで、TadA-8eは、アデノシンデアミナーゼドメインである:

40

NH₂-[bpNLS]-[TadA-8e]-[napDNAbpドメイン]-[bpNLS]-COOH;
NH₂-[bpNLS]-[napDNAbpドメイン]-[TadA-8e]-[bpNLS]-COOH;
NH₂-[bpNLS]-[TadA-8e]-[napDNAbpドメイン]-[bpNLS]-COOH;または
NH₂-[bpNLS]-[napDNAbpドメイン]-[TadA-8e]-[bpNLS]-COOH。

【0336】

シチジンデアミナーゼ、napDNAbpドメイン、UGIドメイン、およびNLS(例として、本明細書において提供されるいずれかのNLS)を含む例示的な塩基エディタは、以下のアーキテクチャを有し得る:NH₂-[napDNAbpドメイン]-[シチジンデアミナーゼドメイン]-[UGIドメイン]-[bpNLS]-COOH;またはNH₂-[bpNLS]-[napDNAbpドメイン]-[シチジンデアミナーゼドメイン]-[UGIドメイン]-COOH;NH₂-[シチジンデアミナーゼドメイ

50

ン]-[napDNAbpドメイン]-[UGIドメイン]-[upNLS]-COOH;またはNH₂-[bpNLS]-[シチジンデアミナーゼドメイン]-[napDNAbpドメイン]-[UGIドメイン]-COOH。

【0337】

代表的な核局在シグナルは、配列が発現される細胞の核へとタンパク質を導くペプチド配列である。核局在シグナルは圧倒的に塩基性であり、タンパク質のアミノ酸配列上のほぼどちらかに位置し得、一般的には4アミノ酸(参照によって本明細書に組み込まれるAutieri & Agrawal, (1998) J. Biol. Chem. 273: 14731-37)から8アミノ酸の短い配列を含み、典型的にはリジンおよびアルギニン残基に富む(参照によって本明細書に組み込まれるMagin et al., (2000) Virology 274: 11-16)。核局在シグナルは多くの場合にプロリン残基を含む。種々の核局在シグナルが同定されており、細胞質から細胞の核への生物学的分子の輸送を成就するために使用されている。例として、Tinland et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:7442-46; Moede et al., (1999) FEBS Lett. 461:229-34を見よ。これは参照によって本明細書に組み込まれる。移送には核膜孔タンパク質が関わり現行では思料されている。

10

【0338】

ほとんどのNLSは3つの一般的な群に分類され得る:(i)SV40ラージT抗原NLS(PKKKRV(配列番号408))によって例示される単節型NLS;(ii)*Xenopus*ヌクレオプラスミンNLS(KRXXXXXXXXXXXXKKKL(配列番号486))によって例示される可変数のスペーサアミノ酸によって分離された2つの塩基性ドメインからなる双節型モチーフ;ならびに(iii)非古典的配列、たとえばhnRNP A1タンパク質のM9、インフルエンザウイルス核タンパク質NLS、および酵母Gal4タンパク質NLS(Dingwall and Laskey, Trends Biochem Sci. 1991 Dec;16(12):478-81)。

20

【0339】

核局在シグナルは、タンパク質のアミノ酸配列上の種々の点において出現する。NLSは、タンパク質のN末端、C末端、および中央領域において同定されている。それゆえに、本明細書は、塩基エディタのC末端、N末端、および内部領域において1以上のNLSによって修飾され得る塩基エディタを提供する。構成要素のNLS残基として機能しないより長い配列の残基は、核局在シグナルそれ自体と例えば硬直的にまたは立体的に干渉しないようにして選択されるべきである。よって、NLSを含む配列の組成に厳格な限度はないが、現実には、かかる配列は長さおよび組成が機能的に限定され得る。

30

【0340】

本開示は、1以上のNLSを包含するように融合タンパク質(または塩基エディタ)を改変するためのいずれかの好適な手段を企図する。1つの側面において、塩基エディタは、そのN末端またはそのC末端(または両方)において1以上のNLSに翻訳上融合されている融合タンパク質を発現するように、すなわち融合タンパク質-NLS融合構築物を形成するように操作され得る。他の態様において、融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、コードされる融合タンパク質の内部領域に、1以上のNLSをコードするリーディングフレームを組み込むように遺伝子組換えされ得る。加えて、NLSは、融合タンパク質とN末端、C末端、または内部に付着されたNLSアミノ酸配列との間にコードされる種々のアミノ酸リンカーまたはスペーサ領域を含み得る。それゆえに、本開示は、融合タンパク質および1以上のNLSを含む塩基エディタを発現するためのヌクレオチド構築物、ベクター、および宿主細胞をもまた可能にする。

40

【0341】

本明細書に記載される塩基エディタは、1以上のリンカー、例としてポリマー、アミノ酸、多糖、化学、または核酸リンカー要素を通して融合タンパク質に連結されている核局在シグナルをもまた含み得る。ある特定の態様において、NLSは、配列番号412で提出されるXTENリンカーを使用して融合タンパク質に連結される。本開示の企図される範囲内のリンカーは、いずれかの限定を有することを意図されず、いずれかの好適な型の分子(例として、ポリマー、アミノ酸、多糖、核酸、脂質、またはいずれかの合成化学リンカードメイン)であり得、融合タンパク質および1以上のNLSの間の結合(例として、共有結

50

合的な連結部、水素結合)を形成することを成就するいずれかの好適な戦略によって融合タンパク質に繋ぎ合わせられ得る。

【0342】

本明細書に記載される塩基エディタは1以上の追加の要素をもまた包含し得る。ある特定の態様において、追加の要素は、塩基修復のインヒビターなどの塩基修復のエフェクターを含み得る。

【0343】

いくつかの態様において、本明細書に記載される塩基エディタは、1以上の異種タンパク質ドメイン(例として、塩基エディタ構成要素に加えて、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10超もしくはそれよりも多い)を含み得る。塩基エディタは、いずれかの追加のタンパク質配列、および任意にいずれかの2つのドメイン間のリンカー配列を含み得る。存在し得る他の例示的な特徴は、局在配列、たとえば細胞質局在配列、搬出配列、たとえば核外搬出配列、または他の局在配列、および配列タグである。

【0344】

塩基エディタまたはその構成要素(例としてnapDNAbpドメイン、ヌクレオチド修飾ドメイン、またはNLSドメイン)に融合され得る異種タンパク質ドメインの例は、限定なしに、エピトープタグおよびレポーター遺伝子配列を包含する。エピトープタグの非限定的な例は、ヒスチジン(His)タグ、V5タグ、FLAGタグ、インフルエンザヘマグルチニン(HA)タグ、Mycタグ、VSV-Gタグ、およびチオレドキシン(Trx)タグを包含する。レポーター遺伝子の例は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ベータ-ガラクトシダーゼ、ベータ-グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、HcRed、DsRed、シアン蛍光タンパク質(CFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、および青色蛍光タンパク質(BFP)を包含する自己蛍光タンパク質を包含するが、これらに限定されない。塩基エディタは、DNA分子に結合するか、またはマルトース結合タンパク質(MBP)、Sタグ、Lex A DNA結合ドメイン(DBD)融合体、GAL4 DNA結合ドメイン融合体、および単純ヘルペスウイルス(HSV)BP16タンパク質融合体を包含するがこれらに限定されない他の細胞分子に結合するタンパク質またはタンパク質のフラグメントをコードする遺伝子配列に融合され得る。塩基エディタの一部を形成し得る追加のドメインは、2011年3月10日公開の、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2011/0059502号明細書に記載されている。

【0345】

本開示のある側面においては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ベータ-ガラクトシダーゼ、ベータ-グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、HcRed、DsRed、シアン蛍光タンパク質(CFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、および青色蛍光タンパク質(BFP)を包含する自己蛍光タンパク質を包含するがこれらに限定されないレポーター遺伝子が細胞に導入されて、遺伝子産物の発現の変調または改変を測定するためのマーカーとして作用する遺伝子産物をコードし得る。本開示のある特定の態様において、遺伝子産物はルシフェラーゼである。本開示のさらなる態様において、遺伝子産物の発現は減少する。

【0346】

存在し得る他の例示的な特徴は、塩基エディタの可溶化、精製、または検出に有用であるタグである。本明細書において提供される好適なタンパク質タグは、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、bgh-ポリAタグ、ヒスチジンタグまたはHisタグともまた言わ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、チオレドキシンタグ、Sタグ、Softag(例として、Softag 1、Softag 3)、strepタグ、ビオチ

ンリガーゼタグ、FIAshタグ、V5タグ、およびSBPタグを包含するが、これらに限定されない。追加の好適な配列は当業者には明らかであろう。いくつかの態様において、塩基エディタは1以上のHisタグを含む。

【0347】

リンカー

ある特定の態様においては、リンカーが、塩基エディタのペプチドまたはペプチドドメインまたはドメインのいずれかを連結するために使用され得る(例として、napDNAbpドメインがアデノシンデアミナーゼドメインに共有結合的に連結され、これはNLSドメインに共有結合的に連結される)。本明細書に記載される塩基エディタは、長さが32アミノ酸のリンカーを含み得る。

10

【0348】

リンカーは共有結合ほども単純であり得るか、またはそれは長さが多くの原子のポリマーリンカーであり得る。ある特定の態様において、リンカーはポリペプチドであるか、またはアミノ酸に基づく。他の態様において、リンカーはペプチド様ではない。ある特定の態様において、リンカーは共有結合である(例として、炭素-炭素結合、ジスルフィド結合、炭素-ヘテロ原子結合など)。ある特定の態様において、リンカーはアミド連結部の炭素-窒素結合である。ある特定の態様において、リンカーは、環状または非環状の、置換または無置換の、分岐または非分岐の脂肪族またはヘテロ脂肪族リンカーである。ある特定の態様において、リンカーはポリマー性である(例として、ポリエチレン、ポリエチレングリコール、ポリアミド、ポリエステルなど)。ある特定の態様において、リンカーは、アミノアルカン酸の単量体、二量体、またはポリマーを含む。ある特定の態様において、リンカーはアミノアルカン酸を含む(例として、グリシン、エタン酸、アラニン、ベータアラニン、3-アミノプロパン酸、4-アミノ酪酸、5-ペントタン酸など)。ある特定の態様において、リンカーは、アミノヘキサン酸(Ahx)の単量体、二量体、またはポリマーを含む。ある特定の態様において、リンカーは炭素環部分(例として、シクロペンタン、シクロヘキサン)に基づく。他の態様において、リンカーはポリエチレングリコール部分(PEG)を含む。他の態様において、リンカーはアミノ酸を含む。ある特定の態様において、リンカーはペプチドを含む。ある特定の態様において、リンカーはアリールまたはヘテロアリール部分を含む。ある特定の態様において、リンカーはフェニル環に基づく。リンカーは、ペプチドからリンカーへの求核剤(例として、チオール、アミノ)の付着を容易にするための官能化された部分を包含し得る。いずれかの求電子剤がリンカーの一部として使用され得る。例示的な求電子剤は、活性化エステル、活性化アミド、マイケルアクセプター、ハロゲン化アルキル、ハロゲン化アリール、ハロゲン化アシル、およびイソチオシアナートを包含するが、これらに限定されない。

20

30

【0349】

いくつかの態様において、リンカーは、長さが5~100アミノ酸、例えば、長さが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、35~40、40~45、45~50、50~60、60~70、70~80、80~90、90~100、100~110、110~120、120~130、130~140、140~150、または150~200アミノ酸である。より長いまたはより短いリンカーもまた企図される。いくつかの態様において、リンカーは長さが32アミノ酸である。例示的な態様において、リンカーは、XTENリンカーとしてもまた知られている32アミノ酸配列SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGGS(配列番号412)を含む。いくつかの態様において、リンカーは9アミノ酸配列SGGSSGGSSGGGS(配列番号413)を含む。いくつかの態様において、リンカーは4アミノ酸配列SGGS(配列番号414)を含む。

40

【0350】

いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列(GGGGS)_n(配列番号415)、(G)_n(配列番号416)、(EAAAK)_n(配列番号417)、(GGG)_n(配列番号418)、(SGGS)_n(配列番号419)、(XP)_n(配列番号420)、またはそれらのいずれかの組み合わせを含み、ここ

50

で、 n は独立して1と30との間の整数であり、ここで、 X はいずれかのアミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーはアミノ酸配列 $(GGG)_n$ (配列番号421)を含み、ここで、 n は1、3、または7である。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列SGSETPGTSESATPES(配列番号422)を含む。

【0351】

いくつかの態様において、リンカーは、SGSETPGTSESATPES(配列番号422)およびSGGS(配列番号414)を含む。いくつかの態様において、リンカーは、SGGSSGSETPGTSESATPES(配列番号423)を含む。いくつかの態様において、リンカーは、SGGSSGSSGSETPGTSESATPES(配列番号412)を含む。いくつかの態様において、リンカーは、GGSGGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGGSGGS(配列番号424)を含む。いくつかの態様において、リンカーは長さが24アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列SGGSSGSSGSETPGTSESATPES(配列番号425)を含む。いくつかの態様において、リンカーは長さが40アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列SGGSSGSSGSETPGTSESATPES(配列番号426)を含む。いくつかの態様において、リンカーは長さが64アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列SGGSSGSSGSETPGTSESATPES(配列番号427)を含む。いくつかの態様において、リンカーは長さが92アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS(配列番号428)を含む。本明細書において提供されるリンカーのいずれかは、第1のアデノシンデアミナーゼおよび第2のアデノシンデアミナーゼ;アデノシンデアミナーゼドメイン(例として第1および/または第2のアデノシンデアミナーゼを含む)およびnapDNAbp;napDNAbpおよびNLS;またはアデノシンデアミナーゼドメインおよびNLSを連結するために使用され得るということが了解されるべきである。

【0352】

いくつかの態様において、本明細書において提供される塩基エディタのいずれかは、リンカーを介して互いに融合されるアデノシンデアミナーゼおよびnapDNAbpを含む。いくつかの態様において、本明細書において提供される塩基エディタのいずれかは、リンカーを介して互いに融合される第1のアデノシンデアミナーゼおよび第2のアデノシンデアミナーゼを含む。いくつかの態様において、本明細書において提供される塩基エディタのいずれかはNLSを含み、これが、アデノシンデアミナーゼ(例として第1および/または第2のアデノシンデアミナーゼ)および核酸プログラマブルDNA結合タンパク質(napDNAbp)に融合され得る。具体的な適用のためのデアミナーゼ活性にとって最適な長さを達成するために、種々のリンカー長さおよび柔軟性が、アデノシンデアミナーゼ(例として操作されたecTadA)とnapDNAbp(例としてCas9ドメイン)との間において、および/または第1のアデノシンデアミナーゼと第2のアデノシンデアミナーゼとの間において採用され得る(例として、配列番号119、121~124の形態の非常に柔軟なリンカー(例として、Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. Nat. Biotechnol. 2014; 32(6): 577-82を見よ;内容全体が参照によって本明細書に組み込まれる)および $(XP)_n$ (配列番号420)からの範囲である)。いくつかの態様において、 n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15である。いくつかの態様において、リンカーは $(GGG)_n$ (配列番号421)モチーフを含み、ここで、 n は、1、3、または7である。いくつかの態様において、本明細書において提供される塩基エディタのいずれかのアデノシンデアミナーゼおよびnapDNAbp、ならびに/または第1のアデノシンデアミナーゼおよび第2のアデノシンデアミナーゼは、配列番号119~132から選択されるアミノ酸配列を含むリンカーを介して融合される。いくつかの態様において、リンカーは長さが24アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカー

はアミノ酸配列(SGGS)₂-SGSETPGTSESATPES-(SGGS)₂(配列番号412)を含み、これは(SGGS)₂-XTEN-(SGGS)₂(配列番号429)ともまた言われ得る。いくつかの態様において、リンカーは、nが0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、リンカーは長さが40アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは長さが64アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは長さが92アミノ酸である。

【0353】

上の記載は、増大した発現を有する塩基エディタを作ることについて非限定的であること、およびそれによって編集効率を増大させることを意味される。

【0354】

処置および使用の方法

本開示の他の側面は、完全なかつ機能的なCas9タンパク質または核酸塩基エディタを形成するために、塩基エディタを細胞内へ送達する方法を提供する。例えば、いくつかの態様においては、細胞が、本明細書に記載される組成物(例として、塩基エディタをコードするヌクレオチド配列を含む組成物、またはかかるヌクレオチド配列を含む核酸ベクターを含有するAAV粒子)と接触させられる。いくつかの態様において、接触は、細胞内へのかかるヌクレオチド配列の送達をもたらし、ここで、Cas9タンパク質または核酸塩基エディタのN末端部分およびCas9タンパク質または核酸塩基エディタのC末端部分が、細胞において発現され、繋ぎ合わせられて、完全なCas9タンパク質または完全な核酸塩基エディタを形成する。

【0355】

本明細書において提供されるいずれかのrAAV粒子、核酸分子、または組成物は、安定にまたは一過的に、いずれかの好適なやり方で細胞内に導入され得るということが了解されるべきである。いくつかの態様において、開示されるタンパク質は細胞内へトランスフェクションされ得る。いくつかの態様において、細胞は、核酸分子によって形質導入またはトランスフェクションされ得る。例えば、細胞は、タンパク質をコードする核酸分子、または1以上の核酸分子をコードするウイルスゲノムを含有するrAAV粒子によって形質導入(例としてタンパク質をコードするウイルスによって)またはトランスフェクション(例としてタンパク質をコードするプラスミドによって)され得る。かかる形質導入は、安定なまたは一過的な形質導入であり得る。いくつかの態様において、タンパク質を発現またはタンパク質を含有する細胞は、例えば塩基エディタの送達において、1以上のガイドRNA配列によって形質導入またはトランスフェクションされ得る。いくつかの態様において、タンパク質を発現するプラスミドは、エレクトロポレーション、一過的(例としてリポフェクション)および安定なゲノムインテグレーション(例としてヌクレオフェクションまたはpiggybac)およびウイルス形質導入、または当業者に知られている他の方法を通して細胞に導入され得る。

【0356】

いくつかの側面において、本発明は、非ウイルス送達方法を使用して、1以上の塩基エディタをコードするポリヌクレオチド、その1以上の転写物、および／またはそれから転写された1以上のタンパク質を細胞へ送達することを含む方法を提供する。核酸の非ウイルス送達の方法は、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ピロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質:核酸抱合体、裸のDNA、人工ビリオン、およびDNAの薬剤によって増強された取り込みを包含する。リポフェクションは、例として米国特許第5,049,386号明細書、米国特許第4,946,787号明細書;および米国特許第4,897,355号明細書)に記載され、リポフェクション試薬は市販されている(例としてTransfectam(商標)およびLipofectin(商標))。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適であるカチオン性および中性脂質は、Feignerの国際公開第1991/17424号;国際公開第1991/16024号のものを包含する。送達は、細胞(例としてin vitroまたはex vivo投与)または標的組織(例としてin vivo投与)に対してであり得る。

10

20

30

40

50

【0357】

ある特定の態様において、本明細書において提供される組成物は脂質および／またはポリマーを含む。ある特定の態様において、脂質および／またはポリマーはカチオン性である。かかる脂質粒子の調製は周知である。例として、米国特許第4,880,635号明細書；米国特許第4,906,477号明細書；米国特許第4,911,928号明細書；米国特許第4,917,951号明細書；米国特許第4,920,016号明細書；米国特許第4,921,757号明細書；および米国特許第9,737,604号明細書を見よ。これらの各々は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0358】

いくつかの態様において、標的ヌクレオチド配列は、ゲノム、例として真核ゲノム上のDNA配列である。ある特定の態様において、標的ヌクレオチド配列は哺乳動物(例としてヒト)ゲノム上にある。

10

【0359】

標的ヌクレオチド配列は、疾患、障害、または状態に関連する標的配列(例として点突然変異)を含み得る。標的配列は、疾患、障害、または状態に関連するTからC(またはAからG)の点突然変異を含み得、ここで、突然変異体C塩基の脱アミノ化は、疾患、障害、または状態に関連しない配列へのミスマッチ修復によって媒介される修正をもたらす。標的配列は、さもなければ、疾患、障害、または状態に関連するGからA(またはCからT)の点突然変異を含み得、ここで、突然変異体A塩基の脱アミノ化は、疾患、障害、または状態に関連しない配列へのミスマッチ修復によって媒介される修正をもたらす。標的配列はタンパク質をコードし得、ここで、点突然変異はコドン上にあり、野生型コドンと比較して突然変異コドンによってコードされるアミノ酸の変化をもたらす。標的配列はスプライス部位にもまたあり得、点突然変異は、野生型転写物と比較してmRNA転写物のスプライシングの変化をもたらす。加えて、標的はプロモータなどの遺伝子の非コード配列にあり得、点突然変異は遺伝子の増大または減少した発現をもたらす。

20

【0360】

それゆえに、いくつかの側面において、変異体Cの脱アミノ化は変異体コドンによってコードされるアミノ酸の変化をもたらし、これは、いくつかのケースでは、野生型アミノ酸の発現をもたらし得る。他の側面においては、変異体Aの脱アミノ化は変異体コドンによってコードされるアミノ酸の変化をもたらし、これは、いくつかのケースでは、野生型アミノ酸の発現をもたらし得る。

30

【0361】

組成物またはrAAV粒子と細胞を接触させることが関わる本明細書に記載される方法は、*in vitro*、*ex vivo*、または*in vivo*で生起し得る。ある特定の態様において、細胞を接触させるステップは対象において生起する。特定の態様において、対象は、疾患、障害、または状態と診断されている。いくつかの態様において、細胞を接触させるステップは*ex vivo*でまたは対象の外において生起する。

【0362】

いくつかの態様において、本明細書において開示される方法には、哺乳動物細胞を組成物またはrAAV粒子と接触させることが関わる。特定の態様において、方法には、網膜細胞、皮質細胞、または小脳細胞を接触させることが関わる。

40

【0363】

本明細書に記載される組成物は、それを必要とする対象へ、対象が患っている疾患または障害を処置および／または防止するための治療的有効量で投与され得る。CRISPR/Cas9に基づくゲノム編集テクノロジーを使用して処置および／または防止され得るいずれかの疾患または障害は、本明細書に記載される塩基エディタによって処置され得る。塩基エディタをコードするヌクレオチド配列がgRNAをさらにコードしない場合には、gRNAをコードする別個の核酸ベクターが本明細書に記載される組成物と一緒に投与され得るということは理解されるべきである。

【0364】

50

例示的な好適な疾患、障害、または状態は、限定なしに、心血管疾患、嚢胞性線維症、フェニルケトン尿症、表皮剥離性角質増殖症(EHK)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、シャルコー・マリー・トゥース病4J型、神経芽腫(NB)、フォン・ヴィレブランド病(vWD)、先天性ミオトニー、遺伝性腎アミロイドーシス、拡張型心筋症、遺伝性リンパ浮腫、家族性アルツハイマー病、プリオン病、慢性乳児神経皮膚関節症候群(CINCA)、先天性難聴、ニーマン・ピック病C型(NPC)疾患、およびデスミン関連ミオパチー(DRM)を包含する。いくつかの態様において、疾患または状態は心血管疾患である。いくつかの態様において、疾患または状態はニーマン・ピック病C型(NPC)疾患である。

【0365】

いくつかの態様において、疾患、障害、または状態は、終止コドン、例えば、遺伝子のコード領域内の未成熟終止コドンを導入する点突然変異に関連する。いくつかの態様において、所望の塩基編集は遺伝子のコード領域内の終止コドンを取り除きする。いくつかの態様において、所望の塩基編集は、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位を破壊する。

【0366】

いくつかの態様において、所望の塩基編集は、PCSK9遺伝子またはAngptl3遺伝子上のスプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位の破壊に関連する。ある特定の態様において、所望の塩基編集は、PCSK9遺伝子上のW8におけるスプライスアクセプター部位の破壊に関連する。いくつかの態様において、所望の塩基編集は、残基8においてスプライスアクセプター部位を破壊するAからGの編集であり、W8R置換を生成する。

【0367】

追加の例示的な疾患、障害、および状態は次を包含する:嚢胞性線維症(例として、Schwank et al., Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. Cell stem cell. 2013; 13: 653-658;およびWu et. al., Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. Cell stem cell. 2013; 13: 659-662を見よ。これらのいずれも、遺伝子欠陥を修正するためにデアミナーゼ融合タンパク質を使用していない);フェニルケトン尿症 - 例として、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ遺伝子の位置835(マウス)もしくは240(ヒト)または相同残基におけるフェニルアラニンからセリンの突然変異(T>C突然変異) - 例としてMcDonald et al., Genomics. 1997; 39:402-405を見よ;ベルナル・スーリエ症候群(BSS) - 例として、血小板膜糖タンパク質IXの位置55もしくは相同残基におけるフェニルアラニンからセリンの突然変異、または残基24もしくは相同残基におけるシステインからアルギニン(T>C突然変異) - 例としてNoris et al., British Journal of Haematology. 1997; 97: 312-320およびAli et al., Hematol. 2014; 93: 381-384を見よ;表皮剥離性角質増殖症(EHK) - 例として、ケラチン1の位置160もしくは161(開始メチオニンをカウントする場合)または相同残基におけるロイシンからプロリンの突然変異(T>C突然変異) - 例として、Chipev et al., Cell. 1992; 70: 821-828を見よ。www[dot]uniprot[dot]orgのUNIPROTデータベースのアクセッション番号P04264をもまた見よ;慢性閉塞性肺疾患(COPD) - 例として、 α_1 -アンチトリプシンのプロセシングされた形態の位置54もしくは55(開始メチオニンをカウントする場合)または相同残基あるいはプロセシングされない形態の残基78または相同残基におけるロイシンからプロリンの突然変異(T>C突然変異) - 例として、Poller et al., Genomics. 1993; 17: 740-743を見よ。UNIPROTデータベースのアクセッション番号P01011をもまた見よ;シャルコー・マリー・トゥース病4J型 - 例としてFIG4の位置41または相同残基におけるイソロイシンからトレオニンの突然変異(T>C突然変異) - 例として、Lenk et al., PLoS Genetics. 2011; 7: e1002104を見よ;神経芽腫(NB) - 例として、カスパーゼ-9の位置197または相同残基におけるロイシンからプロリンの突然変異(T>C突然変異) - 例として、Kundu et al., 3 Biotech. 2013, 3:225-234を見よ;フォン・ヴィレブランド病(vWD) - 例として、フォン・ヴ

10

20

30

40

50

イレブランド因子のプロセシングされた形態の位置509もしくは相同残基またはフォン・ヴィレブランド因子のプロセシングされない形態の位置1272もしくは相同残基におけるシステインからアルギニンの突然変異(T>C突然変異) - 例として、Lavergne et al., Br. J. Haematol. 1992を見よ。UNIPROTデータベースのアクセッション番号P04275をもた見よ;82: 66-72;先天性ミオトニー - 例として、筋肉塩素チャネル遺伝子CLCN1の位置277または相同残基におけるシステインからアルギニンの突然変異(T>C突然変異) - 例として、Weinberger et al., The J. of Physiology. 2012; 590: 3449-3464を見よ;遺伝性腎アミロイドーシス - 例として、アポリポタンパク質AIIのプロセシングされた形態の位置78もしくは相同残基またはプロセシングされない形態の位置101もしくは相同残基における終止コドンからアルギニンの突然変異(T>C突然変異) - 例として、Yazaki et al., Kidney Int. 2003; 64: 11-16を見よ;拡張型心筋症(DCM) - 例として、FOXD4遺伝子の位置148または相同残基におけるトリプトファンからアルギニンの突然変異(T>C突然変異)、例として、Minorette et al., Int. J. of Mol. Med. 2007; 19: 369-372を見よ;遺伝性リンパ浮腫 - 例として、VEGFR3チロシンキナーゼの位置1035または相同残基におけるヒスチジンからアルギニンの突然変異(A>G突然変異)、例として、Irrthum et al., Am. J. Hum. Genet. 2000; 67: 295-301を見よ;家族性アルツハイマー病 - 例として、プレセニリン1の位置143または相同残基におけるイソロイシンからバリンの突然変異(A>G突然変異)、例として、Gallo et al., J. Alzheimer's disease. 2011; 25: 425-431を見よ;プリオン病 - 例として、プリオンタンパク質の位置129または相同残基におけるメチオニンからバリンの突然変異(A>G突然変異) - 例として、Lewis et al., J. of General Virology. 2006; 87: 2443-2449を見よ;慢性乳児神経皮膚関節症候群(CINCA) - 例として、クリオピリンの位置570または相同残基におけるチロシンからシステインの突然変異(A>G突然変異) - 例として、Fujisawa et al. Blood. 2007; 109: 2903-2911を見よ;ならびにデスミン関連ミオパチー(DRM) - 例として、αβクリスタリンの位置120または相同残基におけるアルギニンからグリシンの突然変異(A>G突然変異) - 例として、Kumar et al., J. Biol. Chem. 1999; 274: 24137-24141を見よ。全ての参照およびデータベースエントリーの内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0368】

疾患または障害の処置は、疾患の発生もしくは進行を遅延させること、または疾患の重症度を低減することを包含する。疾患を処置することは、必ずしも治癒的な結果を要求しない。

【0369】

本明細書に使用されるとき疾患の発生を「遅延させること」は、疾患の進行を猶予する、妨害する、低速化する、遅らせる、安定化する、および／または延期することを意味する。この遅延は、疾患の既往および／または治療されようとする個体に依存して様々な時間の長さであり得る。疾患の発生を「遅延」もしくは緩和するまたは疾患の発症を遅延する方法は、方法を使用しないことと比較されるときに、所与の時間枠において疾患の1以上の症状を発生する確率を低減するおよび／または所与の時間枠において症状の程度を低減する方法である。かかる比較は、典型的には、統計的に有意な結果を与えるために十分な数の対象を使用する臨床試験に基づく。

【0370】

疾患の「発生」または「進行」は、疾患の当初の兆候および／またはその後の進行を意味する。疾患の発生は、当該技術分野において知られている標準的な臨床技術を使用して検出可能であり得、評価され得る。しかしながら、発生は、検出不可能であり得る進行をもた言う。本開示の目的のためには、発生または進行は症状の生物学的過程を言う。「発生」は生起、再発、および発症を包含する。

【0371】

本明細書に使用されるとき疾患の「発症」または「生起」は、当初の発症および／または再発を包含する。処置されるべき疾患の型または疾患の部位に依存して、単離されたポ

リペプチドまたは医薬組成物を対象へ投与するために、医学の業者に知られている従来の方法が使用され得る。

【0372】

いくつかの側面において、本開示は、医薬の製造における、本明細書に記載される開示される塩基エディタのいずれか1つおよびこの核酸塩基エディタを標的へと標的化するガイドRNAの使用を提供する。いくつかの側面においては、塩基編集のためのキットの製造における本明細書に記載される核酸塩基エディタおよびガイドRNAのいずれか1つの使用が提供される。ここで、塩基編集は、グアニン(G)による標的上のA:T核酸塩基対のアデニン(A)の置換またはチミン(T)による標的上のC:T核酸塩基対のシトシン(C)の置換に好適な条件下において、核酸分子を塩基エディタおよびガイドRNAと接触させることを含む。いくつかの態様において、接触させるステップは、標的領域における二本鎖DNAの分離を誘導する。いくつかの態様において、接触させるステップは、さらに、二本鎖DNAの一方のストランドをニッキングすることを含み、ここで、一方のストランドは突然変異していないストランドを構成する。

10

【0373】

記載される使用のいくつかの態様において、接触させるステップはin vitroで実施される。他の態様において、接触させるステップはin vivoで実施される。いくつかの態様において、接触させるステップは、対象(例としてヒト対象または非ヒト動物対象)において実施される。いくつかの態様において、接触させるステップは、ヒトまたは非ヒト動物細胞において実施される。いくつかの態様において、接触させるステップは、植物細胞において実施される。

20

【0374】

本開示は、医薬としての、本明細書に記載される核酸塩基エディタのいずれか1つまたは核酸塩基エディタおよびガイドRNAの複合体のいずれか1つの使用をもまた提供する。本開示は、医薬としての、本明細書における開示される核酸塩基エディタまたは複合体のいずれかを含む記載される医薬組成物または細胞、およびコードするベクターまたはrAAV粒子の使用をもまた提供する。いくつかの態様において、医薬は心血管疾患の処置のためである。

【0375】

いくつかの側面において、本開示は、核酸編集のためのキットの製造における、本明細書に記載される塩基エディタのいずれか1つおよびこの塩基エディタを核酸分子上の標的塩基対へと標的化するガイドRNAの使用をもまた提供する。ここで、核酸編集は、所望の塩基編集に好適な条件下において核酸分子を塩基エディタおよびガイドRNAと接触させることを含む。いくつかの態様において、所望の塩基編集は、グアニン(G)による標的A:T塩基対のアデニン(A)の置換である。これらの使用のいくつかの態様において、核酸分子は二本鎖DNA分子である。いくつかの態様において、接触させるステップは、標的領域における二本鎖DNAの分離を誘導する。いくつかの態様において、接触させるステップは、それによって、二本鎖DNAの一方のストランドをニッキングすることを含み、ここで、一方のストランドは、標的A:T核酸塩基対のTを含む突然変異していないストランドを構成する。

30

40

【0376】

記載される使用のいくつかの態様において、接触させるステップはin vitroで実施される。他の態様において、接触させるステップはin vivoで実施される。いくつかの態様において、接触させるステップは、対象(例としてヒト対象または非ヒト動物対象)において実施される。いくつかの態様において、接触させるステップは、ヒトまたは非ヒト動物細胞において実施される。いくつかの態様において、接触させるステップは、植物細胞において実施される。

【0377】

本開示は、医薬としての、本明細書に記載されるアデニン塩基エディタのいずれか1つの使用をもまた提供する。本開示は、医薬としての、本明細書に記載されるアデニン塩基

50

エディタおよびガイドRNAの複合体のいずれか1つの使用をもまた提供する。

【0378】

キット

本開示の組成物はキットにアセンブリされ得る。いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載される核酸塩基エディタの発現のための核酸ベクターを含む。いくつかの態様において、キットは、さらに、Cas9タンパク質または核酸塩基エディタを所望の標的配列へと標的化するための適当なガイドヌクレオチド配列(例としてgRNA)またはかかるガイドヌクレオチド配列の発現のための核酸ベクターを含む。

【0379】

本明細書に記載されるキットは、本明細書に記載される方法を行うための構成要素を収容する1以上の容器、および任意に使用説明書を包含し得る。本明細書に記載されるキットのいずれかは、アッセイ方法を行うために必要とされる構成要素をさらに含み得る。キットの各構成要素は、適用可能なところでは、(例として溶液中の)液体形態でまたは固体形態(例として乾燥粉末)で提供され得る。ある特定のケースでは、構成要素のいくつかは、例として、キットと共に提供されてもされなくてもよい好適な溶媒または他の種(例えば水)の追加によって、水戻し可能または別様に(例として活性形態へ)処理可能であり得る。

【0380】

いくつかの態様において、キットは、任意に、提供される構成要素の使用のための説明書および／またはプロモーションを包含し得る。本明細書に使用されるとき「説明書」は、指示および／またはプロモーションの構成要素を定め、典型的には、本開示のパッケージング上のまたはそれに結び付けられた書面の説明書が関わり得る。説明書は、説明書がキットと結び付けられるべきであるということをユーザが明確に認識するようないずれかの様式で提供されるいずれかの口頭のまたは電子的な説明書、例えば、オーディオビジュアル(例としてビデオテープ、DVDなど)、インターネット、および／またはウェブに基づく通信などをもまた包含し得る。書面の説明書は、医薬品または生物学的製品の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって指図された形態であり得る。これらは、動物投与のための製造、使用、または販売の当局による承認をもまた反映し得る。本明細書に使用されるとき、用語「プロモーションされる」は、本開示に関連する、教育、病院のおよび他の臨床の指示、科学的調査、創薬または医薬品開発、学術研究、医薬品販売を包含する製薬産業活動、ならびにいずれかの形態の書面の、口頭の、および電子的な通信を包含するいずれかの広告または他のプロモーション活動の方法を包含する業務をする全ての方法を包含する。加えて、キットは、本明細書に記載されるとおり、具体的な適用に依存して他の構成要素を包含し得る。

【0381】

キットは、本明細書に記載される構成要素のいずれか1以上を1以上の容器に含有し得る。構成要素は、無菌的に調製され、シリンジにパッケージングされ、冷凍で出荷され得る。代替的には、それは、保存のためのバイアルまたは他の容器に収容され得る。第2の容器は、無菌的に調製された他の構成要素を有し得る。代替的には、キットは、バイアル、チューブ、または他の容器において予め混合および出荷される活性な薬剤を包含し得る。

【0382】

キットは、付属品がパウチ、1以上のチューブ、容器、箱、またはバッグ内にバラバラにバックされた、プリスターパウチ、収縮包装パウチ、真空密封型パウチ、密封型熱成形トレー、または類似のパウチもしくはトレー形態などの種々の形態を有し得る。キットは、付属品が追加された後に滅菌され、それによって、容器中の個々の付属品がそれ以外の点では未包装であることを許し得る。キットは、放射線滅菌、熱滅菌、または当該技術分野で知られている他の滅菌方法などのいずれかの適当な滅菌技術を使用して滅菌され得る。キットは、具体的な適用に依存して、他の構成要素、例えば、容器、細胞培地、塩、緩衝剤、試薬、シリンジ、針、殺菌剤を適用するかまたは取り除くためのガーゼなどのファ

ブリック、使い捨て手袋、投与に先行する薬剤の支持体などをもまた包含し得る。

【0383】

宿主細胞

本明細書に記載される組成物のいずれかを含有し得る細胞は、原核細胞および真核細胞を包含する。本明細書に記載される方法は、Cas9タンパク質または核酸塩基エディタを真核細胞(例として、ヒト細胞などの哺乳動物細胞)内に送達するために使用される。いくつかの態様において、細胞はin vitroにある(例として培養細胞。いくつかの態様において、細胞はin vivoに(例としてヒト対象などの対象に)ある。いくつかの態様において、細胞はex vivoにある(例として対象から単離され、再び同じまたは異なる対象へ投与され得る)。

10

【0384】

本開示の哺乳動物細胞は、ヒト細胞、霊長目の動物細胞(例としてvero細胞)、ラット細胞(例としてGH3細胞、OC23細胞)、またはマウス細胞(例として、MC3T3(「3T3」)細胞またはマウス神経芽腫neuro-2A(「N2A」)細胞)を包含する。種々のヒト細胞株があり、限定なしに、ヒト胎児腎(HEKまたはHEK293T)細胞、HeLa細胞、国立癌研究所60癌細胞株(NCI60)からの癌細胞、DU145(前立腺癌)細胞、Lncap(前立腺癌)細胞、MCF-7(乳癌)細胞、MDA-MB-438(乳癌)細胞、PC3(前立腺癌)細胞、T47D(乳癌)細胞、THP-1(急性骨髄性白血病)細胞、U87(膠芽腫)細胞、SHSY5Yヒト神経芽腫細胞(骨髄腫からクローニングされた)、およびSaos-2(骨癌)細胞を包含する。いくつかの態様において、rAAVベクターは、ヒト胎児腎(HEK)細胞(例としてHEK 293またはHEK 293 T細胞)内に送達される。いくつかの態様において、rAAVベクターは、例えば多能性幹細胞(例として、ヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)を包含するヒト多能性幹細胞)などの幹細胞(例としてヒト幹細胞)内に送達される。幹細胞は、培養において無期限の期間分裂して、特化した細胞を生ぜしめる能力を有する細胞を言う。多能性幹細胞は、生物の全ての組織に分化することができるが、単独では完全な生物の発生を支えることができない幹細胞の型を言う。ヒト人工多能性幹細胞は、胚性幹細胞を定める特性を維持するために重要な遺伝子および因子を発現することを強制されることによって、胚性幹細胞様の状態へとリプログラミングされた(例として成熟または成体)体細胞を言う(例として、参照によって本明細書に組み込まれるTakahashi and Yamanaka, Cell 126 (4):663-76, 2006を見よ)。ヒト人工多能性幹細胞は幹細胞マーカーを発現し、全ての3つの胚葉(外胚葉、内胚葉、中胚葉)に特徴的な細胞を生成することができる。

20

30

【0385】

本開示に従って使用され得る細胞株の例は、293-T、293-T、3T3、N2A、4T1、7 21、9L、A-549、A172、A20、A253、A2780、A2780ADR、A2780cis、A431、ALC、B16、B35、BCP-1、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR 293、BxPC3、C 2C12、C3H-10T1/2、C6、C6/36、Cal-27、CGR8、CHO、CML T1、CMT、COR-L23、COR-L23/5010、COR-L23/CPR、COR-L23/R23、COS-7、COV-434、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、E14Tg2a、EL4、EM2、EM3、EMT6/AR 1、EMT6/AR10.0、FM3、H1299、H69、HB54、HB55、HCA2、Hepa1c1c7、High Five細胞、HL-60、HMEC、HT-29、HUVEC、J558L細胞、Jurkat、JY細胞、K562細胞、KCL22、KG1、Ku812、KYO1、LNCap、Ma-Mel 1、2、3....48、MC-38、MCF-10A、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-468、MDCK II、MG63、MONO-MAC 6、MOR/0.2R、MRC5、MTD-1A、MyEnd、NALM -1、NCI-H69/CPR、NCI-H69/LX10、NCI-H69/LX20、NCI-H69/LX4、NIH-3 T3、NW-145、OPCN/OPCT Peer、PNT-1A/PNT 2、PTK2、Raji、RBL細胞、RenCa、RIN-5F、RMA/RMAS、S2、Saos-2細胞、Sf21、Sf9、SiHa、SKBR3、SKOV-3、T-47D、T2、T84、THP1、U373、U87、U937、VCaP、WM39、WT-49、X63、YAC-1、およびYAR細胞を包含する。

40

【0386】

さらなる詳述なしに、当業者は上の記載に基づいて本開示を最大限まで利用し得ると思

50

われる。よって、以下の具体的な態様は単に例解的と解釈されるべきであり、絶対に決して本開示の残りを限定しない。本明細書において引用される全ての公開は、本明細書において参照される目的または主題について参照によって組み込まれる。

【実施例1】

【0387】

例1

本研究では、小さい高度に活性なABE8eバリエーションを構築し、AAVゲノム上の最小限の必要なシス作用構成要素を同定して、幅広いin vivo標的化能を有する高度に効率的なシングルAAVベクターを開発した。コンパクトなCjCas9、Nme2Cas9、およびSauriCas9ドメインを使用するABE8eバリエーションを、一連のシングルAAV、高活性アデニン塩基エディタを開発するためにキャラクタリゼーションした。これらは、普通に存在するN₄CCおよびN₂GG PAMを包含する幅広い範囲のPAM配列との適合性を総合的に提供し、原則としてヒトゲノム上のアデニンのおよそ82%の塩基編集を可能にした(図4Dを見よ)。最後に、シングルAAV ABEの性能を、減少した心血管疾患リスクに関連する塩基編集を組み入れるためにそれらを使用することによって、マウスにおいて評価した。ある範囲の臨床に該当する用量において、バルク肝臓におけるヒトPCSK9、マウスPcsk9、およびマウスAngptl3の効率的な編集(平均で50%であった)をもたらし、循環標的タンパク質、総コレステロール、およびトリグリセリドの付随する実質的な低減を有した。これらの知見は、塩基編集の治療潜在能力の前進を例解し、シングルAAV塩基エディタ構築物の利益を確立し、効率的なin vivo塩基編集を支持する幅広い総合的な標的化能を有する一連のシングルAAVアデニン塩基エディタを提供した。

【0388】

ABE送達のためのサイズが最小化されたAAVバックボーンの開発

小さい口バストなエディタSaABE8e(3.9kb)³⁰およびそのPAMバリエーションSaKKH-ABE8e^{30,33}から出発して、AAVゲノムの構成要素を最適化して、アデニン塩基エディタのサイズが最小化されたAAVに基づく送達を生じた。これにおいては、塩基エディタ全体、そのガイドRNA、ならびに全ての必要なプロモータおよび調節配列がシングルAAV上に存在した(ITRを包含せずに大凡 ≤ 4.9 kb)。最初に、N2Aおよび3T3細胞におけるin vivoゲノム編集の評価(タンパク質ノックダウンにかかわらず)を許すためのPcsk9を標的化する高効率ガイドRNAを、SaABE8eまたはSaKKH-ABE8eおよび内因性Pcsk9を標的化するスペーサを有する対応するsgRNAをコードするプラスミドをトランスフェクションすることによって同定した。各sgRNAの編集効率を、標的化されたハイスループットDNA配列決定(HTS)によって分析した(図6)。最も効率的なガイドRNAは、SaABE8eを使用してPcsk9にW8Rコード突然変異を組み入れた(図6)。

【0389】

シングルAAVゲノム上に全長SaABE8eタンパク質をコードするために、小さいユビキタスプロモータEFS(EF-1 α ショート)と、以前に検証されたターミネータ:ウシ成長ホルモン(bGH)ポリアデニル化シグナルを有するWPRE(W3)のガンマ部分とを使用して、効率的な分割インテイン塩基エディタ送達を生じた³⁴。複数のAAVアーキテクチャを試験するときの産生を単純化するために、Pcsk9 W8を標的化するsgRNAは別個のAAV上で提供した。

【0390】

最初に、第2のAAV上において送達された無傷のSaABE8eのin vivo編集活性を、以前に検証されたインテイン分割部位を使用して第2および第3のAAV上において送達されたインテイン分割SaABE8eのものと比較した²²(図1A)。複数の組織間で編集を評価するために、(1)EGFPおよびPcsk9を標的化するsgRNAならびに(2)無傷のAAV9 SaABE8eまたはインテイン分割AAV9 SaABE8eどちらかをコードする2つまたは3つのAAV9の混合物(図1a)を、6~7週齢の野生型C57BL/6Jマウスへ後眼窩注射によって全身投与した。sgRNA AAV対総塩基エディタAAVの1:1の混合物からなる高い総用量(8×10^{11} vgまたは 4×10^{13} vg/kg)または低い総用量(8×10^{10} vgまたは 4×10^{12} vg/kg)ど

10

20

30

40

50

ちらかのAAVを注射した。低い用量のAAVを、飽和する編集効率を回避するために、および異なるABE-AAVアーキテクチャ間の編集アウトカムの違いを観察する蓋然性を増大させるために、意図的に選んだ。注射の3週間後に、HTSによる分析のために、肝臓、心臓、および筋肉を採取した。

【0391】

無傷のおよびインテン分割SaABE8e AAV両方は、採取された組織間においてAAV9のトロピズムと整合した用量依存的なかつ組織依存的な編集活性をもたらした^{35,36}。肝臓は最も高い編集効率を示し、その後に心臓、次いで骨格筋であった。無傷のSaABE8e AAVは、投与された両方の用量においてロバストな編集を生じた。夫夫バルク肝臓、心臓、および骨格筋の59%、12%、および5.3%編集に達し、全ての試験された組織および用量において、インテン分割SaABE8eによって達成された編集効率と同程度かまたはより高かった(図1B)。sgRNA AAVの量を塩基エディタAAVの量の1/2または1/4に減少させることは、肝臓における編集効率には影響しなかったが、心臓および筋肉両方においては投与されたsgRNA AAVの2倍減少当たり編集効率を大凡1.4倍減少させ(図6)、ガイドRNAの用量が、これらの条件下においては肝外組織における編集効率を部分的に限定するということを指示した。

【0392】

次に、AAVゲノム上の最小限の必要な要素を同定することによって、ABE AAVの改善された編集効率およびサイズを最小化することを探求した。5つのAAVゲノムアーキテクチャを設計し、SaABE8eの送達について比較して、マウス最小微小ウイルス(MVM)イントロン³⁷を追加することによってEFSプロモータを改変すること、トランケーションされたWPREガンマサブユニットW3を取り除くことによってターミネータを改変すること、またはbGHポリアデニル化シグナルをSV40後期ポリアデニル化シグナルによって置き換えることのインパクトを評価した。以下のAAV発現カセットを設計および産生した：(1)EFS-SaABE8e-W3bGH、(2)EFS-MVM-SaABE8e-W3bGH、(3)EFS-MVM-SaABE8e-bGH、(4)EFS-SaABE8e-bGH、および(5)EFS-SaABE8e-W3-SV40。5つのAAV候補の各々を、後眼窩注射によって、高い用量(4×10^{11} vgエディタAAVプラス 4×10^{11} vg sgRNA AAV)または低い用量(4×10^{10} vgエディタAAVプラス 4×10^{10} vg sgRNA AAV)において6~7週齢の野生型C57BL/6Jマウスへ投与した(図2C)。

【0393】

AAV注射の3週間後に、肝臓、心臓、および骨格筋組織を採取した。各組織をHTSによって分析した。編集効率はアーキテクチャ間で整合したパターンを辿り、SaABE8e発現を駆動するEFSプロモータおよびW3なしのbGHポリアデニル化シグナルの最も高い効率の構築物(EFS-SaABE8e-bGH)は、全ての評価された用量および組織において他のアーキテクチャよりも高性能であった。これらのデータは、シス作用するW3エレメントが、これらの組織および細胞型におけるEFSプロモータからのSaABE8eの十分な発現に必要なではないということを実証し、具体的な編集適用の文脈においてAAV要素を評価することの重要性を強調した。

【0394】

シングルAAVアデニン塩基編集システムの開発

W3(250bp)の取り除きによって獲得されたスペースは、AAVゲノム上のsgRNA発現カセットの追加を許し、それによって、ABEおよびガイドRNA発現カセット両方を有するシングルAAVを可能にした(図2A)。U6 sgRNAカセットを3'ITRの近位に挿入した。この向きはインテン分割BE AAVにおいて塩基編集活性を増強することが以前に見出されたからである³⁴。このシングルAAV9 SaABE8eを、6~8週齢のC57BL/6Jマウスに、 4×10^{11} vgまたは 4×10^{10} vgの用量において後眼窩注射した。以前の実験に使用された塩基エディタAAVの用量とマッチし、以前に使用された総AAV用量の半分に対応する。今や、sgRNAは塩基エディタと同じAAVから発現されたからである。シングルAAV SaABE8eは、高いおよび低い用量両方において、肝臓において、2つの異なるAAVから発現された無傷のSaABE8eおよびsgRNAと総AAV用量の半分において類似の性能であ

った。高いおよび低い用量においてデュアルAAV SaABE8eによって達成された編集と類似に、シングルAAV SaABE8eは、夫々高いおよび低い用量においてバルク肝臓の64%および55%編集を生じた(図2B)。シングルAAV SaABE8eは、夫々高いおよび低い用量においてバルク心臓組織の23%および13%編集をもたもたらした。デュアルAAV ABEと比較して1.4倍および4.8倍高い編集効率に対応する(図2B、対応のないt検定によって夫々 $P=0.038$ および $P=0.0012$)。シングルAAV SaABE8eは、デュアルAAV処置と比較して、骨格筋においては高いおよび低い用量においてデュアルAAV SaABE8eと同程度の編集を生じ、夫々高いおよび低い用量において7.8%および5.5%を生じた(図2B)。

【0395】

次に、シングルAAV ABE構築物を、マウス当たり 8×10^{11} vgの用量において評価した。マウス当たりの総AAV用量において、2つのAAVを要求する上で記載された高用量実験のものと同じ。編集のさらなる改善が、より低い用量と比較して、特に心臓および筋肉において観察された。これらは夫々33%および22%の平均効率で編集された(図2C、図8Aおよび8B)。編集のこのレベルは、AAVの同じ総量において、エディタおよびsgRNAが別個のAAV上において送達されたデュアルAAV SaABE8eからの塩基編集の最も高い観察されたレベルと比較して、夫々心臓および筋肉における編集の2.1倍および2.5倍の増大に対応した(図2C、対応のないt検定によって夫々 $P=0.00048$ および $P=0.0020$)。SaABE8eの比較的広い編集ウィンドウはin vivoで維持され、インデルは各組織において低く留まる(図8Aおよび8B)。

【0396】

次に、組織におけるAAVゲノムの形質導入の度合いを、デジタルドロップレットPCR(ddPCR)によって定量した。編集効率は各組織において送達されたゲノムの数量と相関するということが観察された(図20)。肝臓はAAV9による形質導入を心臓および筋肉よりもかなり受けやすかった。シングルおよびデュアルAAV戦略の間における編集の最も大きい違いを有する組織は、肝臓よりも効率的に形質導入されなかった。AAV9の生体内分布の以前の分析と整合する⁷⁵。心臓および筋肉組織は類似の度合いで形質導入された。これは、EFSプロモータが心臓においてより活性であるということを示し得るか、または組織不均一性の効果を反映し得る。

【0397】

シングルAAV ABE注射からの肝臓、心臓、および筋肉組織において達成される塩基編集のレベルは、多くの遺伝子疾患について治療上の利益を提供するために充分であろう^{21,38-40}。これらのデータは、 $\leq 10^{14}$ vg/kgという臨床的に該当する用量においてこれらの組織における報告された最も高い体細胞のin vivo塩基編集のいくつかに相当した^{21,26,34,41}。一緒にすると、これらの結果は、この操作されたシングルAAV ABEアーキテクチャがin vivoのロバストなゲノム編集を媒介するということを実証し、特に、より良く形質導入されない組織においてまたはより低い総用量のAAVが使用されるときに、デュアルAAV法と比べてシングルAAVシステムの利益を強調した。

【実施例2】

【0398】

例2

幅広い総合的なPAM適合性を有する一連のサイズが最小化されたABEの開発

SaCas9(3.16kb、PAM=NNGRRT)または操作されたバリエーション、たとえばSaKKH³(3.16kb、PAM=NNNRRT)のものよりもシングルAAV ABEの標的化範囲を広げるために、小さいCasオーソログNme2Cas9^{42,43}(3.24kb、PAM=N₄CC)、CjCas9^{44,45}(2.95kb、PAM=N₄RYAC)、およびSauriCas9⁴⁶(3.18kb、PAM=N₂GG)のニッカーゼ形態を使用するABE8eの編集活性をプロファイリングした。複数の遺伝子座間でこれらのサイズが低減されたABEの活性をプロファイリングするために、各エディタおよびPAMをマッチした部位を標的化する対応するsgRNAをコードするプラスミドを、HEK293T細胞にトランスフェクションした。3日後に、細胞を標的化されたハイスループットD

10

20

30

40

50

NA配列決定によって分析した(図3A~3C)。

【0399】

試験された小さいABEの全ての3つは、HEK293T細胞における効率的な塩基編集を支持し、各標的部位におけるピーク効率は一般的に40~70%の範囲であった。より小さいCasバリエーションから構成される塩基エディタについての先行研究と整合して^{30,47,48}、Nme2ABE8e、CjABE8e、およびSauriABE8eは、全て、SpCas9に基づくABE8eと比較して幅広い塩基編集ウィンドウを見せた。Nme2ABE8eでは、編集ウィンドウは24 ntプロトスペーサの遠位半分のかなり(PAMを位置25~30としてカウントして位置2~19)に及び、改善された編集が位置6と17との間で生じた(図3Aおよび4A)。試験された3つの小さいCasバリエーションの最も小さいCjABE8eでは、ウィンドウはさらに大きく、PAMを位置24~31としてカウントして位置2~18に及び、最適な編集は位置3と15との間で生じた(図3Bおよび4B)。CjABE8eは、他の試験されたABEよりも、融合されたデアミナーゼの文脈選好性に敏感であるようにもまた見えた。編集効率は、標的アデニンの5'の核酸塩基に依存して実質的に様々であった(YA>>RA)。SauriCas9-ABE8eの編集ウィンドウは、典型的にはプロトスペーサ位置3~16の範囲であり(PAMを位置22~25としてカウントする)、改善された編集が位置5~15の間で生じた(図3Cおよび4C)。これは、近縁のSaCas9によって可能にされた広い編集ウィンドウに似ていた。SauriCas9の幅広いPAM適合性(3'NNGG)は、シングルAAV塩基エディタによる以前にキャラクタリゼーションされたSpCas9標的(3'NGG PAM)へのアクセスを許した。

【0400】

4つの小さいABE8eバリエーション(SaKKHABE8e、Nme2ABE8e、CjABE8e、およびSauriABE8e)の総合的な標的化範囲を、これらのバリエーションの少なくとも1つによって標的化可能であるhg38ヒト参照ゲノム全体におけるアデニンの数を決定することによって評価した。各アデニンを取り巻く配列文脈を、適当な塩基編集ウィンドウ内に各アデニンを置くであろう小さいABE8eによって標的化可能なPAMの存在について分析した。この分析は、ヒトゲノム上の全てのアデニンの82%が、原則としてこれらの4つの小さいABE8eバリエーションの少なくとも1つによって標的化可能であるということを明らかにした。このデータは、シングルAAV ABEプラットフォームが潜在的にはゲノム上のアデニンの大多数を標的化し得るということを示唆したが、いくつかのケースでは、バイスタンダー編集が追加の突然変異をもたらし得、これらのおよそ半分は非サイレントであろう⁴⁹。

【0401】

培養細胞における小さいCas ABEによるPcsk9およびAngptl3のアデニン塩基編集

シングルAAV ABEシステムのin vivoの治療上の潜在能力を試験するために、Pcsk9またはAngptl3タンパク質レベルをノックダウンすることによって、ヒトにおける減少した心血管病リスクと関連する突然変異をマウスに組み入れた⁵⁰⁻⁵²。これらのタンパク質のノックダウンは、循環タンパク質および総コレステロールを包含する血清バイオマーカーのレベルを低減した。加えて、Angptl3がノックダウンされたときには、トリグリセリドのレベルが低減され、編集効率のロバストな機能評価を容易にした。SaABE8e、SaKKH-ABE8e、および新たに設計されたSauriABE8eを使用して、開始コドン、スプライスドナー、およびスプライスアクセプターを破壊して⁵³、二本鎖切断に依拠することまたはインデル形成なしに標的化されたタンパク質の産生を遮断した。

【0402】

最初に、HEK293T細胞におけるヒトPCSK9(図9A)またはNeuro-2a細胞におけるマウスPcsk9およびAngptl3(図9Bおよび9C、10Aおよび10B)上の部位を標的化するsgRNAおよびサイズが低減されたABE8eをコードするプラスミドのトランスフェクションによって、Pcsk9またはAngptl3の産生を破壊するように設計されたガイドRNAの編集活性を測定した。標的化された遺伝子座におけるゲノムDNAのディープシーケンシングによって測定した塩基編集効率は検出不可能から89%まで様々であった。ヒトPCSK9およびマウスPcsk9のエクソン1スプライスドナー部位ならびにマウスAngptl3のエクソン6スプライスドナーを標的化する3つの高効率SaKKH-ABE8eガイドRNA、ならびにマ

ウスPcsk9のエクソン1スプライスドナー部位を標的化するSauriABE8e sgRNAを、in vivo実験へと前進させた。

【0403】

マウスにおけるPcsk9およびAngptl3のシングルAAVアデニン塩基編集

対応するサイズが最小化されたABE8eバリエーションと一緒にPCSK9、Pcsk9、およびAngptl3を標的化するsgRNAによるin vivo編集活性を評価するために、マウス肝細胞に効率的に形質導入する血清型のAAV8においてシングルAAV ABEを調製し⁵⁴、マウス当たり 1×10^{11} vg(5×10^{12} vg/kg)の用量で後眼窩注射を介して6~8週齢のマウスへ全身投与した。SaKKH-ABE8eおよびヒトPCSK9のエクソン1スプライスドナーを標的化するsgRNAをコードするAAV8を、ヒトPCSK9配列を含有するヒト化マウスに注射した⁵⁵。類似に、SaKKH-ABE8e、SaKKH-ABE8e(V106W)、もしくはSauriABE8eおよびマウスPcsk9のエクソン1スプライスドナーを標的化するエディタをマッチしたsgRNA、またはSaKKH-ABE8eおよびマウスAngptl3のエクソン6スプライスドナーを標的化するsgRNAをコードするAAV8を、野生型C57BL/6Jマウスに注射した。4週間後に、バルク肝臓組織をHTSによって分析した。これらの処置は、夫夫、SaKKH-ABE8eを使用したヒトPCSK9、SaKKH-ABE8eを使用したマウスPcsk9、SauriABE8eを使用したマウスPcsk9、およびSaKKH-ABE8eを使用したマウスAngptl3について、バルク肝臓組織の44%、54%、46%、および61%塩基編集を達成した(図5B)。HEK293TおよびN2A培養細胞における各標的の相対的な編集効率(図9A~9C)は、in vivoの相対的な編集効率に匹敵した(図5B)。ガイド非依存的なDNAおよびmRNAオフターゲット編集を低減する進化したTadA-8eデアミナーゼの変異体を使用するSaKKH-ABE8e(V106W)は⁷⁶、in vivoで高い編集効率を維持した。これらのシングルAAVのin vivo塩基編集効率は、マウスにおける前臨床試験において報告されたPcsk9およびAngptl3を標的化する報告されたLNPによって媒介されるABE mRNA肝臓送達方法のものに接近した^{41,58}。

【0404】

Pcsk9エクソン1スプライスドナーを標的化するシングルAAV8 SaKKH-ABE8e(1×10^{11} vg)の編集活性を、同じスプライスドナーを標的化することによってin vivoでPcsk9を効率的に編集およびノックダウンすることが検証されたSpCas9 sgRNA^{41,59}と対形成した以前に最適化された³⁴デュアルAAV分割インティンSpABE8eアーキテクチャと比較した。シングルAAV8 SaKKH-ABE8eおよびデュアルAAV8 SpABE8eを、3つの用量(マウス当たり 1×10^{11} vg、 1×10^{10} vg、または 1×10^9 vg総AAV)において、6~8週齢のC57BL/6Jマウスへマウス当たり同じ総用量で投与した。Pcsk9エクソン1スプライスドナーの破壊を、HTSによって、投与の4週間後に肝臓において測定した。使用された最大vg/kg用量(20gマウスでは 5×10^{12} vg/kg)は、遺伝子治療の非ヒト霊長目の動物研究およびヒト試験で使用されたものと同程度かまたはそれよりも低かった^{6,60}。シングルおよびデュアルAAV ABEシステムは各用量において類似の性能であり、シングルAAVは、夫夫 1×10^{11} vg、 1×10^{10} vg、および 1×10^9 vgの用量においては肝臓において54%、38%、および3.7%の平均編集を生じ(図4C)、肝臓におけるデュアルAAV SpABE8eを介する編集はAAVの同じ用量において夫夫平均で57%、35%、および1.0%であるということが観察された。対応のないt検定によると、いずれかの用量において有意な違いはなかった。これらの結果は、シングルAAV ABEが、治療上該当する遺伝子座において、ある範囲の用量において、高度に活性な以前に最適化されたデュアルAAV SpABE8eと同程度の性能であることを示した³⁴。デュアルSpABE8e編集データは、Banskota et al. Engineered virus-like particles for efficient in vivo delivery of therapeutic proteins. Cell 185(2):250-265 (2022)においてもまた報告されている。これは参照によって本明細書に組み込まれる。

【0405】

肝臓における分割SpABE8eに対して相対的なシングルAAVプラットフォームの少々の見かけ上の編集効率改善を検討するために、6~8週齢のC57BL/6マウスへの後眼窩全

10

20

30

40

50

身送達によるマッチしたプロモータおよびポリAシグナルを有するシングルAAV8 SaKKH-ABE8eおよびデュアルAAV8インテイン分割SaKKH-ABE8eによる編集を、2つの用量において比較した(図5D)。シングルおよびデュアルAAVインテイン分割SaKKH-ABE8eは、 1×10^{11} vgの高い用量においては類似の編集頻度を示した(夫夫50%および46%。対応のないt検定によると有意ではない);しかしながら、デュアルAAVインテイン分割SaKKH-ABE8eは、 1×10^{10} vgの低い用量においてはシングルAAV SaKKH-ABE8eと比較して著しく低減された活性を示した(夫夫5.2%対29%、 $P=0.0004$)。これらのデータは、シングルAAV SaKKH-ABE8eが、AAV形質導入がすでに飽和またはそれに近い条件下において、最適化されたデュアルAAV SpABE8eと類似の性能であり得ることを指示している。この観察は、SpABE8eのより高い活性、ならびに／あるいはインテイン分割および2つの形質導入事象の限定を克服する2つのAAVゲノム上の余分なスペースに包含され得るシス調節エレメントによって授けられる増大した活性を原因とし得る。しかしながら、AAV形質導入が飽和よりも良く下である適用では、シングルAAV送達の実質的な編集効率改善をもたらし得る。シングルAAV ABEにパッケージングされたAAVゲノムのインテグリティをもまた評価した。シングルAAV ABEおよびより小さいインテイン分割デュアルAAV ABEのアルカリゲル電気泳動の結果(図21)は、シングルAAV ABEが、全長のおよびトランシェーションされたゲノム種を効率的にパッケージングし得るということを指示した。それらのサイズがAAVパッケージング限度またはその近くであることと整合している¹⁹。

10

20

30

40

50

【実施例3】

【0406】

例3

Pcsk9およびAngptl3の編集による循環タンパク質および脂質の低減

肝臓で観察された効率的な編集が、効率的な標的遺伝子ノックダウンおよび循環脂質レベルの付随する低減に転化するかどうかを評価するために、エディタ処置されたマウスから逐次的に採血し、標的化されたタンパク質および総コレステロールの血漿レベルを測定した。コレステロールまたは脂質代謝に影響することが予想されない編集、Dnmt1を標的化するデュアルAAV ABE7.10の非標的化対照を、比較のために包含した(図11Aおよび11B)。 1×10^{11} vg(5×10^{12} vg/kg)シングルAAV SaABE8eまたはSaKKH-ABE8eの用量における全ての実験条件下の完全なタンパク質ノックダウンが4週までに観察され、ほとんどのノックダウンは2週までに明白であった(図5D~5F)。Dnmt1はDNAメチルトランスフェラーゼ1をコードする。平均では、この用量におけるシングルAAV ABE処置は、Dnmt1標的化ガイドRNAをコードするAAVによって処置された対照動物と比較して、夫夫ヒトPCSK9、マウスPcsk9、およびマウスAngptl3タンパク質レベルの99%、91%、および94%ノックダウンをもたらした。これらのタンパク質のノックダウンは、肝臓への報告されたLNPによって媒介されるABE mRNA送達によって達成された結果とマッチした^{41,58}。タンパク質ノックダウンのこの高いレベルは、観察された編集レベルともまた整合する(図4B)。AAV8の肝細胞トロピズム⁵⁸、および肝細胞がマウス肝臓の大体70%を構成するという事実⁵⁷は、バルク肝臓組織における44~61%の編集が肝細胞における約60~85%の塩基編集に対応するということを含意するからである。

【0407】

タンパク質ノックダウンは、全てのABE処置されたマウスにおいて減少した循環コレステロールをもたらした(図5G~5I)。ヒトPCSK9標的化されたマウスにおける血漿総コレステロールは、4週間後にベースラインレベルから45mg/dLに24%減少した。Pcsk9標的化されたマウスにおける最も高いAAV用量においては、血漿コレステロールは、年齢をマッチした非標的化対照と比較して、4週間後に53mg/dLに平均で25%低下した(図5Hおよび13E)。これは肝臓特異的なPcsk9ノックアウトマウスにおいて観察されたコレステロール低下の度合いに近い⁶¹。Angptl3標的化されたマウスでは、年齢をマッチした非標的化対照と比較して、44mg/dLへの血漿コレステロールの38%減少が観察された。これらの結果は、シングルAAV ABEを使用したコレステロールの実質的低下を

実証した。

【0408】

AAV用量および編集の用量依存性を、循環Pcsk9および総コレステロールについて評価した。マウスPcsk9のノックダウンおよび総血漿コレステロールの減少は用量依存的であり、各用量で観察された編集のレベルを密に反映した(図12A~12B、13A~13E)。シングルAAV ABE8eと類似の編集レベルを成就したデュアルSpABE8eもまた、用量依存的な様式で減少した血漿コレステロールをもたらした(図12C~12D)。マウスPcsk9を標的化するシングルおよびデュアルAAV ABE両方について、コレステロールおよびタンパク質ノックダウンは、投与されたエディタの型にかかわらず編集パーセンテージと密に相関した。

10

【0409】

Angptl3の機能喪失アレルはコレステロールおよびトリグリセリド両方のレベルを低減することが知られているため⁶²、血漿トリグリセリドをAngptl3標的化されたマウスにおいて測定した。Angptl3標的化されたマウスでは、循環トリグリセリドの45%減少が、4週間後に非標的化対照と比較して25mg/dLまで観察された(図5K)。シングルAAV ABEによってここで達成された循環Angptl3、コレステロール、およびトリグリセリドの編集および低減は、蓋然的には、Angptl3をノックダウンするための標的化されたゲノム編集によって報告された最も高いものである^{58,63}。一緒になって、これらの結果は、複数の治療上該当する遺伝子座におけるロバストな塩基編集がシングルAAV ABEによって達成され、成体マウスにおける標的タンパク質レベルおよび代謝変化に対する強い効果をもたらすことを実証した。

20

【0410】

追加の編集実験:オフターゲット効果

最後に、シングルAAV ABEによって処置されたマウスにおける肝臓形態学およびオフターゲット編集を評価した。1×10¹¹vgにおいてシングルAAV8 SaKKH-ABE8eおよびPCSK9エクソン1ドナーを標的化するガイドによって処置されたマウスからの肝臓に対して実施された組織学は、投与の4週間後に、無処置マウスに対して相対的な形態学的変化を指示しなかった(図19Aおよび19B)。

【0411】

図15~17に示されるとおり、シングルAAV SaKKH-ABE8eのオンターゲット編集は、Pcsk9エクソン1スプライスドナー部位において、デュアルAAV SaKKH-ABE8eのオンターゲット編集と同程度であるかまたはそれよりも良かった。オンターゲット編集比較の結果を図14に示す。この実験では、インデル率は0%に接近した。

30

【0412】

細胞培養におけるオフターゲット編集が、SaCas9に基づくゲノム編集剤についてキャラクター化されているが、in vivoのSaCas9に基づく編集剤によって処置された組織におけるオフターゲット編集は報告されていない^{22,74}。シングルAAV ABEのin vivoオフターゲット編集を評価するために、マウスPcsk9エクソン1を標的化する1×10¹¹vgシングルAAV8 SaKKH-ABE8e、1×10¹¹vgシングルAAV8 SaKKH-ABE8e(V106W)、または5×10¹⁰vgのデュアルAAV8 インタイン分割SaKKH-ABE8eの各半分によって処置された6~8週齢のC57BL/6Jマウスの肝臓組織、これらの3つのエディタの投与の4週間後。これらの肝臓からの計算上予測された上位3つの部位^{77,78}を配列決定した。低いが検出可能な(最高で0.45%)用量依存的な編集頻度が、シングルAAV SaKKH-ABE8eについて、in vivoの1つのオフターゲット部位にあり、観察された(図16Aおよび16B)。これは、観察されたオフターゲット編集は検査された部位で比較的稀であったが、シングルAAV ABEを使用するときにオフターゲット編集アウトカムを考慮することの重要性を示唆する。

40

【0413】

このin vivoオフターゲット編集はシングルAAV SaKKH-ABE8e(V106W)バリエーションの投与によって改良された。これは、ガイド非依存的なDNAオフターゲット編集およ

50

びmRNAオフターゲット編集を低下させることが報告されている^{30,76}。それは、デュアルAAVインテイン分割SaKKH-ABE8eの投与によってもまた改良された。これは、インテイン連結されたABE8eのそもそものより低い総体的な活性、または完全な塩基エディタのより低い用量を原因とし得るが、*in vitro*プラスミドトランスフェクションによるN2A細胞における全長またはインテイン分割SpABE8eオフターゲット編集間の有意な違いは観察されなかった(図16B)。図16Cに示すとおり、HEK293T細胞を、全長SpABE8eまたはインテイン分割SpABE8eおよびヒトPCSK9エクソン1スプライスドナー部位を標的化するsgRNAをコードするプラスミドによってトランスフェクションした。CIRCLE-seqによって予測されたオフターゲットを、トランスフェクションの3日後にハイスループットDNA配列決定(HTS)によって分析した。

10

【0414】

次に、本発明者らは、いくつかの部分的なTadA認識配列を含有する検証されたABE mRNAオフターゲットヒトアンプリコンのマウスホモログのcDNAアンプリコンを分析することによって⁷⁶、シングルAAV8にコードされるSaKKH-ABE8eエディタによるマウスの処置からもたらされる*in vivo*のオフターゲットmRNA編集を評価した。具体的には、成体C57BL/6Jマウスに、 1×10^{11} vgシングルAAV8 SaKKH-ABE8eとPcsk9エクソン1スプライスドナー部位を標的化するsgRNAまたは生理食塩水を後眼窩注射した。注射の4週間後に、RNAを肝臓組織から単離し、逆転写した。cDNAアンプリコンAars、Canx/IP90、Ctnnb、およびUsp38をHTSによって分析した。無処置マウスと比較して、オフターゲットmRNA編集は観察されなかった(図22A~22D)。特に、無処置マウスからのものに対して相対的な、シングルAAV ABE処置されたマウスからの肝臓におけるmRNAオフターゲット編集の有意な増大は、4つの測定されたcDNAにおいて観察されなかった。これらの結果は、シングルAAV ABEが、試験されたガイドRNAについては低いレベルの*in vivo*のオフターゲットDNAおよびRNA編集を維持するということと、デアミナーゼ突然変異が*in vivo*のオフターゲット編集をさらに最小化し得るということを示唆する。

20

【0415】

最後に、開示されるAAVにコードされる塩基エディタの編集ウィンドウの幅の分析を実施した。ABEを、後眼窩注射によって 1×10^{11} vgの総用量でAAV8によって送達し、肝臓を注射の4週間後にHTSのために採取した。図18に示されるとおり、SaKKH-ABE8eおよびSauriABE8eの編集ウィンドウは13ヌクレオチドほども大きく、広い編集ウィンドウを構成する。

30

【0416】

総体的に、これらの結果は、オンターゲット編集が、シングルAAV8 SaKKH-ABE8e、シングルAAV8 SaKKH-ABE8e(V106W)、およびデュアルAAV8インテイン分割SaKKH-ABE8eについて同程度であるということを示唆する。

【0417】

考察

アデニン塩基エディタおよびAAV構成要素のサイズを最小化することによって、一連のシングルAAVアデニン塩基エディタシステムを開発した。これらは*in vivo*のロバストな編集を支持し、それらの総合的なPAM適合性を原因として幅広い標的化能を有する。シングルAAV ABEは、夫々肝臓、心臓、および筋肉において最高で66%、33%、および22%編集という塩基編集効率を支持し、特に組織型またはAAV用量が形質導入のレベル飽和を防止したときにはデュアルAAVアプローチよりも高性能であった。用量をマッチしたデュアルAAVと比較して最も大きい編集効率増大は心臓で2.1倍、骨格筋で2.5倍であり、潜在的には、これらの組織における比較的低い形質導入効率を原因とした。これらの知見は、シングルAAVプラットフォームが、心臓および骨格筋などの非肝臓組織を標的化するときにはまたは毒性がAAV投与量を限定するときに、特に好ましい場合があるということを示唆した(図2C)。

40

【0418】

50

血清型AAV8およびAAV9を有するシングルAAV ABEを、複数の血清型にパッケージングした。これは、肝臓外におけるまたは代わりとなる投与経路による種々の組織および細胞型における編集を容易にした。LNPによって媒介されるmRNA送達是最も強力である臓器の肝臓における塩基編集でも、シングルAAV ABEは、報告された前臨床のLNPによって媒介されるmRNA送達と同程度の編集効率、標的タンパク質ノックダウン、および所望の表現型変化をもたらした^{41,59}。LNPによって媒介される送達が特に効率的ではない心臓などの臓器において、本明細書に記載されるシングルAAVシステムは特に有用だと判明し得る。

【0419】

シングルAAV塩基エディタ送達は、現行では、遺伝子サイズが大凡 ≤ 3.2 kbの小さいCas酵素を使用するABEに限定される。SpCas9-ABEによって標的化可能なものと類似の標的化可能なゲノムを一緒になってカバーする種々のサイズが低減されたABEの活性が実証された。ゲノムアデニンの大体82%が、本開示に記載される一連のサイズが最小化されたABEを使用して編集され得るということが推定される。小さい画分だけがいずれかのバイスタンダー編集なしで標的化され得るが、多くの適用では、バイスタンダー編集は許容され得る。例えば、それはサイレントなもしくは良性の突然変異をもたらすから、標的が非コード調節配列上にあるから、または適用が配列の機能を破壊しようとするからである。配列文脈選好性または変調した活性ウィンドウの場所を見せるシングルAAV塩基エディタを分析するためのさらなる作業が進行中であり^{48,64}、シングルAAVのin vivo塩基編集の適用可能性をさらに広げるであろう。

【0420】

本明細書に記載されるシングルAAV ABEシステムはin vivoのロバストな編集効率を生じ、AAVの中等用量において、肝臓、心臓、および筋肉組織における治療上該当するレベルの編集を容易にした。AAVは、LNPなどのテクノロジーによってアクセス不可能な組織の標的化を許すが、AAVに関連する毒性は、NHPおよび治験において高い用量において認識された^{65,66}。動物研究は、AAVゲノムインテグレーションが肝細胞癌に至り得るということをもまた指示しているが⁶⁷、組換えAAVベクターによって処置されたヒトでは、肝臓腫瘍とAAVとの間の因果関係は確立されていない^{68,69}。AAVの治療上のランドスケープは継続して探索されているが、これらの限定は、治療上の標的編集レベルを達成するために必要とされるAAVの量を限定する、高度に強力な編集剤の潜在的な安全上の利点を示唆する。AAVを介して送達される遺伝子編集剤に対する免疫応答は、大型動物モデルにおいて詳しくキャラクター化されたわけではない。初期のデータは、AAVから発現された非自然状態のヌクレアーゼを使用した安定なゲノム編集が、主要な有害作用なしに非ヒト霊長目の動物において達成可能であるということを示した⁷⁰。編集剤の誘導性発現のためのシステム⁷¹および代替的な送達ベクター、たとえば操作されたウイルス様微粒子(eVLP)^{72,73}もまた、サイズが低減された塩基エディタの投与に組み込まれ得る。

【0421】

方法

分子生物学

組織培養のための発現ベクターは、KLD、Gibson、またはUSERアセンブリを使用してクローニングした。sgRNA発現プラスミドはKLDまたはGoldengateアセンブリを介してクローニングして、表1において指示されるプロトスペーサを組み入れた。塩基エディタプラスミドは、PCR増幅されたフラグメントのUSERアセンブリまたはGibsonアセンブリを介してクローニングした。rAAVゲノムをコードするプラスミドは、プラスミド制限フラグメントおよびGibson適合性のオーバーハングを有するPCRアンプリコンのGibsonアセンブリによってクローニングした。哺乳動物組織培養実験のための全てのプラスミドは、Plasmid Plus MaxiprepまたはMidiprepキット(Qiagen)、ZymoPURE II Midiprepキット(Zymo Research)またはPureYieldプラスミドミニプレップキット(Promega)を使用して精製した。

【0422】

HEK293TおよびN2A細胞の培養およびトランスフェクション

HEK293T細胞(ATCC CRL-3216)およびNeuro-2A細胞(ATCC CCL-131)は、10%(v/v)FBSを足したダルベッコ改変イーグル培地プラスGlutaMax(Thermo Fisher Scientific)において、37℃、5%CO₂で維持した。トランスフェクションの16~24時間前に、HEK293T細胞またはN2A細胞を、96ウェルプレート(Corning)上に、 $1.4 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^4$ 細胞/ウェルで>90%生存率で播種した。または、SauriABEトランスフェクションでは、HEK293T細胞を48ウェルプレート(Corning)上に、 4.0×10^4 細胞/ウェル、>90%生存率で播種した。96ウェルプレート上の細胞を、およそ70~85%のコンフルエンスにおいて、ウェル当たり0.5μLのLipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)および187.5ngの塩基エディタプラスミド、37.5ngのsgRNAプラスミド(SauriABE8eでは180ngエディタおよび60ng sgRNA)によってトランスフェクションした。48ウェルプレート上の細胞を、750ngエディタおよび250μL sgRNAによって、1.5μL Lipofectamine 2000によってトランスフェクションした。細胞をトランスフェクション後に72時間培養した。次に、培地を取り除き、細胞を1×PBS(Thermo Fisher Scientific)によって洗浄し、ゲノムDNAを、96ウェルプレートではウェル当たり30~60μL溶解緩衝剤[10mM Tris-HCl、pH7.5~8.0、0.05%SDS、20μg/mLプロテイナーゼK(New England Biolabs)]、48ウェルプレートではウェル当たり150μLの追加によって抽出した。ゲノムDNAは、さらなる使用まで、一時的に4℃においてまたはより長期に-20℃において保存した。

10

20

【0423】

ハイスループット配列決定およびデータ分析

ゲノムDNAを、0%~3%DMSOが追加されたPhusion Hot Start II DNAポリメラーゼまたはPhusion U Hot Start DNAポリメラーゼを使用するPCRによって増幅した。Illumina配列決定のためのバーコードを、1μLのファーストPCRを鋳型として使用するセカンドPCRステップを介して追加した。PCRバイアスを回避するために、総PCRサイクルは最小に保った。バーコード化されたPCR産物をアンプリコンに従ってプールした。ゲルを抽出し(MinElute;Qiagen)、qPCR(KAPA;KK4824)またはQubit dsDNA HSアッセイキット(Thermo Fisher Scientific)によって定量した。プールされたライブラリの配列決定は、Illumina MiSeqを使用して、製造者の説明書に従って実施した。ゲノムDNAからの各遺伝子座の増幅のためのプライマーを表3にまとめる。

30

【0424】

配列決定リードは、MiSeq Reporter(Illumina)を使用してデマルチプレックスした。参照配列に対するアンプリコン配列のアラインメントを、「discard_indel_reads」オンでCRISPResso2⁷⁸を使用して実施した。塩基編集の定量のためには、効率を、(インデルなしの所与の位置におけるAからGの編集を含有するリード)/(総リード数)のパーセンテージとして計算した。インデルは、(破棄されたリード)/(アラインメントされた総リード)×100として陽的に計算した。所与の位置における塩基編集は、(破棄されなかったリードにおける指定された点突然変異の頻度)×100×(100-(インデルリード))/100)として陽的に計算した。

40

【0425】

AAV産生

以前に記載されたとおり³⁵、AAVを産生した。HEK293Tクローン17細胞(ATCC CRL-11268)を、抗生物質なしの10%(v/v)FBSを足したダルベッコ改変イーグル培地プラスGlutaMax(Thermo Fisher Scientific)によって、150mmシャーレ(Thermo Fisher Scientific;157150)上で、37℃において5%CO₂で維持し、2~3日毎に継代した。細胞を、プレート当たり5.7μg AAVゲノムプラスミド、11.4μg pHelper(Chlontech)、および22.8μg rep-capプラスミドによるポリエチレンイミントランスフェクションの前日に1:3分割した。トランスフェクションの翌日に、培地をDMEM 5%FBSに交換した。トランスフェクションの4日後に、細胞および培地をゴムセルスクレー

50

パー(Corning)を使用して収集し、2000gで10分間の遠心によってペレット化し、プレート当たり500 μ L高張溶解緩衝剤[40mM Tris base、500mM NaCl、2mM MgCl₂、および100U/mL高塩濃度耐性ヌクレアーゼ(ArcticZymes;70910-202)]に再懸濁し、37°Cで1時間インキュベーションして細胞を溶解した。培地を傾瀉し、8%PEG/500mM NaClの最終濃度で2.5M NaCl中の40%ポリ(エチレングリコール)8,000(PEG 8k, Sigma-Aldrich 89510)の5 $\times$ 溶液と組み合わせ、氷上で2時間インキュベーションし、次いで3200gで30分間遠心した。ペレットをプレート当たり500 μ Lの高張溶解緩衝剤に再懸濁し、細胞ライセートに追加した。粗ライセートは、4°Cで終夜インキュベーションするかまたは直ちに超遠心のために取るかどちらかをした。

【0426】

2,000gで10分間の遠心によって細胞ライセートを清澄化し、16ゲージ5インチ使い捨て針(Air-Tite N165)を介してBeckman Quick-Sealチューブに追加した。不連続イオジキサノール勾配を、順次、次の浮遊層によって形成した:500mM NaClおよび1 $\times$ PBS-MK(1 $\times$ PBSプラス1mM MgCl₂および2.5mM KCl)中の9mL 15%イオジキサノール、1 $\times$ PBS-MK中の6mL 25%イオジキサノール、および1 $\times$ PBS-MK中の各5mLの40%および60%イオジキサノール。1 μ g/mLの最終濃度においてフェノールレッドを15、25、および60%層に追加して、同定を容易にした。超遠心は、Sorvall wx+ Ultracentrifuge(Thermo Scientific)においてTi 70ロータを使用して、58,000rpmで2時間15分、18°Cで実施した。遠心の直後に、3mLの溶液を18ゲージ針を介して40-60%イオジキサノール界面から抜き取った。溶液を、PES100 kD MWCOカラム(Thermo Scientific、Pierce 88533)を使用して0.001% F-68を含有する冷PBSに交換し、濃縮した。濃縮されたAAV液を0.22 μ mフィルターを使用して無菌濾過し、qPCR(AAVproタイトレーションキットバージョン2;クロンテック)によって定量し、使用まで4°Cで保存した。

【0427】

動物

生きている動物における全ての実験は、Broad InstituteおよびUniversity of Pennsylvania Institutional Animal Care and Use Committeesによって承認され、適宜、国立衛生研究所実験動物の使用とケアに関するガイドを包含する地方、州、および連邦の規制と整合した。実験への使用のためのC57BL/6Jマウス(ストックno.000664)はJackson Laboratoryから購入した。ヒト化PCSK9マウスは以前に報告された⁵⁷。全てのマウスは、血漿分析のための採血にすぐ先行する4時間絶食を例外として、標準的なげっ歯類飼料および水への自由なアクセスを有する12時間の明暗周期で維持された部屋に収容した。

【0428】

後眼窩注射

注射前に、AAVを100 μ Lの無菌0.9%NaCl USP(Fresenius Kabi;918610)によって希釈した。麻酔を2~4%イソフルランによって導入した。両側の足指ピンチに対する不応答性によって測定される導入後に、右眼を皮膚に対する穏やかな圧力によって突き出させ、ベベルが眼とは反対側に面したインスリンシリンジを後眼窩静脈洞へと前進させ、そこにAAV混合物をゆっくり注射した。次いで、1滴の塩酸プロパラカイン点眼溶液(Patterson Veterinary;07-885-9765)を鎮痛剤として眼に適用した。採取においては、二酸化炭素窒息によってマウスを安楽死させた。ゲノムDNAを、製造者の説明書に従ってgDNAadvanceキット(Beckman Coulter A48705)を使用して細碎組織から精製し、ハイスループット配列決定のための鋳型として使用した。RNAを、製造者の説明書に従って、RNeasy Plus Miniキット(Qiagen 74134)によって30mgの瞬間凍結肝臓組織から精製し、次いで、オリゴdTプライマーとSuperScript IIIファーストストランド合成スーパーミックス(Invitrogen 18080-450)を使用してcDNAに逆転写し、これをハイスループット配列決定のための鋳型として使用した。

【0429】

デジタルドロップレットPCR

ゲノムDNAを、製造者の説明書に従ってBeckman gDNAAdvanceキット(Beckman Coulter A48705)を使用して組織から精製し、デジタルドロップレットPCRのための鑄型として使用した。ddPCRは、ddPCR Supermix for Probes(BioRad 1863026)と、鑄型としての10ngのゲノムDNAおよび3ユニットのNEB EcoRI-HF(R3101S)を反応当たり使用して行った。ドロップレットを自動生成し、PCRを61°Cのアニーリングおよび伸長温度において2分間、合計で60サイクル実施した。ドロップレットをQX200ドロップレット分析器によって分析し、ドロップレットの蛍光をQuantaSoft(BioRad)を使用して定量した。

【0430】

10

標的化可能なゲノムアデノシンの計算

例5に示すカスタムPythonスクリプトを使用して、hg38ヒト参照ゲノム上の全てのアデノシンの標的化可能性を分析した。アデノシンは、取り巻くゲノム配列文脈が、適当な塩基編集ウィンドウ内にそのアデノシンを置くであろう小さいABE8eによって標的化可能なPAMを含有する場合には、標的化可能としてカウントした。各小さいABE8eバリエーションに関連するPAM配列、プロトスペーサ長さ、および塩基編集ウィンドウを表4Aにおいて提供する(例4)。各染色体上の計算されたゲノムアデニンのパーセンテージを表4Bに示す。

【0431】

20

血液収集および血漿分析

4時間の絶食後に、当初の血液試料を収集した。年齢をマッチした同腹仔／コロニーメイトを実験群に無作為に割り付け、後眼窩注射を介してAAV粒子(n=5)を投与した。血液試料を、1週間間隔で、尾端を介して4時間絶食後に収集した。4週間後に、全てのマウスを4時間絶食後の二酸化炭素窒息によって安楽死させた。ゲノムDNAの単離および分析のためにならびにヘマトキシリン／エオジン染色のために、全肝を採取し、終点の血液試料を収集した。

【0432】

処置前および処置後の血漿ヒトPCSK9、マウスPcsk9、またはマウスANGPTL3は、製造者の説明書(R&D Systems)に従って、夫々、Human Proprotein Convertase 9/PCSK9 Quantikine ELISAキット、Mouse Proprotein Convertase 9/PCSK9 Quantikine ELISAキット、またはHuman Angiopoietin-like 3 Quantikine ELISAキットを使用して測定した。総コレステロールまたはトリグリセリドレベルは、製造者の説明書(Thermo Fisher Scientific)に従って、夫々Infinityコレステロール試薬またはInfinityトリグリセリド試薬を使用して測定した。

30

【0433】

肝臓組織の固定および組織学

内側左葉のある部分を4°Cの4%パラホルムアルデヒド中で終夜固定し、PBSによって洗浄し、次いで、PBSを30%、50%、70%、次いで100%エタノールの逐次的置換によって徐々に脱水した。試料は、それらがHarvard Medical SchoolのRodent Histopathology Coreによってパラフィン処理される分析まで、-20°Cに保った。次いで、肝臓パラフィンプロックを5μm切片にカットし、その後に、組織病理学的検査のためにヘマトキシリン・エオジン染色をした。

40

【0434】

AAVゲノムのアルカリゲル電気泳動

1%アルカリ性アガロースゲル(50mM NaOHおよび1mM EDTAを有する水中の1%アガロース)を、アガロースを水に溶解すること、冷却するが固化は許さないこと、次いでNaOHおよびEDTAの50×溶液を追加することによって調製した。形成されたゲルを、4°Cのサブマリンスタイルゲル電気泳動セットアップにおいて、1×アルカリ泳動緩衝剤(50mM NaOH、1mM EDTA)中に沈めた。5×10¹⁰vgのAAVをDNase I(NEB M0303S)によって処置し、次いで1×アルカリ溶解緩衝剤(50mM NaOH、1mM EDTA、

50

0.3% SDS、5%グリセロール、0.0025%キシレンシアノール)中で95℃で3分間溶解し、次いで氷上で冷却した。試料をゲルにロードし、次いで20Vで15時間電気泳動した。ゲルを、0.1M Tris pH8中で4℃において1時間揺らしながら中和した。ゲルを、遮光して揺らしながら、4℃の0.1M NaCl中の4×SYBR Goldによって染色した。ゲルを脱イオン水によって手短に洗浄し、次いでUVトランスイルミネータ上でイメージングした。

【0435】

統計分析

データは、別様に注記されない限り、平均およびSEMとして提示される。独立した反復の数および統計検定は図面の簡単な説明に記載されている。全ての統計検定は、GraphPad Prism 9を使用して計算された。

【実施例4】

【0436】

例4

【表1-1】

表1:例に使用したsgRNAプロトスペーサおよびPAM配列

図	部位ID	プロトスペーサ配列	PAM
図1	Sa-W8R	GCCACCGCAGCCACGCAGAGCA(配列番号430)	GTGGGT
3a	部位1 TS90-GAPDH	GCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAG(配列番号432)	AGACCC
3a	部位2 TS89-SEC61B	GCCCTCATCTCCAATATGGTATGG(配列番号434)	CGGCCC(
3a	部位3 TS88-FANCF	GAGGCAAGAGGGCGGCTTTGGGCG(配列番号436)	GGGTCC
3a	部位4 TS72-LINC01588	GACCAGCCCCTCGAAGGCAAGGCC(配列番号720)	AGGACC
3a	部位5 TS81-LSP1	TATGTTCCAGCTTCCTGGGTCTGC(配列番号440)	AGGTCC
3a	部位6 Nme10-EMX1	GGACCCTCTCCATTTCTACCCCT(配列番号442)	GGGTCC
3a	部位7 Nme91-SpRY-NCAC-1	GTTTGTCCCCACAGTCCCCAGGGA(配列番号444)	AAAGCC
3a	部位8 TS71	GCGCAAAGCTGCATCCACCCCCCG(配列番号446)	AGGACC
3a	部位9 Nme99	GCTGGCCGCCAGCCAGTTGTAGC(配列番号721)	ACCGCC
3a	部位10 TS75	GTTCCCCTTCATTGCGGCGGGCTG(配列番号450)	CGGGCC
3b	部位11 Cj63-AAVS1	GATTGTGCTGTCAGGAGCTCGG(配列番号452)	GGGAGTAC
3b	Sote 12 Cj56-AAVS1	GAGTAGAGGCGGCCACGACCTG(配列番号454)	GTGAACAC

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

図	部位ID	プロトスペーサ配列	PAM
3b	部位 13 Cj672-RNF2	TCCTAATCCCTTGACAGGGTC(配列番号 456)	TGGCATAAC
3b	部位 14 Cj725-HEK4	GGTCCAAAGCAGGATGACAGGC(配列番号 458)	AGGGGGCAC
3b	部位 15 Cj57-AAVS1	GGAGTGTGACAGCCTGGGGCCC(配列番号 460)	AGGCACAC
3b	部位 16 Cj61-AAVS1	AGCTGCAGCACCAGGATCAGTG(配列番号 462)	AAACGCAC
3b	部位 17 Cj62-AAVS1	GAGGTGGCTAAAGCCAGGGAGA(配列番号 464)	CGGGGTAC
3b	部位 18 Cj58	GTGGGGTGAGGAGAAGGCTGGG(配列番号 466)	AGGGATAC
3b	部位 19 Cj59	GCAGGAGGTTTTCTTGTGGCA(配列番号 468)	GGAGATAC
3c	部位 20 Sauri-HEK2	GGAACACAAAGCATAGACTGC(配列番号 470)	GGGG
3c	部位 21 Sauri-HEK3	GGGGCCCAGACTGAGCACGTG(配列番号 472)	ATGG
3c	Siete 22 Sauri-RNF2	GCAGTCATCTTAGTCATTACCT(配列番号 474)	GAGG
3c	部位 23 Sauri-EMX1	GCTGAGTCCGAGCAGAAGAAGA(配列番号 476)	AGGG
3c	部位 24 Sauri-FANCF	GATGGAATCCCTTCTGCAGCAC(配列番号 722)	CTGG
3c	部位 25 HEK4	GTGGCACTGCGGCTGGAGGTG(配列番号 480)	GGGG
3c	部位 26 GAPDH	CCAGCCCCAGCAAGAGCACAA(配列番号 733)	GAGG
3c	部位 27 SEC61B	CCTCATCTCCAATATGGTATG(配列番号 734)	GCGG
3c	部位 28 ABE8e部位 1	GGACAAACCAGAAGCCGCTCC(配列番号 735)	TGGG
3c	部位 29 ABE8e部位 7	CAGTCATCTTAGTCATTACCT(配列番号 488)	GAGG
4b	PCSK9エクソン1ドナー-SaKKH	GCCTACACCCGACCTTGGCGC(配列番号 490)	AGCGGT
4b	Pcsk9エクソン1ドナー-SaKKH	GCCATACCTTGGAGCAACGGCG(配列番号 492)	GAAGGT
4b	Pcsk9エクソン1ドナー-Sauri	GCACCCATACCTTGGAGCAACG(配列番号 494)	GCGG
4b	Angptl3エクソン6ドナー-SaKKH	GAGATACCTGAGTAACCTTCTG(配列番号 496)	GACAGT
4c	Pcsk9エクソン1ドナー-Sp	GCCCATACCTTGGAGCAACGG(配列番号 498)	CGG
6	Sa-W8R	GCCACCGCAGCCACGCAGAGCA(配列番号 500)	GTGGGT
6	SaKKH-T89A	ATGGAGGAGACCCAGAGGCT(配列番号 502)	ACAGAT
6	SaKKH-Q259R	GCTCAACTGTCAAGGGAAGGG(配列番号 504)	CACAGT

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

図	部位ID	プロトスペーサ配列	PAM
6	SaKKH-Q343N	GCCACGAATGCCCAGGACCA(配列番号506)	GCCAGT
9a	PCSK9_エクソン1_開始_SaKKH	GGTGCCCATGAGGGCCAGGGG(配列番号508)	AGAGGT
9a	PCSK9_エクソン1_don_SaSaKKH	GCACCCGCACCTTGGCGCAGCG(配列番号510)	GTGGAA
9a	PCSK9_エクソン1_don_SaKKH	GCCTACACCCGCACCTTGGCGC(配列番号512)	AGCGGT
9a	PCSK9_エクソン3_acc_SaKKH	GTTGCATGGGGCCAGGATCCGT(配列番号514)	GGAGGT
9a	PCSK9_エクソン4_don_SaKKH	GAGATGGGGGTCTTACCGGGGG(配列番号516)	GCTGGT
9a	PCSK9_エクソン5_acc_SaKKH	GCCTTGAAAGACGGAGGCAG(配列番号518)	CCTGGT
9a	PCSK9_エクソン5_don_Sa	GCGTGCTTACCTGTCTGTGGAA(配列番号520)	GCGGGT
9a	PCSK9_エクソン5_don_SaSaKKH	GACGGCCGTGCTTACCTGTCTG(配列番号522)	TGGAAG
9a	PCSK9_エクソン6_acc_SaKKH	GTCGAGCAGGCCAGCAAGTGT(配列番号524)	GACAGT
9a	PCSK9_エクソン9_acc_SaKKH	GCCCTGCACCAGGCATTGCAGC(配列番号526)	CATGAT
9a	PCSK9_エクソン9_don_Sa	GCCATCCTGCTTACCTGCCCC(配列番号528)	ATGGGT
5b	Pcsk9_エクソン1_開始_SaKKH	GTGGGTGCCCATCGGGGCGAGG(配列番号530)	AGAGGT
9b	Pcsk9_エクソン1_don_SaKKH	GCCATACCTTGGAGCAACGGCG(配列番号532)	GAAGGT
9b	Pcsk9_エクソン2_don_SaKKH	GAAGATGGCTCACCAGGCCCA(配列番号534)	ACAGGT
9b	Pcsk9_エクソン3_don_SaKKH	GTA CTGGGGACCTTACCAGGGG(配列番号536)	AGCGGT
9b	Pcsk9_エクソン4_acc_SaKKH	GCCATGGGAAGATGGAAGCAG(配列番号538)	CCAGGT
9b	Pcsk9_エクソン8_acc_Sa	GTGTACCTCCAGGCATTGTGGC(配列番号540)	TCGGAT
9b	Pcsk9_エクソン8_don_Sa	GCCATCCTGCTCACCTGTCTC(配列番号542)	ATGGGT
9b	Pcsk9_エクソン9_don_SaKKH	GAGACAGGGTCGGGCACCTCAA(配列番号544)	TCCAAT
9c	Angptl3_エクソン1_開始_SaKKH	GTGAGACAAAAAATGCACACAA(配列番号546)	TTAAAT
9c	Angptl3_エクソン1_don_Sa	GTGCTGTGATTTCTACTTACT(配列番号548)	TTGAGT
9c	Angptl3_エクソン1_don_SaKKH	GCTGTGATTTCTACTTACTTTG(配列番号550)	AGTGAT
9c	Angptl3_エクソン3_acc_SaKKH	GTTCTTTTATCAGCTCAGAAAG(配列番号552)	ACTGGT
9c	Angptl3_エクソン4_don_Sa	GTGTTTCCATGGGTTTACCTGA(配列番号554)	TTGGGT

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

図	部位ID	プロトスペーサ配列	PAM
9c	Angptl3_エクソン4_don_SaKH	GTGGGTTTACCTGATTGGGTAT(配列番号556)	CACAGT
9c	Angptl3_エクソン5_acc_SaKH	GCTCTCCAGGCAGTCCATGGAC(配列番号558)	ATTAAT
9c	Angptl3_エクソン6_don_SaKH	GAGATACCTGAGTAACTTTCTG(配列番号560)	GACAGT
10B	Sauri_Pcsk9_エクソン1_don_KI ienstiver	GCACCCATACCTTGGAGCAACG(配列番号562)	GCGG
10B	Sauri_Pcsk9_エクソン1_don_R an	GCACCCATACCTTGGAGCAACG(配列番号564)	GCGG

10

【0437】

【表 2】

表2:sgRNA骨格

エディタ	骨格配列
SaABE8e	GTTTTAGTACTCTGTAATGAAAATTACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAA ATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTTTT(配列番号566)
SaKKH-ABE8e	GTTTTAGTACTCTGTAATGAAAATTACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAA ATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTTTT(配列番号567)
Nme2 ABE8e	GTTGTAGCTCCCTTTCTCATTTTCGGAACGAAATGAGAACCGTTGCTAC AATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCTTAAAGCT TCTGCTTTAAGGGGCATCGTTTATTTTTTT(配列番号568)
CjABE8e	GTTTTAGTCCCTGAAAAGGGACTAAAATAAAGAGTTTGCGGGACTCTGC GGGGTTACAATCCCCTAAACCGCTTTTTTT(配列番号569)
SauriABE8e in vitro ²	GTTTTAGTACTCTGGAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGT GTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTTTT(配列番号570)
SauriABE8e in vivo ¹	GTTTTAGTACTCTGTAATGAAAATTACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAA ATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTTTT(配列番号571)

20

30

【0438】

【表 3 - 1】

表3:ハイスルーブット配列決定のためにゲノムDNAおよびcDNAを増幅するために使用されるプライマー配列

図	部位ID	HTS結合フォワード	HTS結合リバース
図1	Pcsk9-W8R	GGCGTCCATGTCCTTCCCGA(配列番号572)	ACATGTGCGGCCTCATCAGCCA(配列番号573)
3a	部位1 Nme2-TS9 0-GAPDH	GCTCAGAAAAAGGGCCCTGA(配列番号574)	GAGATTCAGTGTGGTGGGGG(配列番号575)
3a	部位2 Nme2-TS8 9-SEC61B	AACTTTCTATCCGTCCGCGT(配列番号576)	GGCTGTAGAGGGAGACAAGC(配列番号577)
3a	部位3 Nme2-TS8 8-FANCF	GGGCCTGGAAGTTCGCTAAT(配列番号578)	TGGATCGCTTTTCCGAGCTT(配列番号579)
3a	部位4 Nme2-TS7 2-LINC01588	ATTGCTCTTTTCTCCGCCCA(配列番号580)	TTCACAAAACAGGGGTGGCT(配列番号581)
3a	部位5 Nme2-TS8 1-LSP1	GACGTCTTCTCCTGTGGTGG(配列番号582)	GGGTGTCTGGCTGGAATCTC(配列番号583)

40

50

【表 3 - 2】

図	部位ID	HTS結合フォワード	HTS結合リバース
3a	部位 6 Nme10-E MX1	CCCCCGCACTCCTTCTTC(配 列番号584)	AATCTACCTCCGCGGACCT(配 列番号585)
3a	部位 7 Nme91-Sp RY-NCAC-1	GGCTCCCTCTCCCAGTTACC G(配列番号586)	CACCACCATCCGCTCTGCCC(配 列番号587)
3a	部位 8 TS71	TTCAGGCTGTGAACCTTGGT(配 列番号588)	CCGCTACCAGCCGACTTTTAA(配 列番号589)
3a	部位 9 Nme99	GGTGGAAGGTCCCTCCAGA(配 列番号590)	CCTTCAACCTGACCTGGGAC(配 列番号591)
3a	部位 10 TS75	ATTGCTCTTTTCTCCGCCA(配 列番号592)	TTCACAAAACAGGGGTGGCT(配 列番号593)
3b	部位 11 Cj63-A AVS1	AAAGAGGAAGCTGTCTCCGC(配 列番号594)	AGTCTCAGCCAGCCACTTTC(配 列番号595)
3b	部位 12 Cj56-AA VS1	GCTCTGGGCGGAGGAATATG(配 列番号596)	TCCGTGCGTCAGTTTACCT(配 列番号597)
3b	部位 13 Cj672-R NF2	GATCTGGACGAATAGTGTAG GTTAAG(配列番号598)	GCAAGTTGGTTGCTGTCTTTGG(配 列番号599)
3b	部位 14 CJ725-H EK4	GAACCCAGGTAGCCAGAGAC(配 列番号600)	TCCTTTCAACCCGAACGGAG(配 列番号601)
3b	部位 15 Cj57-AA VS1	GCTATGCAGGGTGGAGGAAG(配 列番号602)	TGGACTTCGGCTTTTGTCCC(配 列番号603)
3b	部位 16 Cj61-AA VS1	GGGACTAGAAAGGTGAAGAG CC(配列番号604)	GAGGATCCTGGGAGGGAGAG(配 列番号605)
3b	部位 17 Cj62-AA VS1	GGGACTAGAAAGGTGAAGAG CC(配列番号606)	GAGGATCCTGGGAGGGAGAG(配 列番号607)
3b	部位 18 Cj58	GGTCTTCGTTCTGCTGAT(配 列番号608)	CTTTCCCTTGACCCAGG(配 列番号609)
3b	部位 19 Cj59	ATCAAGGTCAACACAGGGGG(配 列番号610)	TCACCATGTTGACCAGGCTG(配 列番号611)
3c	部位 20 Sauri-HE K2	CCAGCCCCATCTGTCAAAC(配 列番号612)	CCGATCTTGAATGGATTCTTGA AACAATGA(配列番号613)
3c	部位 21 Sauri-HE K3	ATGTGGGCTGCCTAGAAAGG(配 列番号614)	CCCAGCCAAACTTGTCAACC(配 列番号615)
3c	部位 22 Sauri-RN F2	ACGTCTCATATGCCCTTGG(配 列番号616)	ACGTAGGAATTTTGGTGGGA CA(配 列番号617)
3c	部位 23 Sauri-EM X1	CAGCTCAGCCTGAGTGTGA(配 列番号618)	CCGATCTCTCGTGGGTTTGTGGTT GC(配列番号619)
3c	部位 24 Sauri-FA NCF	CATTGCAGAGAGGCGTATCA(配 列番号620)	GGGGTCCCAGGTGCTGAC(配 列番号621)
3c	部位 25 HEK4	GAACCCAGGTAGCCAGAGAC(配 列番号622)	TCCTTTCAACCCGAACGGAG(配 列番号623)
3c	部位 26 GAPDH	GCTCAGAAAAAGGGCCCTGA(配 列番号624)	GAGATTCAAGTGTGGTGGGGG(配 列番号625)
3c	部位 27 SEC61B	AACTTTCTATCCGTCCGCGT(配 列番号626)	GGCTGTAGAGGGAGACAAGC(配 列番号627)
3c	部位 28 ABE8e部 位 1	AGCCCTCTTTTATTGGAAC GTG(配列番号628)	CCGACTGGTCCACTTACCTA(配 列番号629)
3c	部位 29 ABE8e部 位 7	AACGGAACCTCAACCATTAAG CA(配列番号630)	CCAACATACAGAAGTCAGGAATGC (配列番号631)

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

図	部位ID	HTS結合フォワード	HTS結合リバース
4b	PCSK9エクソン1ドナー	GCGCACGGCCTCTAGGTCT(配列番号630)	GAGGAAACAGCACCGCACCG(配列番号631)
4b	Pcsk9エクソン1ドナー	GCGTCCATGTCTTCCCGAG(配列番号632)	CCAACCCCAAAGCAACGCCG(配列番号633)
4b	Angptl3エクソン6ドナー	TCACCTGGGCAGTCACGAAA(配列番号634)	ACACCATCAACATAGTGAGGAGAA(配列番号635)
6	Pcsk9-W8R	GGCGTCCATGTCTTCCCGA(配列番号636)	ACATGTGCGGCCTCATCAGCCA(配列番号637)
6	Pcsk9-T89A	GATGAGGTCATGCTGGGGTCT(配列番号638)	GTAGAACCTTGATGACATAGCCCCG(配列番号639)
6	Pcsk9-Q259R	AGGAACTGTTCTCTCACTCCA(配列番号640)	GCCTGACAGTGAGACCTTGCTTC(配列番号641)
6	Pcsk9-Q343N	TGTGGGAACTGGAGTTGGCTAGT(配列番号642)	CTGGACGCTCCGATGATGTCTT(配列番号643)
9a	PCSK9_エクソン1	GAGGAAACAGCACCGCACCG(配列番号644)	GAGGAAACAGCACCGCACCG(配列番号645)
9a	PCSK9_エクソン3_acc	ACACCTAGGGTTTGCTGGGTCTT(配列番号646)	TATGCAGTGGCCCAGCCCTATCA(配列番号647)
9a	PCSK9_エクソン4_don	AGGCTGTGGCTGTGTTTGCT(配列番号648)	GGAAACCACCAGCAGGGAGG(配列番号649)
9a	PCSK9_エクソン5	CCAGTGCCTGGGATGTGCTCTG(配列番号650)	CAGGAGTACAGCTGCAACGCTC(配列番号651)
9a	PCSK9_エクソン6_acc	TCCAGCCACCTGCTGATTTGT(配列番号652)	CCTCCCAGGCCAGGTCCAG(配列番号738)
9a	PCSK9_エクソン9	GCCGGGCCATCACCATCTTT(配列番号653)	CACACAGACCTCCCAAGCCC(配列番号654)
9b	Pcsk9_エクソン1	GCGTCCATGTCTTCCCGAG(配列番号655)	CCAACCCCAAAGCAACGCCG(配列番号656)
9b	Pcsk9_エクソン2_don	GATTGAACAACTGCCCACC GC(配列番号657)	CAAGAGCCACAGGCGCTTACTG(配列番号658)
9b	Pcsk9_エクソン3_don	TTGGGAAGAGGACGGGCAGA(配列番号659)	TGGGGAGGTGGACAGTCAGG(配列番号660)
9b	Pcsk9_エクソン4_acc	CCGTCTAATGCGTGGGGTGG(配列番号661)	GGCACGCTGTTGAAGTCGGT(配列番号662)
9b	Pcsk9_エクソン8	CCCTATATTTTGGGAAGCAGGGC(配列番号663)	AGAAAACCTTCCTGTGAGGCCA(配列番号664)
9b	Pcsk9_エクソン9_don	GGGTGCTCCCTCCACCCTAA(配列番号665)	AGGTGCTGCTCTCCAGCCAA(配列番号666)
9c	Angptl3_エクソン1	GGAGGGAGAAGTTCCAAATTGCTTA(配列番号667)	CAGCTGCAGGAGGCCATTG(配列番号668)
9c	Angptl3_エクソン3_acc	TGACACACTTACCCAGCATTCCCT(配列番号669)	ATTTTGTAGAGAAAAGTCCCGGAT(配列番号670)
9c	Angptl3_エクソン4_don	GCCGACTGCTCTGCCGTTT(配列番号671)	CCCAGATTTGCGTGAATAACCATT(配列番号672)
9c	Angptl3_エクソン5_acc	GCTAAAACCAAACCTCAAAACGGGT(配列番号673)	CCCATGTCAGTGCAACCAGCTA(配列番号674)
9c	Angptl3_エクソン6_don	TCACCTGGGCAGTCACGAAA(配列番号675)	ACACCATCAACATAGTGAGGAGAA(配列番号676)

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

図	部位ID	HTS結合フォワード	HTS結合リバース
10A ～10 B	Pcsk9_エクソン1	GCGTCCATGTCCTTCCCGAG(配列番号677)	CCAACCCCAAAGCAACGCCG(配列番号678)
12A ～12 E	OT1	AACCCACACACCTTGGC(配列番号679)	ACAGTCCACAGTCTAAGTGCAAA(配列番号680)
12A ～12 E	OT2	TTTGGAGTGGCATATTTGACAGCA(配列番号681)	TGTGGCACAGTGGGCCTTTAC(配列番号682)
12A ～12 E	OT3	TCATGCTCTGCCCTGTAGGTA(配列番号683)	ATGGCATTCAATTTAAGCCTAACTTC(配列番号684)
16C	OT1	AAGTATGTTGGGACCCCTTGGCTGG(配列番号685)	TGGCCTGTTCTACTGACTATGGGG(配列番号686)
16C	OT2	GACAGACACAGGGAAGCCTTGGG(配列番号687)	AACCTTCCAGGAGAGAGAAACCTGT(配列番号688)
16C	OT4	TTCAAGCAATCAGCAGACACTCAG(配列番号689)	CCCACCACCCAGCAGCTTTATTG(配列番号690)
16C	OT5	TCTCAGGCGACCTGGTTTCTGC(配列番号691)	TCTGCCAGATGCGTCCGATCA(配列番号692)
16C	OT6	GCCAGCCCTGCCTGGAAGTTAG(配列番号693)	TGACCTCCGGGATTCTCAGCCC(配列番号694)
16C	OT7	GCTTCCTGTCTGCAATTGGGTCT(配列番号695)	AGTAGGTTGCGGGGCTCAGGA(配列番号696)
16C	OT9	AACCTCCACGGGGGTATCTGAGG(配列番号697)	ACCTGGCAAGTGGGGTACTGG(配列番号698)
16C	OT10	GTCTAAATGGGCAAGCAATCCCT(配列番号699)	CCAGGATCCCACAGGGTCCTTCT(配列番号700)
16C	OT11	TCCCCAGAGCCCAGGGAATATCA(配列番号701)	TGTTGCTCCGATGGAAGGATGGG(配列番号702)
16C	OT13	CCACCAGAAGCGCCCCAGAA(配列番号703)	GGGGAATCGCCTCCACTGCC(配列番号704)
16C	OT14	GTTCTTATTGGCCAGGGAGCCTT(配列番号705)	CTCCCCAAGTGACAGGAACCACG(配列番号706)
22A	cDNA_Canx/Ip90	GGGTCTGGAATATACTCAGGTTCGT(配列番号707)	TGACCAGTCTGTTGTGAACAGTG(配列番号708)
22B	cDNA_Ctnnb1	TGACCTGATGGAGTTGGACATGG(配列番号709)	ACTTGCTCTTGCGTGAAGGACT(配列番号710)
22C	cDNA_Usp38	ACAGGTCTTCCACAGAAGGGC(配列番号711)	ACTTGTTTACAAGAGGTGACCAGT(配列番号712)
22D	cDNA_Aars	AGCCAGAATCCTCCCTGGCAAT(配列番号713)	CAGAACACCATCCGACTCCCTGT(配列番号714)

【0439】

【表 4 A】

表 4A: 本稿において開発されたサイズが最小化された ABE の塩基編集活性ウィンドウおよび標的化可能なゲノムアデニンのパーセンテージの概要。

バリエーション	プロトスペーサ長さ(nt)	PAM	ウィンドウ(最大25%)
SauriABE	21	NNGG(配列番号715)	5-15
SaKKHABE	21	NNRRT(配列番号716)	2-13
CjABE	22	NNNV RYAC(配列番号717)	3-7、9-13、15
Nme2ABE	24	NNNNCC(配列番号718)	6、9-13、16-17

【0440】

【表 4 B】

表4B:標的化可能なゲノムアデニンの計算に使用されるウィンドウ幅。ウィンドウ幅は各エディタの標準的なプロトスペーサ長さについて示されており、位置1がプロトスペーサの5'端として定められる

	総_A	標的化可能_A	総_T	標的化可能_T	標的化可能なパーセント
chr1	32546775	26685188	32599119	26731923	81.99612857
chr10	19549602	16072176	19566475	16079439	82.19539756
chr11	18530910	15213431	18548654	15231448	82.10689586
chr12	18869776	15364041	18905105	15390534	81.415412
chr13	15663586	12722581	15718153	12773277	81.24424845
chr14	13041618	10670545	13118537	10736532	81.83084924
chr15	11901023	9791465	11881736	9779219	82.2893761
chr16	10761831	8880058	10847090	8959068	82.55445054
chr17	10711334	8892175	10719812	8897966	83.01068454
chr18	11963020	9779925	12016805	9824978	81.75582182
chr19	5808203	4848031	5816556	4854410	83.46358836
chr2	36905447	30200054	36965508	30246198	81.82681813
chr20	8190084	6756662	8272621	6829290	82.52563598
chr21	5754013	4719119	5767220	4730454	82.01876483
chr22	4583339	3855516	4582999	3855167	84.11955789
chr3	29608996	24099572	29636045	24126868	81.40164845
chr4	29167021	23603218	29177885	23608189	80.91778741
chr5	27049804	22032634	27155675	22123573	81.46078185
chr6	26137405	21311082	26196421	21367050	81.54980299
chr7	23255299	19020621	23243204	19007154	81.78279417
chr8	21395653	17440637	21361906	17416402	81.52251863
chr9	17364609	14209902	17335711	14192377	81.85019331
chrX	17917313	14524778	17926781	14532656	81.06616951
chrY	2994088	2426016	3002884	2431968	81.00728167
全て	419670749	343119427	420362902	343726140	81.76405388

(a)の活性ウィンドウ定義を使用する、この研究において開発された1以上のサイズが最小化されたABEによって標的化可能なゲノムアデニンのパーセンテージ。

【0 4 4 1】

小さいABE8eによって標的化可能なPAMを有するヒトゲノム上の標的化可能なアデニンを計算するためのカスタムpythonスクリプト。

```
import re
from Bio import SeqIO
import Bio
from Bio.Seq import Seq
import pandas as pd
def is_targetable(sequence, A_position, window, PAM_seq, protospacer_length):
    #convert PAM to regex PAM
    regex_PAM = PAM_seq.replace('N','[ATGC]').replace('R','[AG]').replace('Y','[CT]').replace('V','[AGC]')
    is_targetable = 0
    for coords in window:
        test_for_PAM = sequence[A_position + (protospacer_length - coords[1]) + 1:A_position + (protospacer_length - coords[0]) + 1 + len(PAM_seq)]
        if [m.start() for m in re.finditer(regex_PAM, test_for_PAM)]:
            is_targetable = 1
    return is_targetable
genome_fa = '/Volumes/Storage/AR/ /genome_builds/hg38/hg38.fa'
```

```

records = SeqIO.to_dict(SeqIO.parse(genome_fa,'fasta'))
keys = records.keys()
#store genome data as dict = {'chrN':(seq, reverse complement seq)}
sequences = {key:(str(records[key].seq), str(records[key].seq.reverse_complement())) for key in records.keys()}
#output targetable counts as dict = {'chrN':{'targetable_A':int}, {'total_A':int}, {'total_T':int}, {'targetable_T':int}, {'total_T':int}}
output = {key:{} for key in records.keys()}
#free up some memory
del records
#iterate over chromosomes and populate output dict
for chromosome in keys:
    print('Tabulating ' + str(chromosome) + '...')
    #do forward (sense) seq first; findall As
    A_positions = [m.start() for m in re.finditer('A', sequences[chromosome][0])]
    #update total_A value
    output[chromosome]['total_A'] = len(A_positions)
    #calculate targetable As
    targetable_As = []
    for A_position in A_positions:
        targetable_As.append(0)
        if is_targetable(sequences[chromosome][0], A_position, [[1,12]], 'N
NNRRT', 20):
            targetable_As[-1] = 1
        elif is_targetable(sequences[chromosome][0], A_position, [[4,14]], '
NNGG', 20):
            targetable_As[-1] = 1
        elif is_targetable(sequences[chromosome][0], A_position, [[2,2], [5,
9], [12,13]], 'NNNNCC', 23):
            targetable_As[-1] = 1
        elif is_targetable(sequences[chromosome][0], A_position, [[1,5], [7,
11], [13,13]], 'NNNNRYAC', 22):
            targetable_As[-1] = 1
    #update targetable_A value
    output[chromosome]['targetable_A'] = sum(targetable_As)
    #do reverse complement seq next
    T_positions = [m.start() for m in re.finditer('A', sequences[chromosome][1])]
    output[chromosome]['total_T'] = len(T_positions)
    targetable_Ts = []
    for T_position in T_positions:
        targetable_Ts.append(0)
        if is_targetable(sequences[chromosome][1], T_position, [[1,12]], 'N
NNRRT', 20):
            targetable_Ts[-1] = 1
        elif is_targetable(sequences[chromosome][1], T_position, [[4,14]], '
NNGG', 20):
            targetable_Ts[-1] = 1
        elif is_targetable(sequences[chromosome][1], T_position,

```

```

[[2,2],
[5,9], [12,13]], 'NNNNCC', 20):
    targetable_Ts[-1] = 1
    elif is_targetable(sequences[chromosome][1], T_position,
[[1,5],
[7,11], [13,13]], 'NNNNRYAC', 20):
    targetable_Ts[-1] = 1
    output[chromosome]['targetable_T'] = sum(targetable_Ts)
#calculate combined totals for all chromosomes
all_total_A = 0
all_total_T = 0
all_targetable_A = 0
all_targetable_T = 0
for chromosome in output.keys():
    all_total_A += output[chromosome]['total_A']
    all_targetable_A += output[chromosome]['targetable_A']
    all_total_T += output[chromosome]['total_T']
    all_targetable_T += output[chromosome]['targetable_T']
output['all'] = {'total_A':all_total_A, 'targetable_A':all_targetable_A, 't
otal_T':all_total_T, 'targetable_T':all_targetable_T}
output_df = pd.DataFrame.from_dict(output, orient='index')
output_df['percent targetable'] = (output_df['targetable_A'] + output_df
['targetable_T'])/(output_df['total_A'] + output_df['total_T'])*100
    output_df.to_csv('2022-06-03/genome-wide_BE_search_Sauri-SaKKH-N
me2-Cj.csv')
【0 4 4 2】

```

参照

1. Newby, G.A. & Liu, D.R. In vivo somatic cell base editing and prim
e editing. *Molecular Therapy* 29, 3107-3124 (2021).
2. Banskota, S., et al. Engineered virus-like particles for efficient in
vivo delivery of therapeutic proteins. *Cell* 185(2):250-265 (2022).
3. Palaschak, B., Herzog, R.W. & Markusic, D.M. AAV-Mediated Gene
Delivery to the Liver: Overview of Current Technologies and Methods. i
n *Adeno-Associated Virus Vectors: Design and Delivery* (ed. Castle, M.J.
) 333-360 (Springer New York, New York, NY, 2019).
4. Deverman, B.E., Ravina, B.M., Bankiewicz, K.S., Paul, S.M. & Sah, D
.W.Y. Gene therapy for neurological disorders: progress and prospects.
Nature Reviews Drug Discovery 17, 641-659 (2018).
5. Mendell, J.R., et al. Current Clinical Applications of In Vivo Gene
Therapy with AAVs. *Molecular Therapy* 29, 464-488 (2021).
6. Mendell, J.R., et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spi
nal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine* 377, 1713-172
2 (2017).
7. Russell, S., et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (A
AV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited
retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial.
The Lancet 390, 849-860 (2017).
8. Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A. & Liu, D.R. Progra
mmable editing of a target base in genomic DNA without double-strande
d DNA cleavage. *Nature* 533, 420-424 (2016).

9. Gaudelli, N.M., et al. Programmable base editing of A • T to G • C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464 (2017).
10. Anzalone, A.V., Koblan, L.W. & Liu, D.R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology* 38, 824-844 (2020).
11. Giannoukos, G., et al. UDiTaSTM, a genome editing detection method for indels and genome rearrangements. *BMC Genomics* 19, 212 (2018).
12. Zuccaro, M.V., et al. Allele-Specific Chromosome Removal after Cas9 Cleavage in Human Embryos. *Cell* 183, 1650-1664.e1615 (2020).
13. Kosicki, M., Tomberg, K. & Bradley, A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nature Biotechnology* 36, 765-771 (2018).
14. Boutin, J., et al. CRISPR-Cas9 globin editing can induce megabase-scale copy-neutral losses of heterozygosity in hematopoietic cells. *Nat Commun* 12, 4922 (2021).
15. Ihry, R.J., et al. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nature Medicine* 24, 939-946 (2018).
16. Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B. & Taipale, J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature Medicine* 24, 927-930 (2018).
17. Leibowitz, M.L., et al. Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing. *Nature Genetics* 53, 895-905 (2021).
18. Dong, J.Y., Fan, P.D. & Frizzell, R.A. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* 7, 2101-2112 (1996).
19. Wu, Z., Yang, H. & Colosi, P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 80-86 (2010).
20. Anzalone, A.V., et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149-157 (2019).
21. Koblan, L.W., et al. In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *Nature* 589, 608-614 (2021).
22. Villiger, L., et al. Treatment of a metabolic liver disease by in vivo genome base editing in adult mice. *Nat Med* 24, 1519-1525 (2018).
23. Chen, Y., et al. Development of Highly Efficient Dual-AAV Split Adenosine Base Editor for In Vivo Gene Therapy. *Small Methods* 4, 2000309 (2020).
24. Lim, C.K.W., et al. Treatment of a Mouse Model of ALS by In Vivo Base Editing. *Molecular Therapy* 28, 1177-1189 (2020).
25. Chemello, F., et al. Precise correction of Duchenne muscular dystrophy exon deletion mutations by base and prime editing. *Science advances* 7, eabg4910 (2021).
26. Xu, L., et al. Efficient precise in vivo base editing in adult dystrophic mice. *Nat Commun* 12, 3719 (2021).
27. Zettler, J., Schutz, V. & Mootz, H.D. The naturally split Npu DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction. *FEBS letters* 583, 909-914 (2009).
28. Ryu, S.-M., et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Biotechnology* 36, 536-539 (2018).

29. Kuzmin, D.A., et al. The clinical landscape for AAV gene therapies. *Nat Rev Drug Discov* 20, 173-174 (2021).
30. Richter, M.F., et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nature Biotechnology* 38, 883-891 (2020).
31. Grunewald, J., et al. CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities. *Nature biotechnology* 37, 1041-1048 (2019).
32. Nguyen Tran, M.T., et al. Engineering domain-inlaid SaCas9 adenine base editors with reduced RNA off-targets and increased on-target DNA editing. *Nat Commun* 11, 4871 (2020). 10
33. Kleinstiver, B.P., et al. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nature Biotechnology* 33, 1293-1298 (2015).
34. Levy, J.M., et al. Cytosine and adenine base editing of the brain, liver, retina, heart and skeletal muscle of mice via adeno-associated viruses. *Nat Biomed Eng* 4, 97-110 (2020).
35. Inagaki, K., et al. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular Therapy* 14, 45-53 (2006). 20
36. Wu, Z., Asokan, A. & Samulski, R.J. Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Molecular Therapy* 14, 316-327 (2006).
37. Wu, Z., et al. Optimization of Self-complementary AAV Vectors for Liver-directed Expression Results in Sustained Correction of Hemophilia B at Low Vector Dose. *Molecular Therapy* 16, 280-289 (2008).
38. Long, C., et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* 345, 1184-1188 (2014).
39. Song, C.-Q., et al. In Vivo Genome Editing Partially Restores Alpha1-Antitrypsin in a Murine Model of AAT Deficiency. *Human Gene Therapy* 29, 853-860 (2018). 30
40. Shen, S., et al. Amelioration of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Diseases with Genome Editing in Transgenic Mice. *Human Gene Therapy* 29, 861-873 (2018).
41. Rothgangl, T., et al. In vivo adenine base editing of PCSK9 in macaques reduces LDL cholesterol levels. *Nature Biotechnology* 39, 949-957 (2021).
42. Edraki, A., et al. A Compact, High-Accuracy Cas9 with a Dinucleotide PAM for In Vivo Genome Editing. *Molecular Cell* 73, 714-726.e714 (2019). 40
43. Liu, Z., et al. Efficient and high-fidelity base editor with expanded PAM compatibility for cytidine dinucleotide. *Science China Life Sciences* 64, 1355-1367 (2021).
44. Kim, E., et al. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun* 8, 14500 (2017).
45. Li, X., et al. Programmable base editing of mutated TERT promoter inhibits brain tumour growth. *Nature Cell Biology* 22, 282-288 (2020).
46. Hu, Z., et al. A compact Cas9 ortholog from *Staphylococcus Auricularis* (SauriCas9) expands the DNA targeting scope. *PLOS Biology* 18, e 50

3000686 (2020).

47. Kim, Y.B., et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nature biotechnology* 35, 371-376 (2017).

48. Huang, T.P., et al. Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. *Nature Biotechnology* 37, 626-631 (2019).

49. Rees, H.A. & Liu, D.R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nature Reviews Genetics* 19, 770-788 (2018).

50. Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley, T.H. & Hobbs, H.H. Sequence Variations in PCSK9, Low LDL, and Protection against Coronary Heart Disease. *New England Journal of Medicine* 354, 1264-1272 (2006).

51. Dewey, F.E., et al. Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* 377, 211-221 (2017).

52. Stitzel, N.O., et al. ANGPTL3 Deficiency and Protection Against Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 69, 2054-2063 (2017).

53. Kluesner, M.G., et al. CRISPR-Cas9 cytidine and adenosine base editing of splice-sites mediates highly-efficient disruption of proteins in primary and immortalized cells. *Nat Commun* 12, 2437 (2021).

54. Gao, G.-P., et al. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11854-11859 (2002).

55. Essalmani, R., et al. A single domain antibody against the Cys- and His-rich domain of PCSK9 and evolocumab exhibit different inhibition mechanisms in humanized PCSK9 mice. *Biological Chemistry* 399, 1363-1374 (2018).

56. Nakai, H., et al. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *Journal of virology* 79, 214-224 (2005).

57. Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43, S54-S62 (2006).

58. Qiu, M., et al. Lipid nanoparticle-mediated codelivery of Cas9 mRNA and single-guide RNA achieves liver-specific in vivo genome editing of Angptl3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2020401118 (2021).

59. Musunuru, K., et al. In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. *Nature* 593, 429-434 (2021).

60. Meyer, K., et al. Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: a dose-response study in mice and non human primates. *Mol Ther* 23, 477-487 (2015).

61. Rashid, S., et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5374-5379 (2005).

62. Koishi, R., et al. Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nature Genetics* 30, 151-157 (2002).

63. Chadwick, A.C., Evitt, N.H., Lv, W. & Musunuru, K. Reduced Blood

Lipid Levels With In Vivo CRISPR-Cas9 Base Editing of ANGPTL3. *Circulation* 137, 975-977 (2018).

64. Chu, S.H., et al. Rationally Designed Base Editors for Precise Editing of the Sickle Cell Disease Mutation. *The CRISPR Journal* 4, 169-177 (2021).

65. High-dose AAV gene therapy deaths. *Nature Biotechnology* 38, 910-910 (2020).

66. Hinderer, C., et al. Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Pigs Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Human Gene Therapy* 29, 285-298 (2018).

67. Chandler, R.J., Sands, M.S. & Venditti, C.P. Recombinant Adeno-Associated Viral Integration and Genotoxicity: Insights from Animal Models. *Hum Gene Ther* 28, 314-322 (2017).

68. Schmidt, M., Gil-Farina, I. & Buning, H. Reply to "Wild-type AAV insertions in hepatocellular carcinoma do not inform debate over genotoxicity risk of vectorized AAV". *Molecular Therapy* 24, 661-662 (2016).

69. Mullard, A. Gene therapy community grapples with toxicity issues, as pipeline matures. *Nature Reviews Drug Discovery*, 804-805 (2021).

70. Wang, L., et al. Long-term stable reduction of low-density lipoprotein in nonhuman primates following in vivo genome editing of PCSK9. *Molecular Therapy* 29, 2019-2029 (2021).

71. Monteys, A.M., et al. Regulated control of gene therapies by drug-induced splicing. *Nature* 596, 291-295 (2021).

72. Dahlman, J.E., et al. Barcoded nanoparticles for high throughput in vivo discovery of targeted therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 2060-2065 (2017).

73. Piotrowski-Daspi, A.S., Glaze, P.M. & Saltzman, W.M. Debugging the genetic code: non-viral in vivo delivery of therapeutic genome editing technologies. *Curr Opin Biomed Eng* 7, 24-32 (2018).

74. Ran, F. A., et al. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520(7546): 186-191.

75. Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G. & Rabinowitz, J.E. Analysis of AAV Serotypes 1-9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Molecular Therapy* 16, 1073-1080 (2008).

76. Rees, H.A., Wilson, C., Doman, J.L. & Liu, D.R. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors. *Science Advances* 5, eaax5717 (2019).

77. Bae, S., Park, J. & Kim, J.-S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30, 1473-1475 (2014).

78. Concordet, J.-P. & Haeussler, M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic acids research* 46, W242-W245 (2018).

【0443】

同等物および範囲

当業者は本明細書に記載される本発明の具体的な態様の多くの同等物を認識するか、または通例の実験作業を使用して確かめることができるであろう。本発明の範囲は上の記載に限定されることを意図されず、むしろ添付の請求項において提出されたとおりである。

【0444】

請求項において、「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」などの冠詞は、反対に指示されないかまたは文脈から別様に明白でない限り、1つまたは1つよりも多くを意味し得る。反対に指示されないかまたは文脈から別様に明白でない限り、ある群の1以上のメンバーの間に「または」を包含する請求項または記載は、群のメンバーの1つ、1つよりも多く、または全てが所与の産物またはプロセスに存在するか、採用されるか、または別様に該当する場合には、満たされていると考えられる。本発明は、群の厳密に1つのメンバーが所与の産物またはプロセスに存在するか、採用されるか、または別様に該当する態様を包含する。本発明は、群のメンバーの1つよりも多くまたは全てが所与の産物またはプロセスに存在するか、採用されるか、または別様に該当する態様を包含する。

【0445】

10

さらにその上、本発明は、請求項または明細書の該当する部分の1以上からの1以上の限定、要素、節、記述用語などが別の請求項に導入される全ての変形、組み合わせ、および順列を包摂するということは理解されるべきである。例えば、別の請求項に従属するいずれかの請求項は、同じ元の請求項に従属するいずれかの他の請求項に見出される1以上の限定を包含するように改変され得る。さらにその上、請求項が組成物を記載するところでは、別様に指示されない限り、または矛盾もしくは不整合が生ずるであろうということが当業者に明白でない限り、本明細書において開示される目的のいずれかのための組成物を使用する方法が包含され、本明細書において開示される作る方法または当該技術分野で知られている他の方法のいずれかに従って組成物を作る方法が包含されるということは理解されるべきである。

20

【0446】

要素がリストとして、例としてマーカッシュ群形式で提示されるところでは、要素の各下位群もまた開示され、いずれかの要素(単数または複数)は群から取り除かれ得るということが理解されるべきである。用語「含む」は開放的であることを意図され、追加の要素またはステップの包含を許可するということもまた注記される。一般的に、本発明または本発明の側面が、特定の要素、特徴、ステップなどを含むと言われるところでは、ある特定の発明の態様または本発明の側面がかかる要素、特徴、ステップなどからなるかまたは本質的になるということが理解されるべきである。単純の目的のために、それらの態様は本明細書において具体的に逐語的に提出されてはいない。それゆえに、1以上の要素、特徴、ステップなどを含む本発明の各態様について、本発明は、それらの要素、特徴、ステップなどからなるかまたは本質的になる態様をもまた提供する。

30

【0447】

範囲が与えられるところでは、終点が包含される。さらにその上、別様に指示されないかまたは文脈および／もしくは当業者の理解から別様に明白でない限り、範囲として表現される値は、文脈が明確に別様に指示しない限り、本発明の異なる態様において申し立てられた範囲内のいずれかの特定の値を、範囲の下限の単位の10分の1までとり得るということが理解されるべきである。別様に指示されないかまたは文脈および／もしくは当業者の理解から別様に明白でない限り、範囲として表現される値は、所与の範囲内のいずれかの部分範囲をとり得、ここで、部分範囲の終点は、範囲の下限の単位の10分の1と同じ正確さの度合いで表現されるということもまた理解されるべきである。

40

【0448】

加えて、本発明のいずれかの特定の態様は請求項のいずれか1以上から明示的に除外され得るということは理解されるべきである。範囲が与えられるところでは、範囲内のいずれかの値は請求項のいずれか1以上から明示的に除外され得る。本発明の組成物および／または方法のいずれかの態様、要素、特徴、適用、または側面は、いずれか1以上の請求項から除外され得る。簡潔の目的で、1以上の要素、特徴、目的、または側面が除外される態様の全てが本明細書において明示的に提出されているわけではない。

【0449】

上に列挙された項目を包含する本明細書において言及される全ての公開、特許、および配列データベースエントリーは、各個々の公開または特許が具体的かつ個々に参照によっ

50

て組み込まれることが指示される場合のように、それらの全体が参照によってここに組み込まれる。相反のケースでは、本明細書におけるいずれかの定義を包含して、本願が優先されるであろう。

【図面】

【図 1 A】

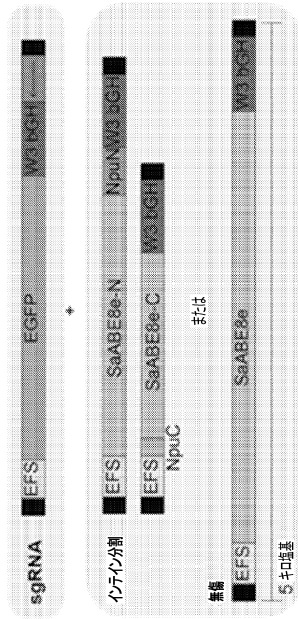


図 1A

【図 1 B】

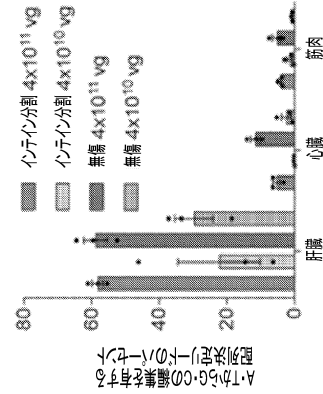


図 1B

10

20

30

40

50

【図 1 C - 2 A】

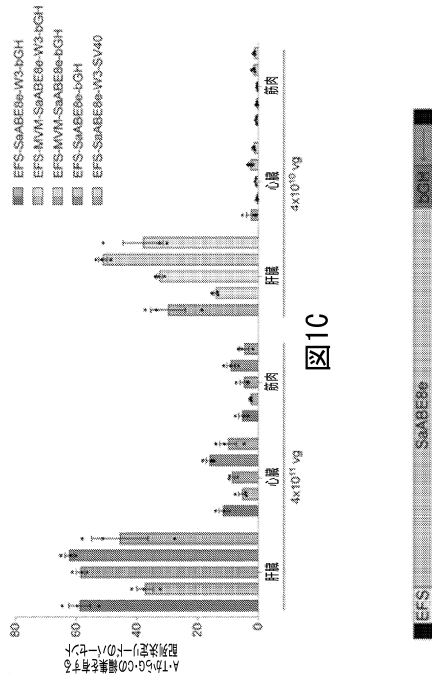


図2A

【図 2 B】

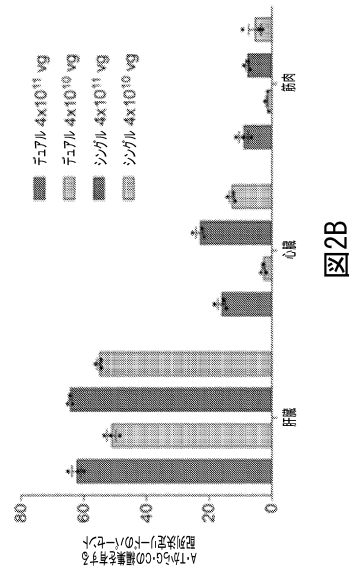


図2B

【図 2 C】

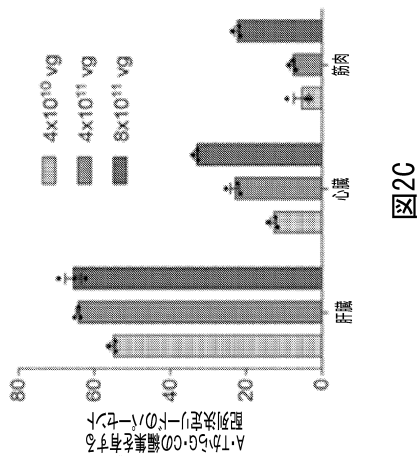


図2C

【図 3 A】

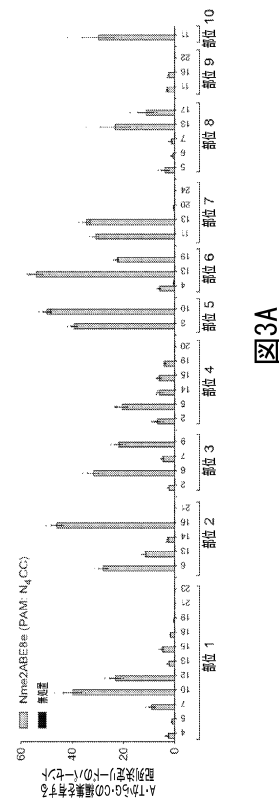


図3A

10

20

30

40

50

【図 3 B】

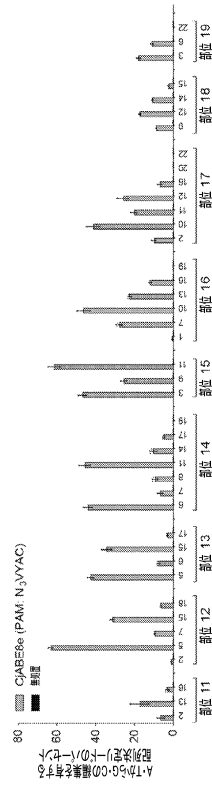


図3B

【図 3 C】

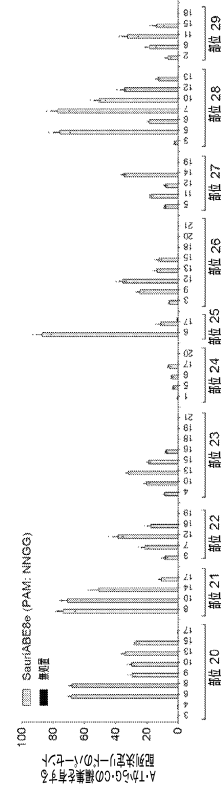


図3C

【図 3 D】

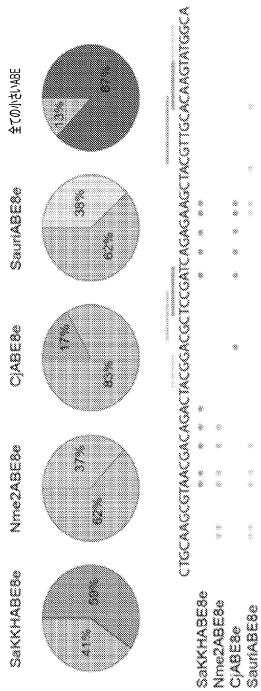


図3D

【図 4 A】

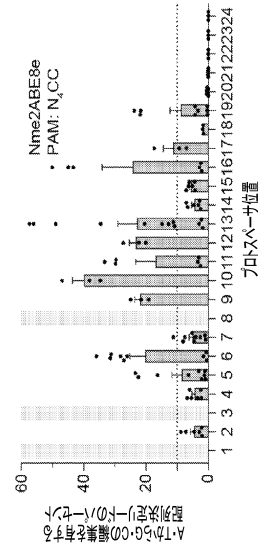
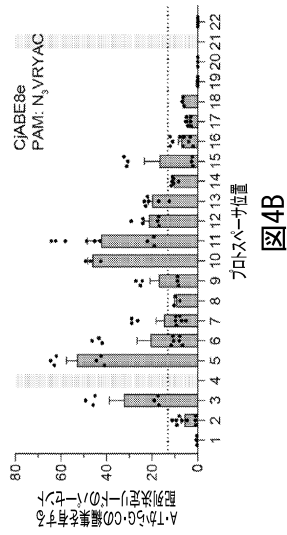
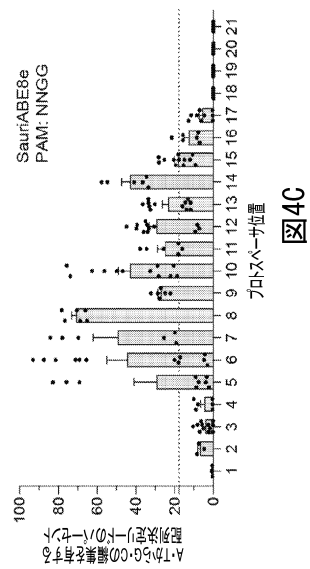


図4A

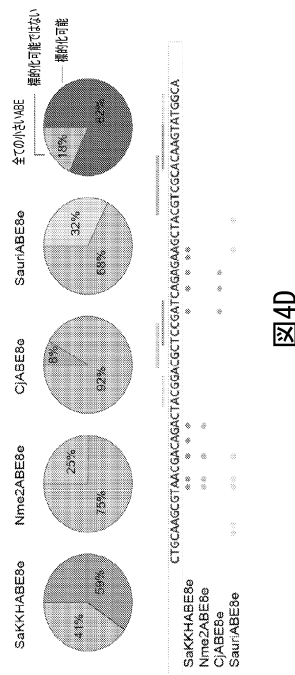
【図 4 B】



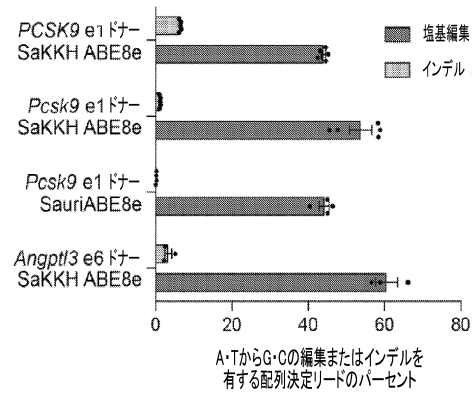
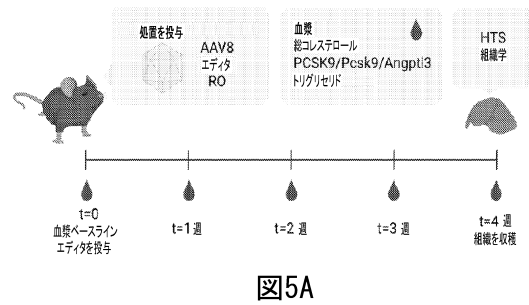
【図 4 C】



【図 4 D】



【図 5 A - 5 B】



10

20

30

40

50

【図 5 C - 5 D】

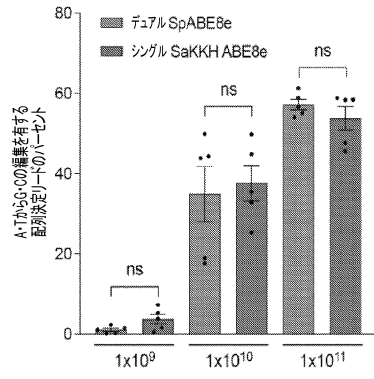


図5C

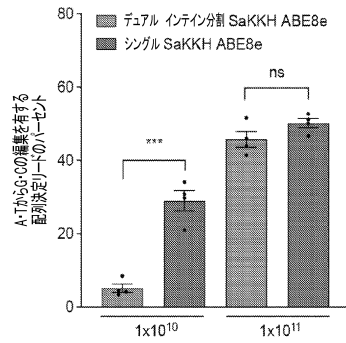


図5D

【図 5 E】

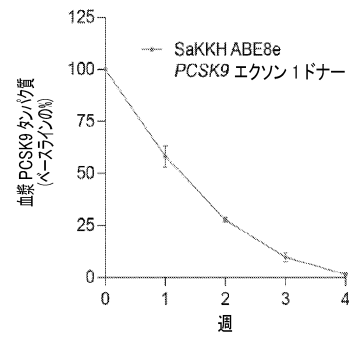


図5E

10

20

【図 5 F】

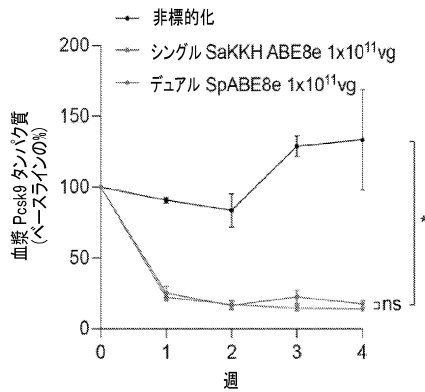


図5F

【図 5 G - 5 H】

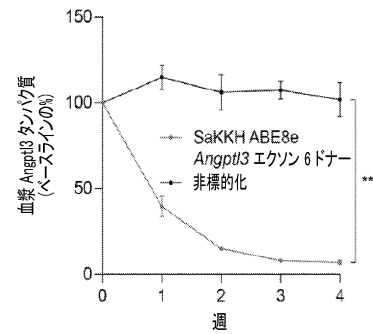


図5G

30

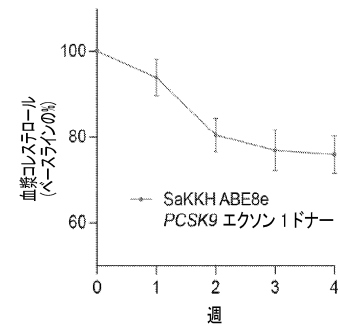


図5H

40

50

【図 5 I】

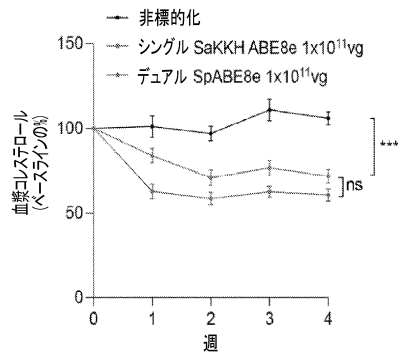


図5I

【図 5 J】

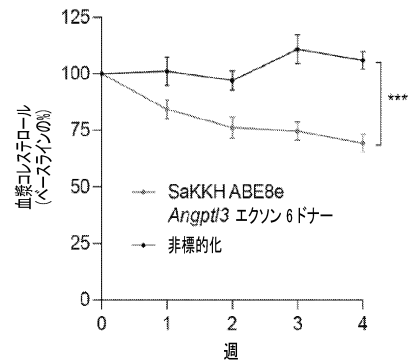


図5J

10

20

【図 5 K】

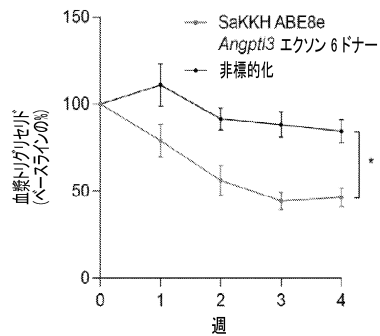


図5K

【図 6】

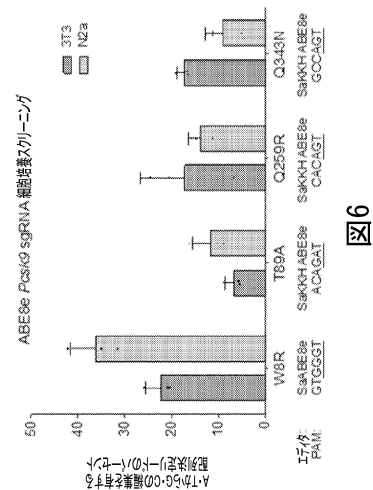


図6

30

40

50

【図 9 C】

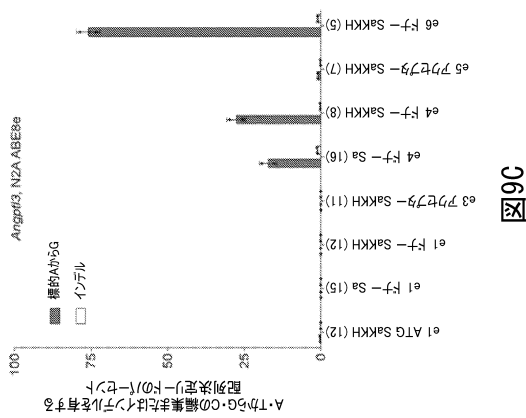


図9C

【図 1 0 A】

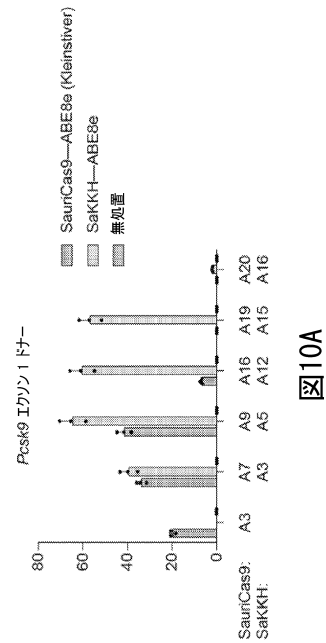


図10A

【図 1 0 B】

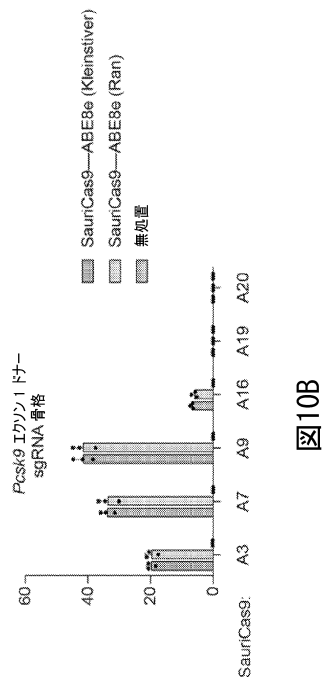


図10B

【図 1 1 A - 1 1 B】

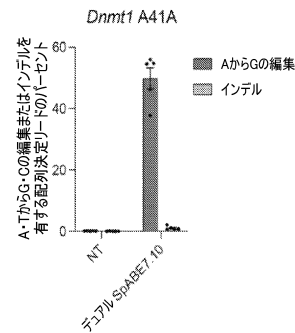


図11A

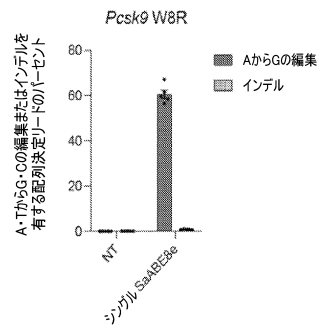


図11B

10

20

30

40

50

【図 1 2 A】

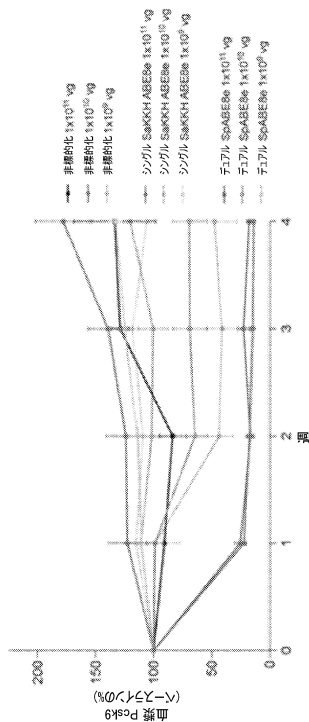


図12A

【図 1 2 B】

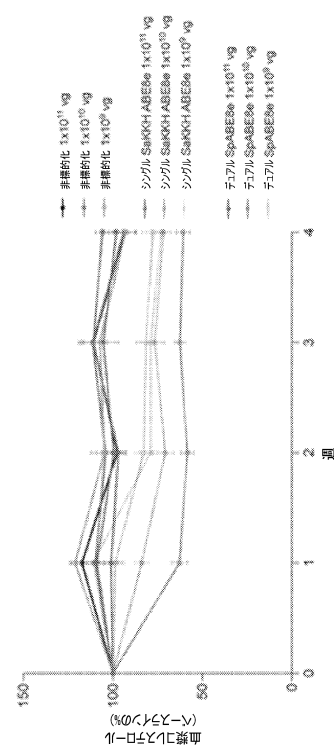


図12B

【図 1 2 C】

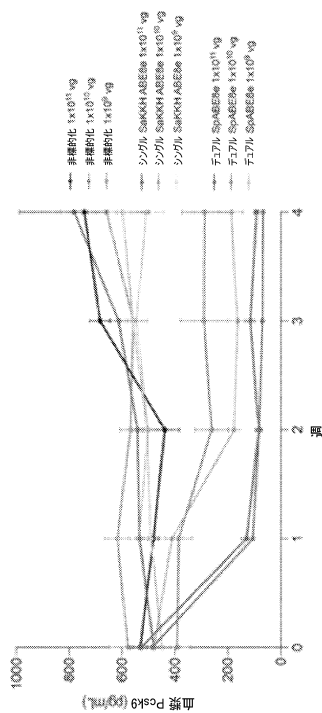


図12C

【図 1 2 D】

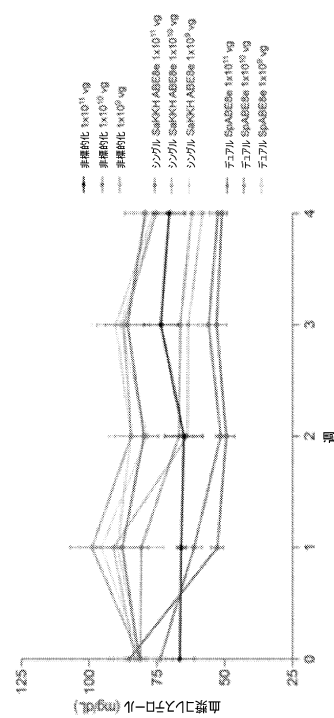


図12D

10

20

30

40

50

【図 1 3 A - 1 3 B】

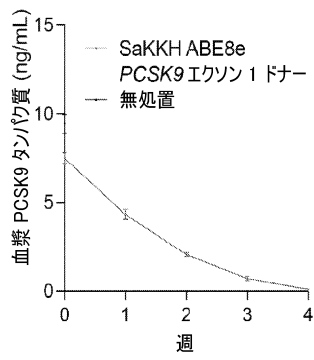


図13A

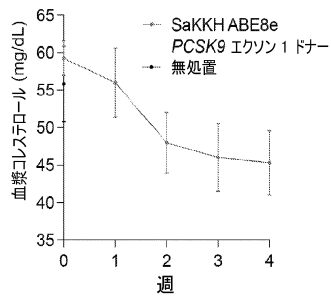


図13B

【図 1 3 C - 1 3 D】

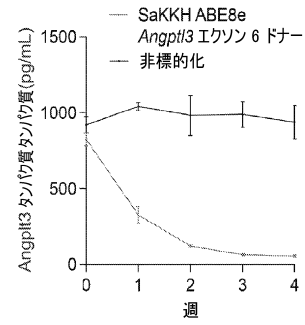


図13C

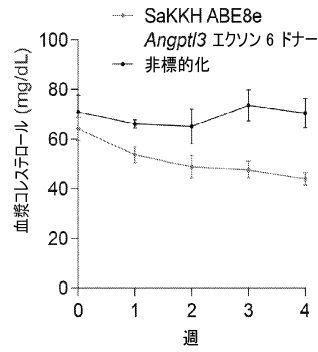


図13D

【図 1 3 E】

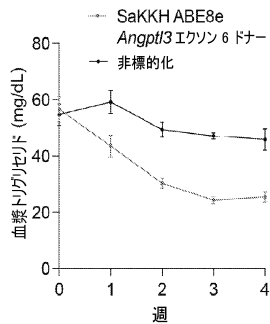


図13E

【図 1 4】

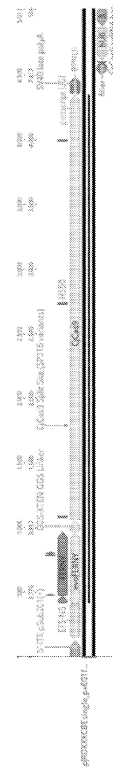


図14

10

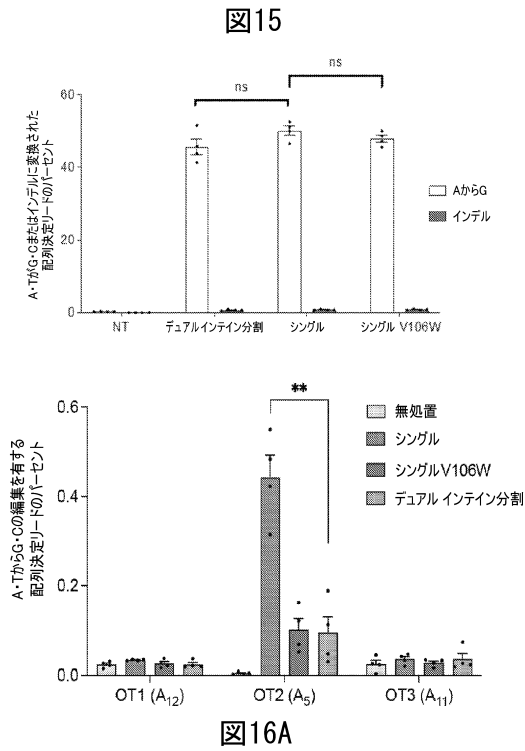
20

30

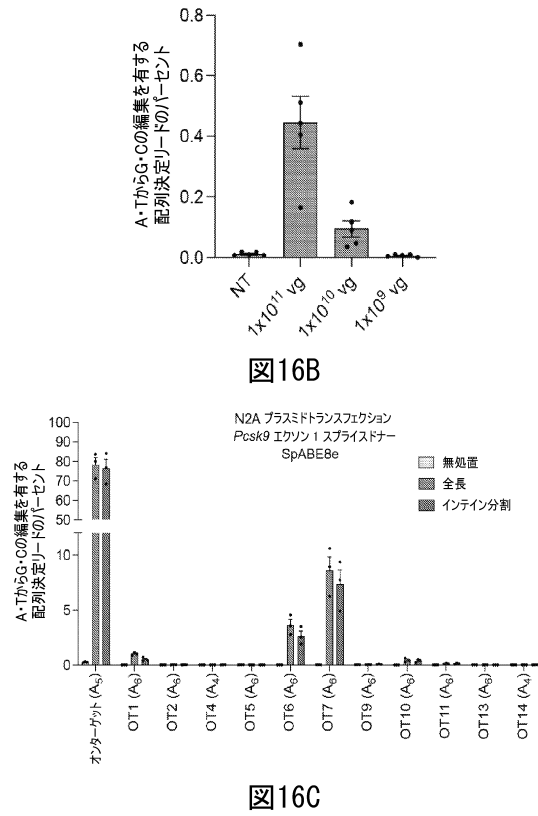
40

50

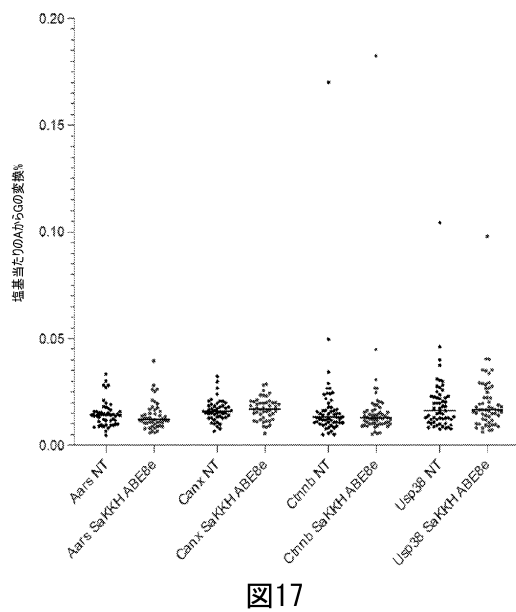
【図 15 - 16 A】



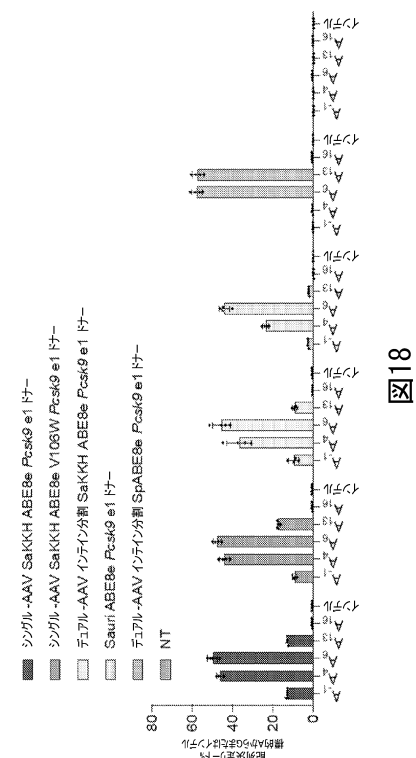
【図 16 B - 16 C】



【図 17】



【図 18】



10

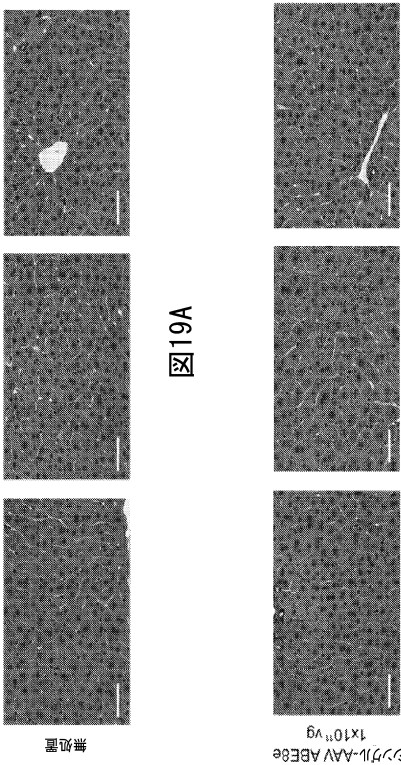
20

30

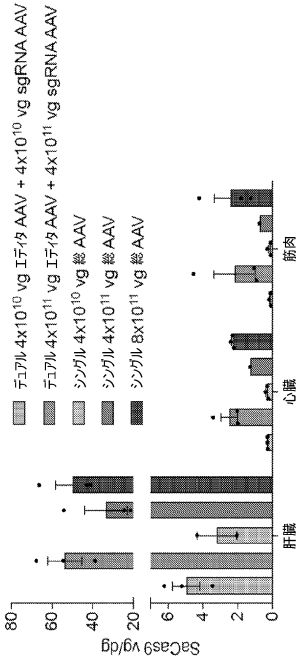
40

50

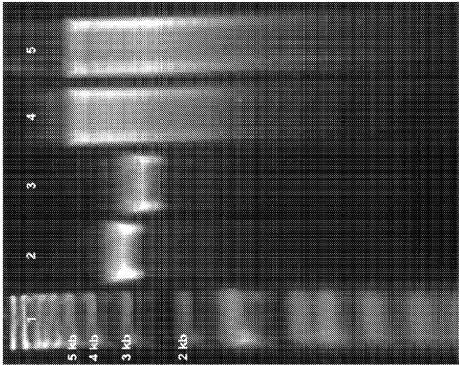
【図 19 A - 19 B】



【図 20】



【図 2 1】



レーン	サンプル	予想される長さ (bp)
1	1 kb+ ラダー	
2	AAV8/SaKKH-ABE8e NpuN	3,415
3	AAV8/SaKKH-ABE8e NpuC U6 Pcsk9 e1 ノー	2,976
4	AAV8/SaKKH-ABE8e U6 Pcsk9 e1 ノー	5,064
5	AAV8/Sauri ABE8e U6 Pcsk9 e1 ノー	5,098

【図 2 2 A】

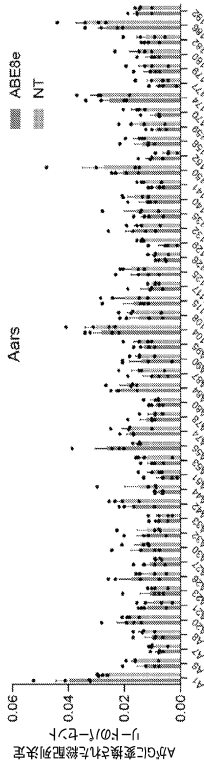


図20

図21

図22A

【図 2 2 B】

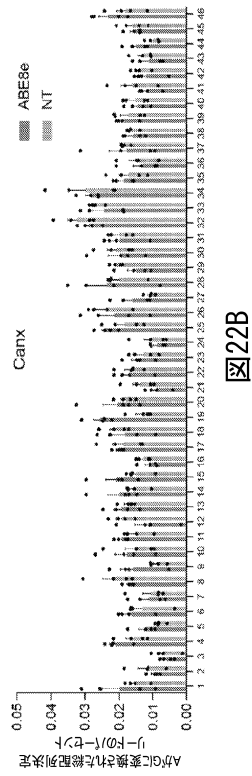


図 22B

【図 2 2 C】

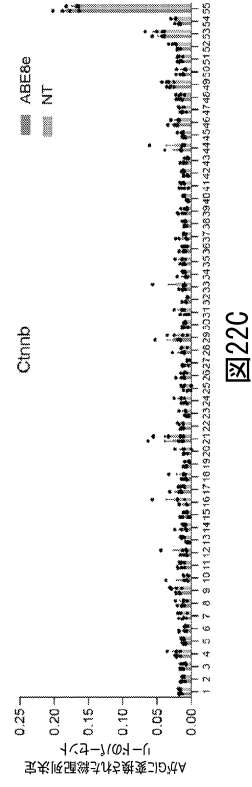


図 22C

【図 2 2 D】

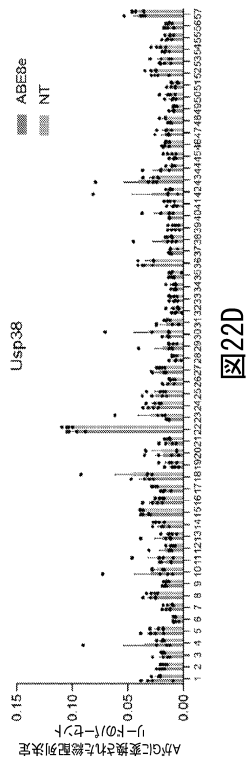


図 22D

10

20

30

40

50

【配列表】

2025515503000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066389

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. **A61K48/00 C12N9/22 C12N9/78 C12N15/11 C12N15/86**
C12N15/90

ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C12N

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kim Do Yon ET AL: "AAV-deliverable hypercompact adenine base editors based on transposase B guided by engineered RNA", Research Square, 12 April 2022 (2022-04-12), pages 1-20, XP093069291, DOI: 10.21203/rs.3.rs-1326630/v1 Retrieved from the Internet: URL:https://www.researchsquare.com/article/rs-1326630/v1 [retrieved on 2023-08-01] page 3; figure 3 page 8 - page 9 ----- -/-	1-4, 11, 14, 19-23, 41-45, 55, 56, 60-62, 66-97, 101-103, 109, 110

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

*** Special categories of cited documents :**

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 August 2023

Date of mailing of the international search report

11/08/2023

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Deleu, Laurent

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066389

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Zhang Han ET AL: "Adenine Base Editing in vivo with a Single Adeno-Associated Virus Vector", bioRxiv, 13 December 2021 (2021-12-13), XP093069332, DOI: 10.1101/2021.12.13.472434 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.13.472434v1.full [retrieved on 2023-08-01]	1-7, 11-16, 19-24, 27-30, 40-45, 48, 55-63, 66-90, 109,110
Y	figures 3, 5	8-10,17, 18,25, 26, 31-37, 46,47, 49-54, 64,65, 98-100, 104-108
X	----- Nguyen Tran Minh Thuan ET AL: "Engineering domain-inlaid SaCas9 adenine base editors with reduced RNA off-targets and increased on-target DNA editing", Nature communications, 25 September 2020 (2020-09-25), pages 4871-4871, XP055799432, London DOI: 10.1038/s41467-020-18715-y Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41467-020-18715-y.pdf [retrieved on 2021-04-28] cited in the application page 6; figure 4	1-6, 11-16, 19,20, 23,38, 39, 41-45, 55-61, 66-80, 82,96, 110
Y	----- LRHAGVASUREN DAMDINDORJ ET AL: "A Comparative Analysis of Constitutive Promoters Located in Adeno-Associated Viral Vectors", PLOS ONE, vol. 9, no. 8, 29 August 2014 (2014-08-29), page e106472, XP055502111, DOI: 10.1371/journal.pone.0106472 page 4	8-10
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066389

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/236982 A1 (BROAD INST INC [US]; HARVARD COLLEGE [US]) 26 November 2020 (2020-11-26) paragraph [0121] paragraph [0126] paragraph [0310] paragraph [0352] paragraph [0423] paragraph [0470] - paragraph [0518] -----	17, 18, 25, 26, 31-37, 46, 47, 49-54, 64, 65, 98-100, 104-108
X,P	DAVIS JESSIE R. ET AL: "Efficient in vivo base editing via single adeno-associated viruses with size-optimized genomes encoding compact adenine base editors", NATURE BIOMEDICAL ENGINEERING, vol. 6, no. 11, 28 July 2022 (2022-07-28), pages 1272-1283, XP093069006, DOI: 10.1038/s41551-022-00911-4 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41551- 022-00911-4> the whole document -----	1-110

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/066389

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/066389

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020236982 A1	26-11-2020	EP 3973054 A1	30-03-2022
		US 2022249697 A1	11-08-2022
		WO 2020236982 A1	26-11-2020

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 7/01 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088(2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 C 0 7 H 21/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 A 6 1 K 38/43 (2006.01)
 A 6 1 K 47/36 (2006.01)

C 1 2 N 7/01
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 35/76
 C 0 7 H 21/00
 A 6 1 K 35/12
 A 6 1 K 38/43
 A 6 1 K 47/36

4 C 0 8 7

C S P

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
 E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
 M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
 AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
 ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
 A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,P
 H,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,
 UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. PYTHON

ハーバード カレッジ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, クインシー ストリート 1 7
 110003971

(74)代理人

弁理士法人葛和国際特許事務所

(72)発明者

リウ, デイヴィッド, アール.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
 ケア オブ ザ ブロード インスティテュート、インコーポレーテッド

(72)発明者

レヴィ, ジョナサン, マ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
 ケア オブ ザ ブロード インスティテュート、インコーポレーテッド

(72)発明者

デビス, ジェシー, ローズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
 ケア オブ ザ ブロード インスティテュート、インコーポレーテッド

(72)発明者

ファン, トニー, ピー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
 ケア オブ ザ ブロード インスティテュート、インコーポレーテッド

(72)発明者

ウィッテ, アイザック

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2、ケンブリッジ、メイン ストリート 4 1 5、
 ケア オブ ザ ブロード インスティテュート、インコーポレーテッド

F ターム (参考)

4B065 AA01X AA01Y AA72X AA87X AA90X AA90Y AA95Y AB01 AC14 AC20
 BA02 CA24 CA44 CA60

4C057 BB02 CC03 DD01 MM01 MM09

4C076 AA95 CC41 CC50 EE30 EE59 FF70

4C084 AA13 NA13

4C086 AA01 AA02 AA10 EA16 MA01 MA04 NA13

4C087 AA01 AA02 AA10 BB65 BC83 CA12 NA13