

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-530487
(P2024-530487A)

(43)公表日 令和6年8月21日(2024.8.21)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0	4 B 0 2 9
C 1 2 N	9/12 (2006.01)	C 1 2 N	9/12		Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全317頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-507108(P2024-507108)			(71)出願人	515025398
(86)(22)出願日	令和4年8月5日(2022.8.5)				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4月5日(2024.4.5)				コーポレーテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2022/074628				THE BROAD INSTITUTE
(87)国際公開番号	WO2023/015309				, INC.
(87)国際公開日	令和5年2月9日(2023.2.9)				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	63/230,688				2142、ケンブリッジ、メイン スト
(32)優先日	令和3年8月6日(2021.8.6)				リート 415、ルーム 7003
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				415 Main Street, Roo
(31)優先権主張番号	63/388,888				m 7003, Cambridge, M
(32)優先日	令和4年7月13日(2022.7.13)				assachusetts 02142
(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,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			(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】 改善されたプライムエディターおよび使用方法

(57)【要約】

本開示は、改善された編集効率および/または改変されたプライムエディターおよびプライムエディター融合タンパク質による低減されたインデル形成を有するプライム編集のための組成物および方法を提供する。本開示は、本開示の組成物およびポリヌクレオチドを含むベクター、細胞およびキットをさらに提供する。

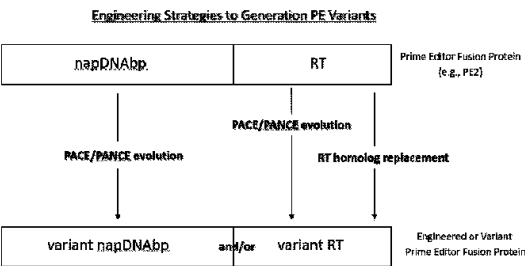


FIG. 27A

【特許請求の範囲】

【請求項1】

プライムエディターであって、核酸-プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)およびマウス乳癌ウイルス(MMTV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、トリ肉腫白血病ウイルス(ASLV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、ブタ内在性レトロウイルス(PE RV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、HIV-MMLV逆転写酵素もしくはそのバリエーション、AVIRE逆転写酵素もしくはそのバリエーション、ヒヒ内在性ウイルス(BAEVM)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、テナガザル白血病ウイルス(GALV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、コアラレトロウイルス(KORV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、マソンファイザー(Mason-Pfizer)サルウイルス(MPMV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、POK11ERV逆転写酵素もしくはそのバリエーション、サルレトロウイルス2型(SRV2)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、ウーリーサル肉腫ウイルス(WMSV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Vp96逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Vc95逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Ec48逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Gs逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Er逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Ne144逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Tf1逆転写酵素もしくはそのバリエーション、またはRs09415逆転写酵素(「CRISPR-RT」)もしくはそのバリエーションを含む、プライムエディター。

10

【請求項2】

プライムエディターが、配列番号216のAVIRE逆転写酵素、または配列番号216と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するAVIRE逆転写酵素バリエーションを含み、AVIRE逆転写酵素バリエーションが、D199N、T305K、W312F、G329P、およびL604Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、請求項1に記載のプライムエディター。

20

【請求項3】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、突然変異D199Nを含む、請求項2に記載のプライムエディター。

【請求項4】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、突然変異T305Kを含む、請求項2または3に記載のプライムエディター。

30

【請求項5】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、突然変異W312Fを含む、請求項2～4のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項6】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、突然変異G329Pを含む、請求項2～5のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項7】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、突然変異L604Wを含む、請求項2～6のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項8】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、配列番号217～221のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号217～221のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基199N、305K、312F、329P、および604Wのうちの少なくとも1つを含む、請求項2～7のいずれか一項に記載のプライムエディター。

40

【請求項9】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、配列番号243のアミノ酸配列、または配列番号243と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは

50

は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基199N、305K、312F、329P、および604Wを含む、請求項2～7のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項10】

プライムエディターが、配列番号222のKORV逆転写酵素、または配列番号222と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するKORV逆転写酵素バリエーションを含み、KORV逆転写酵素バリエーションが、D197N、T303K、W310F、E327P、およびL599Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、請求項1に記載のプライムエディター。

10

【請求項11】

KORV逆転写酵素バリエーションが、突然変異D197Nを含む、請求項10に記載のプライムエディター。

【請求項12】

KORV逆転写酵素バリエーションが、突然変異T303Kを含む、請求項10または11に記載のプライムエディター。

【請求項13】

KORV逆転写酵素バリエーションが、突然変異W310Fを含む、請求項10～12のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項14】

KORV逆転写酵素バリエーションが、突然変異E327Pを含む、請求項10～13のいずれか一項に記載のプライムエディター。

20

【請求項15】

KORV逆転写酵素バリエーションが、突然変異L599Wを含む、請求項10～14のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項16】

KORV逆転写酵素バリエーションが、配列番号223～227のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号223～227のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基197N、303K、310F、327P、および599Wのうちの少なくとも1つを含む、請求項10～15のいずれか一項に記載のプライムエディター。

30

【請求項17】

KORV逆転写酵素バリエーションが、配列番号244のアミノ酸配列、または配列番号244と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基197N、303K、310F、327P、および599Wを含む、請求項10～15のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項18】

プライムエディターが、配列番号228のWMSV逆転写酵素、または配列番号228と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するWMSV逆転写酵素バリエーションを含み、WMSV逆転写酵素バリエーションが、D197N、T303K、W311F、E327P、およびL599Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、請求項1に記載のプライムエディター。

40

【請求項19】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、突然変異D197Nを含む、請求項18に記載のプライムエディター。

【請求項20】

50

WMSV逆転写酵素バリエーションが、突然変異T303Kを含む、請求項18または19に記載のプライムエディター。

【請求項21】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、突然変異W311Fを含む、請求項18～20のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項22】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、突然変異E327Pを含む、請求項18～21のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項23】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、突然変異L599Wを含む、請求項18～22のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項24】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、配列番号229～233のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号229～233のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基197N、303K、311F、327P、および599Wのうちの少なくとも1つを含む、請求項18～23のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項25】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、配列番号245のアミノ酸配列、または配列番号245と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基197N、303K、311F、327P、および599Wを含む、請求項18～23のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項26】

プライムエディターが、配列番号45のPERV逆転写酵素、または配列番号45と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するPERV逆転写酵素バリエーションを含み、PERV逆転写酵素バリエーションが、D199N、T305K、W312F、E329P、およびL602Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、請求項1に記載のプライムエディター。

【請求項27】

PERV逆転写酵素バリエーションが、突然変異D199Nを含む、請求項26に記載のプライムエディター。

【請求項28】

PERV逆転写酵素バリエーションが、突然変異T305Kを含む、請求項26または27に記載のプライムエディター。

【請求項29】

PERV逆転写酵素バリエーションが、突然変異W312Fを含む、請求項26～28のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項30】

PERV逆転写酵素バリエーションが、突然変異E329Pを含む、請求項26～29のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項31】

PERV逆転写酵素バリエーションが、突然変異L602Wを含む、請求項26～30のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項32】

PERV逆転写酵素バリエーションが、配列番号214および234～238のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号214および234～238のいずれか1つと少なくとも70%、少

10

20

30

40

50

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%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基199N、305K、312F、329P、および602Wのうちの少なくとも1つを含む、請求項26~31のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項33】

PERV逆転写酵素バリエーションが、配列番号215のアミノ酸配列、または配列番号215と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基199N、305K、312F、329P、および602Wを含む、請求項26~31のいずれか一項に記載のプライムエディター。

10

【請求項34】

プライムエディターが、配列番号55のTf1逆転写酵素、または配列番号55と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するTf1逆転写酵素バリエーションを含み、Tf1逆転写酵素バリエーションが、配列番号55に対して、V14A、E22K、I64L、I64W、P70T、G72V、M102I、K106R、K118R、L133N、A139T、L158Q、S188K、I260L、F269L、E274R、R288Q、Q293K、S297Q、N316Q、K321R、K356E、A363V、K413E、I423V、およびS492Nからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、請求項1に記載のプライムエディター。

20

【請求項35】

Tf1逆転写酵素バリエーションが、I64L突然変異、I64W突然変異、K118R突然変異、L133N突然変異、S188K突然変異、I260L突然変異、E274R突然変異、R288Q突然変異、Q293K突然変異、S297Q突然変異、N316Q突然変異、またはK321R突然変異を含む、請求項34に記載のプライムエディター。

【請求項36】

Tf1逆転写酵素バリエーションが、配列番号55のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群：K118RおよびS297Q；

30

V14A、L158Q、F269L、およびK356E；

E22K、P70T、G72V、M102I、K106R、A139T、L158Q、F269L、A363V、K413E、およびS492N；

P70T、G72V、M102I、K106R、L158Q、F269L、A363V、K413E、およびS492N；

K106R、L158Q、F269L、A363V、およびI423V；

K118R、S297Q、S188K、I64L、I260L、およびR288Q；

E22K、P70T、G72V、M102I、K106R、A139T、L158Q、F269L、A363V、K413E、S492N、K118R、S297Q、S188K、I64L、およびI260L；

K118RおよびS188K；

40

K118R、S188K、およびI260L；

K118R、S188K、I260L、およびS297Q；または

K118R、S188K、I260L、R288K、およびS297Q

のいずれか1つを含む、請求項34に記載のプライムエディター。

【請求項37】

Tf1逆転写酵素バリエーションが、配列番号196~213および251~255のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号196~213および251~255のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基14A、22K、64L、64W、7

50

0T、72V、102I、106R、118R、133N、139T、158Q、188K、260L、269L、274R、288Q、293K、297Q、316Q、321R、356E、363V、413E、423V、および492Nのうちの少なくとも1つを含む、請求項34～36のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項38】

プライムエディターが、配列番号59のEc48逆転写酵素、または配列番号59と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するEc48逆転写酵素バリエーションを含み、Ec48逆転写酵素バリエーションが、配列番号59に対して、A36V、E54K、E60K、K87E、S151T、E165D、L182N、T189N、R205K、V214L、D243N、R267I、S277F、E279K、V303M、K307R、R315K、N317S、K318E、H324Q、K326E、E328K、K343N、R372K、R378K、およびT385Rからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、請求項1に記載のプライムエディター。

10

【請求項39】

Ec48逆転写酵素バリエーションが、L182N突然変異、T189N突然変異、K307R突然変異、R315K突然変異、R378K突然変異、またはT385R突然変異を含む、請求項38に記載のプライムエディター。

【請求項40】

Ec48逆転写酵素バリエーションが、配列番号59のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群：R267I、K318E、K326E、E328K、およびR372K；K87E、R205K、V214L、D243N、R267I、N317S、K318E、H324Q、およびK326E；

20

E54K、K87E、D243N、R267I、E279K、およびK318E；

A36V、K87E、R205K、D243N、R267I、E279K、およびK318E；

E54K、K87E、D243N、R267I、E279K、およびK318E；

E54K、K87E、D243N、R267I、S277F、E279K、およびK318E；

E60K、K87E、E165D、D243N、R267I、E279K、K318E、およびK343N；

E60K、K87E、S151T、E165D、D243N、R267I、E279K、V303M、K318E、およびK343N；または

30

R315K、L182N、およびT189N

のいずれか1つを含む、請求項39に記載のプライムエディター。

【請求項41】

Ec48逆転写酵素バリエーションが、配列番号188～195、256および257のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号188～195、256および257のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基36V、54K、60K、87E、151T、165D、182N、189N、205K、214L、243N、267I、277F、279K、303M、307R、315K、317S、318E、324Q、326E、328K、343N、372K、378K、および385Rのうちの少なくとも1つを含む、請求項38～40のいずれか一項に記載のプライムエディター。

40

【請求項42】

プライムエディターが、配列番号239のNe144逆転写酵素、または配列番号239と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するNe144逆転写酵素バリエーションを含み、Ne144逆転写酵素バリエーションが、配列番号239に対して、A157T、A165T、およびG288Vからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、請求項1に記載のプライムエディター。

【請求項43】

50

Ne144逆転写酵素バリエーションが、突然変異A157T、A165T、およびG288Vを含む、請求項42に記載のプライムエディター。

【請求項44】

Ne144逆転写酵素バリエーションが、配列番号240のアミノ酸配列、または配列番号240と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基157T、165T、および288Vのうちの少なくとも1つを含む、請求項42または43に記載のプライムエディター。

【請求項45】

プライムエディターが、配列番号241のVc95逆転写酵素、または配列番号241と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するVc95逆転写酵素バリエーションを含み、Vc95逆転写酵素バリエーションが、配列番号241に対して、L11M、S75A、V97M、N146D、およびN245Tからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、請求項1に記載のプライムエディター。

【請求項46】

Vc95逆転写酵素バリエーションが、突然変異L11M、S75A、V97M、N146D、およびN245Tを含む、請求項45に記載のプライムエディター。

【請求項47】

Vc95逆転写酵素バリエーションが、配列番号242のアミノ酸配列、または配列番号242と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基11M、75A、97M、146D、および245Tのうちの少なくとも1つを含む、請求項45または46に記載のプライムエディター。

【請求項48】

プライムエディターが、配列番号60のGs逆転写酵素、または配列番号60と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するGs逆転写酵素バリエーションを含み、Gs逆転写酵素バリエーションが、配列番号60に対して、N12D、A16E、A16V、L17P、V20G、L37R、L37P、R38H、Y40C、I41N、I41S、W45R、I67T、I67R、G72E、G73V、G78V、Q93R、A123V、Y126F、E129G、K162N、P190L、D206V、R233K、A234V、R263G、P264S、R267M、K279E、R287I、R291K、P309T、R344S、R358S、R360S、E363G、V374A、およびQ412Hからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、請求項1に記載のプライムエディター。

【請求項49】

Gs逆転写酵素バリエーションが、配列番号60のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群：
L17PおよびD206V；

N12D、L37R、およびG78V；

A16E、L37P、およびA123V；

A16V、R38H、W45R、Y126F、およびQ412H；

A16V、R38H、W45R、およびR291K；

N12D、L37R、G72E、E129G、P264S、R344S、およびR360S；

N12D、Y40C、I67T、G73V、Q93R、R287I、およびR358S；

N12D、Y40C、I67T、G73V、Q93R、およびR358S；

N12D、I41N、P190L、A234V、およびK279E；

N12D、L37R、R267M、P309T、R358S、およびE363G；

10

20

30

40

50

A16V、V20G、I41S、R233K、およびP264S;
L17P、V20G、I41S、I67R、R263G、P264S、およびV374A;または
L17P、V20G、I41S、I67R、K162N、R263G、およびP264S
のいずれか1つを含む、請求項48に記載のプライムエディター。

【請求項50】

Gs逆転写酵素バリエーションが、配列番号159~171のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号159~171のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基12D、16E、16V、17P、20G、37R、37P、38H、40C、41N、41S、45R、67T、67R、72E、73V、78V、93R、123V、126F、129G、162N、190L、206V、233K、234V、263G、264S、267M、279E、287I、291K、309T、344S、358S、360S、363G、374A、および412Hのうちの少なくとも1つを含む、請求項48または49に記載のプライムエディター。

【請求項51】

核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)ならびにT13I、V19I、A32T、G38V、S60Y、P111L、K120R、H126Y、T128N、T128F、T128H、V129S、P132S、G138R、C157F、P175Q、P175S、D200S、D200Y、D200C、Y222F、V223A、V223M、V223T、V223W、V223Y、L234I、T246I、N249S、T287A、P292T、E302A、E302K、G316R、E346K、K373N、W388C、V402A、K445N、M457I、およびA462Sからなる群から選択される、配列番号33に対して1つ以上の突然変異を含むMMLV逆転写酵素バリエーションを含むプライムエディター。

【請求項52】

MMLV逆転写酵素バリエーションが、T13I、G38V、K120R、H126Y、T128N、T128F、T128H、V129S、P132S、P175Q、P175S、D200C、D200Y、V223M、V223T、V223W、V223Y、L234I、P292T、G316R、K373N、M457I、およびV402Aからなる群から選択される配列番号33に対する単一突然変異を含む、請求項51に記載のプライムエディター。

【請求項53】

MMLV逆転写酵素バリエーションが、配列番号33のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群:

D200YおよびE302A;
D200Y、V223A、およびM457I;
V223M、T306K、およびA462S;
D200NおよびE302K;
D200YおよびE302K;
T128NおよびV223A;
V19I、A32T、およびD200Y;
D200S、V223A、E346K、およびW388C;
S60Y、V223A、およびN249S;
P111L、V223A、T287A、およびG316R;
S60Y、G138R、およびV223A;
S60Y、Y222F、V223A、およびK445N;または
S60Y、C157F、V223A、およびT246I

のいずれか1つを含む、請求項51に記載のプライムエディター。

【請求項54】

MMLV逆転写酵素バリエーションが、配列番号35~42、172~177、183、および184のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号35~42、172~177、183、および184のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なく

とも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基131、191、32T、38V、60Y、111L、120R、126Y、128N、128F、128H、129S、132S、138R、157F、175Q、175S、200S、200Y、200C、222F、223A、223M、223T、223W、223Y、234I、246I、249S、287A、292T、302A、302K、316R、346K、373N、388C、402A、445N、457I、および462Sのうちの少なくとも1つを含む、請求項51～53のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項55】

napDNABpがCasタンパク質である、請求項1～54のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項56】

napDNABpがCas9ニッカーゼ(nCas9)またはヌクレアーゼ不活性Cas9(dCas9)である、請求項1～55のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項57】

napDNABpが、配列番号9～32のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号9～32のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む、請求項1～56のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項58】

napDNABpが、D23G、H99Q、H99R、E102K、E102S、E102R、N175K、D177G、K218R、N309D、I312V、E471K、G485S、K562N、D608N、I632V、D645N、D645E、R654C、G687D、G715E、H721Y、R753K、R753G、H754R、K775R、E790K、T804A、K918A、K1003R、M1021Y、E1071K、およびE1260Dからなる群から選択される、配列番号9または配列番号11に対する1つ以上の突然変異を含むCas9バリエーションを含む、請求項1～57のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項59】

Cas9バリエーションがR753G突然変異を含む、請求項58に記載のプライムエディター。

【請求項60】

Cas9バリエーションが、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群：

H721YおよびR753G；

E102KおよびR753G；および

E102K、H721Y、およびR753G

のいずれか1つを含む、請求項58に記載のプライムエディター。

【請求項61】

Cas9バリエーションが、配列番号178～180のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項58に記載のプライムエディター。

【請求項62】

配列番号216と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するAVIRE逆転写酵素バリエーションであって、AVIRE逆転写酵素バリエーションがD199N、T305K、W312F、G329P、およびL604Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、AVIRE逆転写酵素バリエーション。

【請求項63】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、突然変異D199Nを含む、請求項62に記載のAVIRE逆転写酵素バリエーション。

【請求項64】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、突然変異T305Kを含む、請求項62または63に記載

10

20

30

40

50

のAVIRE逆転写酵素バリエーション。

【請求項65】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、突然変異W312Fを含む、請求項62～64のいずれか一項に記載のAVIRE逆転写酵素バリエーション。

【請求項66】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、突然変異G329Pを含む、請求項62～65のいずれか一項に記載のAVIRE逆転写酵素バリエーション。

【請求項67】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、突然変異L604Wを含む、請求項62～66のいずれか一項に記載のAVIRE逆転写酵素バリエーション。

【請求項68】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、配列番号217～221のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号217～221のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基199N、305K、312F、329P、および604Wのうちの少なくとも1つを含む、請求項62～67のいずれか一項に記載のAVIRE逆転写酵素バリエーション。

【請求項69】

AVIRE逆転写酵素バリエーションが、配列番号243のアミノ酸配列、または配列番号243と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基199N、305K、312F、329P、および604Wを含む、請求項62～67のいずれか一項に記載のAVIRE逆転写酵素バリエーション。

【請求項70】

配列番号222と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するKORV逆転写酵素バリエーションであって、KORV逆転写酵素バリエーションが、D197N、T303K、W310F、E327P、およびL599Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、KORV逆転写酵素バリエーション。

【請求項71】

KORV逆転写酵素バリエーションが、突然変異D197Nを含む、請求項70に記載のKORV逆転写酵素バリエーション。

【請求項72】

KORV逆転写酵素バリエーションが、突然変異T303Kを含む、請求項70または71に記載のKORV逆転写酵素バリエーション。

【請求項73】

KORV逆転写酵素バリエーションが、突然変異W310Fを含む、請求項70～72のいずれか一項に記載のKORV逆転写酵素バリエーション。

【請求項74】

KORV逆転写酵素バリエーションが、突然変異E327Pを含む、請求項70～73のいずれか一項に記載のKORV逆転写酵素バリエーション。

【請求項75】

KORV逆転写酵素バリエーションが、突然変異L599Wを含む、請求項70～74のいずれか一項に記載のKORV逆転写酵素バリエーション。

【請求項76】

KORV逆転写酵素バリエーションが、配列番号223～227のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号223～227のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なく

10

20

30

40

50

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%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基197N、303K、310F、327P、および599Wのうちの少なくとも1つを含む、請求項70～75のいずれか一項に記載のKORV逆転写酵素バリエーション。

【請求項77】

KORV逆転写酵素バリエーションが、配列番号244のアミノ酸配列、または配列番号244と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基197N、303K、310F、327P、および599Wを含む、請求項70～75のいずれか一項に記載のKORV逆転写酵素バリエーション。

10

【請求項78】

配列番号228と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するWMSV逆転写酵素バリエーションであって、WMSV逆転写酵素バリエーションが、D197N、T303K、W311F、E327P、およびL599Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、WMSV逆転写酵素バリエーション。

【請求項79】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、突然変異D197Nを含む、請求項78に記載のWMSV逆転写酵素バリエーション。

20

【請求項80】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、突然変異T303Kを含む、請求項78または79に記載のWMSV逆転写酵素バリエーション。

【請求項81】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、突然変異W311Fを含む、請求項78～80のいずれか一項に記載のWMSV逆転写酵素バリエーション。

【請求項82】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、突然変異E327Pを含む、請求項78～81のいずれか一項に記載のWMSV逆転写酵素バリエーション。

30

【請求項83】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、突然変異L599Wを含む、請求項78～82のいずれか一項に記載のWMSV逆転写酵素バリエーション。

【請求項84】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、配列番号229～233のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号229～233のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基197N、303K、311F、327P、および599Wのうちの少なくとも1つを含む、請求項78～83のいずれか一項に記載のWMSV逆転写酵素バリエーション。

40

【請求項85】

WMSV逆転写酵素バリエーションが、配列番号245のアミノ酸配列、または配列番号245と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基197N、303K、311F、327P、および599Wを含む、請求項78～83のいずれか一項に記載のWMSV逆転写酵素バリエーション。

【請求項86】

配列番号45と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%

50

、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するPERV逆転写酵素バリエーションであって、PERV逆転写酵素バリエーションがD199N、T305K、W312F、E329P、およびL602Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、PERV逆転写酵素バリエーション。

【請求項87】

PERV逆転写酵素バリエーションが、突然変異D199Nを含む、請求項86に記載のPERV逆転写酵素バリエーション。

【請求項88】

PERV逆転写酵素バリエーションが、突然変異T305Kを含む、請求項86または87に記載のPERV逆転写酵素バリエーション。

【請求項89】

PERV逆転写酵素バリエーションが、突然変異W312Fを含む、請求項86～88のいずれか一項に記載のPERV逆転写酵素バリエーション。

【請求項90】

PERV逆転写酵素バリエーションが、突然変異E329Pを含む、請求項86～89のいずれか一項に記載のPERV逆転写酵素バリエーション。

【請求項91】

PERV逆転写酵素バリエーションが、突然変異L602Wを含む、請求項86～90のいずれか一項に記載のPERV逆転写酵素バリエーション。

【請求項92】

PERV逆転写酵素バリエーションが、配列番号214および234～238のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号214および234～238のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基199N、305K、312F、329P、および602Wのうちの少なくとも1つを含む、請求項86～91のいずれか一項に記載のPERV逆転写酵素バリエーション。

【請求項93】

PERV逆転写酵素バリエーションが、配列番号215のアミノ酸配列、または配列番号215と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基199N、305K、312F、329P、および602Wを含む、請求項86～91のいずれか一項に記載のPERV逆転写酵素バリエーション。

【請求項94】

配列番号55と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するTf1逆転写酵素バリエーションであって、Tf1逆転写酵素バリエーションが、配列番号55に対して、V14A、E22K、I64L、I64W、P70T、G72V、M102I、K106R、K118R、L133N、A139T、L158Q、S188K、I260L、F269L、E274R、R288Q、Q293K、S297Q、N316Q、K321R、K356E、A363V、K413E、I423V、およびS492Nからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、Tf1逆転写酵素バリエーション。

【請求項95】

Tf1逆転写酵素バリエーションが、I64L突然変異、I64W突然変異、K118R突然変異、L133N突然変異、S188K突然変異、I260L突然変異、E274R突然変異、R288Q突然変異、Q293K突然変異、S297Q突然変異、N316Q突然変異、またはK321R突然変異を含む、請求項94に記載のTf1逆転写酵素バリエーション。

【請求項96】

Tf1逆転写酵素バリエーションが、配列番号55のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群：

10

20

30

40

50

K118RおよびS297Q;
V14A、L158Q、F269L、およびK356E;
E22K、P70T、G72V、M102I、K106R、A139T、L158Q、F269L、A363V、K413E、およびS492N;
P70T、G72V、M102I、K106R、L158Q、F269L、A363V、K413E、およびS492N;
K106R、L158Q、F269L、A363V、およびI423V;
K118R、S297Q、S188K、I64L、I260L、およびR288Q;
E22K、P70T、G72V、M102I、K106R、A139T、L158Q、F269L、A363V、K413E、S492N、K118R、S297Q、S188K、I64L、およびI260L;
K118RおよびS188K;
K118R、S188K、およびI260L;
K118R、S188K、I260L、およびS297Q;または
K118R、S188K、I260L、R288K、およびS297Q
のいずれか1つを含む、請求項94に記載のTf1逆転写酵素バリエーション。

10

【請求項97】

Tf1逆転写酵素バリエーションが、配列番号196~213および251~255のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号196~213および251~255のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基14A、22K、64L、64W、70T、72V、102I、106R、118R、133N、139T、158Q、188K、260L、269L、274R、288Q、293K、297Q、316Q、321R、356E、363V、413E、423V、および492Nのうちの少なくとも1つを含む、請求項94~96のいずれか一項に記載のTf1逆転写酵素バリエーション。

20

【請求項98】

配列番号59と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するEc48逆転写酵素バリエーションであって、Ec48逆転写酵素バリエーションが、配列番号59に対して、A36V、E54K、E60K、K87E、S151T、E165D、L182N、T189N、R205K、V214L、D243N、R267I、S277F、E279K、V303M、K307R、R315K、N317S、K318E、H324Q、K326E、E328K、K343N、R372K、R378K、およびT385Rからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、Ec48逆転写酵素バリエーション。

30

【請求項99】

Ec48逆転写酵素バリエーションが、L182N突然変異、T189N突然変異、K307R突然変異、R315K突然変異、R378K突然変異、またはT385R突然変異を含む、請求項98に記載のEc48逆転写酵素バリエーション。

【請求項100】

Ec48逆転写酵素バリエーションが、配列番号59のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群:
R267I、K318E、K326E、E328K、およびR372K;
K87E、R205K、V214L、D243N、R267I、N317S、K318E、H324Q、およびK326E;
E54K、K87E、D243N、R267I、E279K、およびK318E;
A36V、K87E、R205K、D243N、R267I、E279K、およびK318E;
E54K、K87E、D243N、R267I、E279K、およびK318E;
E54K、K87E、D243N、R267I、S277F、E279K、およびK318E;
E60K、K87E、E165D、D243N、R267I、E279K、K318E、およびK343N;
E60K、K87E、S151T、E165D、D243N、R267I、E279K、V303M、K318E、およびK343N;または

40

50

R315K、L182N、およびT189N

のいずれか1つを含む、請求項99に記載のEc48逆転写酵素バリエーション。

【請求項101】

Ec48逆転写酵素バリエーションが、配列番号188～195、256および257のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号188～195、256および257のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基36V、54K、60K、87E、151T、165D、182N、189N、205K、214L、243N、267I、277F、279K、303M、307R、315K、317S、318E、324Q、326E、328K、343N、372K、378K、および385Rのうちの少なくとも1つを含む、請求項98～100のいずれか一項に記載のEc48逆転写酵素バリエーション。

10

【請求項102】

配列番号239と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するNe144逆転写酵素バリエーションであって、Ne144逆転写酵素バリエーションが、配列番号239に対してA157T、A165T、およびG288Vからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、Ne144逆転写酵素バリエーション。

【請求項103】

Ne144逆転写酵素バリエーションが、突然変異A157T、A165TおよびG288Vを含む、請求項102に記載のNe144逆転写酵素バリエーション。

20

【請求項104】

Ne144逆転写酵素バリエーションが、配列番号240のアミノ酸配列、または配列番号240と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基157T、165T、および288Vのうちの少なくとも1つを含む、請求項102または103に記載のNe144逆転写酵素バリエーション。

【請求項105】

配列番号241と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するVc95逆転写酵素バリエーションであって、Vc95逆転写酵素バリエーションが、配列番号241に対してL11M、S75A、V97M、N146D、およびN245Tからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、Vc95逆転写酵素バリエーション。

30

【請求項106】

Vc95逆転写酵素バリエーションが、突然変異L11M、S75A、V97M、N146DおよびN245Tを含む、請求項105に記載のVc95逆転写酵素バリエーション。

【請求項107】

Vc95逆転写酵素バリエーションが、配列番号242のアミノ酸配列、または配列番号242と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基11M、75A、97M、146D、および245Tのうちの少なくとも1つを含む、請求項105または106に記載のVc95逆転写酵素バリエーション。

40

【請求項108】

配列番号60と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するGs逆転写酵素バリエーションであって

50

、Gs逆転写酵素バリエーションが、配列番号60に対して、N12D、A16E、A16V、L17P、V20G、L37R、L37P、R38H、Y40C、I41N、I41S、W45R、I67T、I67R、G72E、G73V、G78V、Q93R、A123V、Y126F、E129G、K162N、P190L、D206V、R233K、A234V、R263G、P264S、R267M、K279E、R287I、R291K、P309T、R344S、R358S、R360S、E363G、V374A、およびQ412Hからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む、Gs逆転写酵素バリエーション。

【請求項109】

Gs逆転写酵素バリエーションが、配列番号60のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群：

L17PおよびD206V；

N12D、L37R、およびG78V；

A16E、L37P、およびA123V；

A16V、R38H、W45R、Y126F、およびQ412H；

A16V、R38H、W45R、およびR291K；

N12D、L37R、G72E、E129G、P264S、R344S、およびR360S；

N12D、Y40C、I67T、G73V、Q93R、R287I、およびR358S；

N12D、Y40C、I67T、G73V、Q93R、およびR358S；

N12D、I41N、P190L、A234V、およびK279E；

N12D、L37R、R267M、P309T、R358S、およびE363G；

A16V、V20G、I41S、R233K、およびP264S；

L17P、V20G、I41S、I67R、R263G、P264S、およびV374A；または

L17P、V20G、I41S、I67R、K162N、R263G、およびP264S

のいずれか1つを含む、請求項108に記載のGs逆転写酵素バリエーション。

【請求項110】

Gs逆転写酵素バリエーションが、配列番号159～171のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号159～171のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基12D、16E、16V、17P、20G、37R、37P、38H、40C、41N、41S、45R、67T、67R、72E、73V、78V、93R、123V、126F、129G、162N、190L、206V、233K、234V、263G、264S、267M、279E、287I、291K、309T、344S、358S、360S、363G、374A、および412Hのうちの少なくとも1つを含む、請求項108または109に記載のGs逆転写酵素バリエーション。

【請求項111】

T13I、V19I、A32T、G38V、S60Y、P111L、K120R、H126Y、T128N、T128F、T128H、V129S、P132S、G138R、C157F、P175Q、P175S、D200S、D200Y、D200C、Y222F、V223A、V223M、V223T、V223W、V223Y、L234I、T246I、N249S、T287A、P292T、E302A、E302K、G316R、E346K、K373N、W388C、V402A、K445N、M457I、およびA462Sからなる群から選択される、配列番号33に対して1つ以上の突然変異を含むMMLV逆転写酵素バリエーション。

【請求項112】

MMLV逆転写酵素バリエーションが、T13I、G38V、K120R、H126Y、T128N、T128F、T128H、V129S、P132S、P175Q、P175S、D200C、D200Y、V223M、V223T、V223W、V223Y、L234I、P292T、G316R、K373N、M457I、およびV402Aからなる群から選択される配列番号33に対する単一突然変異を含む、請求項111に記載のMMLV逆転写酵素バリエーション。

【請求項113】

MMLV逆転写酵素バリエーションが、配列番号33のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群：

D200YおよびE302A；

D200Y、V223A、およびM457I；

V223M、T306K、およびA462S;
D200NおよびE302K;
D200YおよびE302K;
T128NおよびV223A;
V19I、A32T、およびD200Y;
D200S、V223A、E346K、およびW388C;
S60Y、V223A、およびN249S;
P111L、V223A、T287A、およびG316R;
S60Y、G138R、およびV223A;
S60Y、Y222F、V223A、およびK445N;または
S60Y、C157F、V223A、およびT246I

10

のいずれか1つを含む、請求項111に記載のMMLV逆転写酵素バリエーション。

【請求項114】

MMLV逆転写酵素バリエーションが、配列番号35~42、172~177、183、および184のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号35~42、172~177、183、および184のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基13I、19I、32T、38V、60Y、111L、120R、126Y、128N、128F、128H、129S、132S、138R、157F、175Q、175S、200S、200Y、200C、222F、223A、223M、223T、223W、223Y、234I、246I、249S、287A、292T、302A、302K、316R、346K、373N、388C、402A、445N、457I、および462Sのうちの少なくとも1つを含む、請求項111~113のいずれか一項に記載のMMLV逆転写酵素バリエーション。

20

【請求項115】

D23G、H99Q、H99R、E102K、E102S、E102R、N175K、D177G、K218R、N309D、I312V、E471K、G485S、K562N、D608N、I632V、D645N、D645E、R654C、G687D、G715E、H721Y、R753K、R753G、H754R、K775R、E790K、T804A、K918A、K1003R、M1021Y、E1071K、およびE1260Dからなる群から選択される、配列番号9または配列番号11に対する1つ以上の突然変異を含むCas9バリエーション。

30

【請求項116】

Cas9バリエーションがR753G突然変異を含む、請求項115に記載のCas9バリエーション。

【請求項117】

Cas9バリエーションが、配列番号9または配列番号11のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群:

H721YおよびR753G;
E102KおよびR753G;および
E102K、H721Y、およびR753G

のいずれか1つを含む、請求項115に記載のCas9バリエーション。

40

【請求項118】

Cas9バリエーションが、配列番号178~180のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項115に記載のCas9バリエーション。

【請求項119】

請求項115~118のいずれか一項に記載のCas9バリエーションおよび逆転写酵素を含むプライムエディター。

【請求項120】

逆転写酵素が、配列番号33~46、48、49、51~53、55~57、59、60、63~78、185、216、222、228、239および241のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号33~46、48、49、51~53、55~57、59、60、63~78、185、216、222

50

、228、239および241のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む、請求項119に記載のプライムエディター。

【請求項121】

逆転写酵素が、請求項62～114のいずれか一項に記載の逆転写酵素である、請求項119に記載のプライムエディター。

【請求項122】

napDNAbpおよび逆転写酵素がトランスで提供されるか、または互いに融合されない、請求項1～61または119～121のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項123】

napDNAbpおよび逆転写酵素が融合タンパク質として提供されるか、または互いに融合される、請求項1～61または119～121のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項124】

napDNAbpおよび逆転写酵素がリンカーを介して融合される、請求項123に記載のプライムエディター。

【請求項125】

リンカーが、配列番号79～93のいずれか一つを含む、請求項124に記載のプライムエディター。

【請求項126】

核局在化配列(NLS)をさらに含む、請求項1～61または119～125のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項127】

融合タンパク質が、配列番号246～250のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項123～126のいずれか一項に記載のプライムエディター。

【請求項128】

請求項1～61または119～127のいずれか一項に記載のプライムエディターおよびPEgRNAを含む複合体。

【請求項129】

PEgRNAが、ガイドRNAおよびガイドRNAの3'末端または5'末端に核酸伸長アームを含む、請求項128に記載の複合体。

【請求項130】

PEgRNAが、napDNAbpに結合し、かつnapDNAbpを標的DNA配列に向けることが可能である、請求項128または129に記載の複合体。

【請求項131】

請求項1～61または119～127のいずれか一項に記載のプライムエディターをコードする1つ以上のポリヌクレオチド。

【請求項132】

請求項131に記載の1つ以上のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項133】

請求項1～61または119～127のいずれか一項に記載のプライムエディター、請求項128～130のいずれか一項に記載の複合体、請求項131に記載の1つ以上のポリヌクレオチド、または請求項132に記載のベクターを含む細胞。

【請求項134】

請求項1～61または119～127のいずれかに記載のプライムエディター、請求項128～130のいずれか一項に記載の複合体、請求項131に記載の1つ以上のポリヌクレオチド、または請求項132に記載のベクターを含む医薬組成物。

【請求項135】

プライム編集によって核酸分子を編集するための方法であって、核酸分子を請求項1～61もしくは119～127のいずれか一項に記載のプライムエディターまたは請求項128～

10

20

30

40

50

130のいずれか一項に記載の複合体と接触させ、それによって標的部位に核酸分子に対する1つ以上の改変をインストールすることを含む方法。

【請求項136】

方法が、核酸分子を第2鎖ニッキングgRNAと接触させることをさらに含む、請求項135に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府支援

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金番号R01EB031172、R01EB022376、U01AI142756、RM1HG009490およびR35GM118062の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0002】

関連出願

本出願は、参照により本明細書に組み込まれる、2022年7月13日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/388,888号、および2021年8月6日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/230,688号の米国特許法第119条(e)に基づく優先権を主張する。

【0003】

参照による組み込み

本出願は、本発明者らのうちの1人以上によって先に出願されたプライム編集を対象とする以下の特許出願の各々の内容全体を参照し、参照により組み込む:2019年3月19日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.62/820,813号;2019年6月7日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.62/858,958号;2019年8月21日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.62/889,996号;2019年8月21日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.62/922,654号;2019年10月10日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.62/913,553号;2019年10月10日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.62/973,558号;2019年11月5日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.62/931,195号;2019年12月5日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.62/944,231号;2019年12月5日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.62/974,537号;2020年3月17日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.62/991,069号;2020年3月17日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/100,548号;2021年9月17日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.17/300,668号;2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023721号;2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023553号;2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023583号;3月31日に出願された米国特許出願第U.S.S.N.17/219,635号;2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023730号;2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023713号;;2021年3月31日に出願された米国特許出願第U.S.S.N.17/219,672号;2022年5月23日に出願された米国特許出願第U.S.S.N.17/751,599号;2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023712号;2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023727号;2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023724号;2021年9月17日に出願された米国特許出願第U.S.S.N.17/440,682号;2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023725号;2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023728号;2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023732号;および2020年3月19日に出願された国際PCT出願第PCT/US2020/023723号。

【0004】

本出願はまた、本発明者らの1人以上によって先に出願されたプライム編集を対象とする以下の特許出願の各々の全内容を参照し、参照により組み込まれる:2022年1月11日に出願された国際PCT出願第PCT/US2022/012054号、2021年10月14日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/255,897号、2021年8月9日に出願された、米国仮出願

10

20

30

40

50

第U.S.S.N.63/231,230号、2021年5月28日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/194,913号、2021年5月28日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/194,865号、2021年4月16日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/176,202号、2021年4月16日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/176,180号、2021年1月11日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/136,194号。

【0005】

本出願は、追加として、本発明者らの1人以上によって先に出願されたプライム編集を対象とする以下の特許出願の各々の全内容を参照し、参照により組み込まれる:2021年9月24日に出願された国際PCT出願第PCT/US2021/052097号、2021年8月9日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/231,231号、2020年10月13日に出願された米国仮出願第U.S.S.N.63/091,272号、2020年9月24日に出願された、米国仮出願第U.S.S.N.63/083,067号、2021年4月30日に出願された、米国仮出願第U.S.S.N.63/182,633号。

10

【0006】

本出願は、追加として、本発明者らの1人以上によって先に出願されたプライム編集を対象とする以下の特許出願の各々の全内容を参照し、参照により組み込まれる:2021年5月7日に出願された国際PCT出願第PCT/US2021/031439号、2020年5月8日に出願された米国仮出願第63/022,397号、および2020年11月20日に出願された米国仮出願第63/116,785号。

【背景技術】

20

【0007】

発明の背景

プライム編集の最近の発展は、エラーを起こしやすい二本鎖DNA切断を必要とせずに、ゲノムDNA配列の挿入、欠失、または置き換えを可能にする。その内容が参照により本明細書に組み込まれる、Anzalone et al., "Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA," Nature, 2019, Vol.576, pp.149-157を参照されたい。プライム編集は、Cas9を標的ゲノム部位に向けるだけでなく、所望の編集をインストールするための情報をコードする操作されたプライム編集ガイドRNA(pegRNA)と対合した操作されたCas9ニッカーゼ-逆転写酵素融合タンパク質(例として、PE1またはPE2)を使用する場合がある。プライム編集は、多段階の編集プロセスを介して進行する:1)Cas9ドメインは、pegRNAのスペーサー配列によって特定される標的ゲノムDNA部位に結合し、標的ゲノムDNA部位にニックを入れる;2)逆転写酵素ドメインは、逆転写のための鋳型としてpegRNA上の操作された伸長を使用して編集されたDNA鎖の合成を開始するためのプライマーとしてニックの入ったゲノムDNAを使用する-これは編集されたDNA配列を含有する一本鎖3'フラップを生成する;3)細胞DNA修復は、編集された3'フラップによる侵入を介して生じる5'フラップ種の転移、元のDNA配列を含有する5'フラップの切除、および編集されたDNA鎖を組み込むための新しい3'フラップのライゲーションによって3'フラップ中間体を分解し、1つの編集された鎖と1つの編集されていない鎖のヘテロ二重鎖を形成する;ならびに4)細胞DNA修復は、編集された鎖を修復のための鋳型として使用してヘテロ二重鎖内の未編集の鎖を置き換え、編集プロセスを完了する。

30

40

【0008】

プライム編集は、ゲノム編集のための強力なツールを表すが、プライム編集プロセスの特異性および効率を高める改変は、当技術を進歩させるのに役立つであろう。特に、プライムエディターによって合成された編集されたDNA鎖の標的ゲノム部位へのより効率的な組み込みを容易にする改変が望ましい。プライム編集の結果として形成され得るインデル副産物の頻度を低下させることも望ましい。プライム編集に対するこのようなさらなる改変は、当技術を進歩させるであろう。

【発明の概要】

【0009】

50

発明の概要

本開示は、操作されたCas9ドメイン、操作された逆転写酵素ドメイン、または操作されたCas9ドメインと操作された逆転写酵素ドメインとの組合せを含む、プライムエディター融合タンパク質を包含する改善されたプライムエディターシステムについて記載する。プライムエディターシステムの場合には、プライムエディターの構成成分(すなわち、Cas9ドメインおよびRTドメイン)は、個々のエレメント(すなわち、カップリングされていないか、または融合されていない)として提供することができる。プライムエディター融合タンパク質の場合には、プライムエディター構成成分(すなわち、Cas9ドメインおよびRTドメイン)は融合タンパク質として提供される。

【0010】

様々な態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたCas9ドメインは、配列番号178、配列番号179、もしくは配列番号180のバリエーションCas9配列、または配列番号178、配列番号179、もしくは配列番号180のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0011】

様々な態様において、本明細書において提供されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質は、核酸-プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)およびマウス乳癌ウイルス(MMTV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、トリ肉腫白血病ウイルス(ASLV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、ブタ内在性レトロウイルス(PERV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、HIV-MMLV逆転写酵素もしくはそのバリエーション、AVIRE逆転写酵素もしくはそのバリエーション、ヒビ内在性ウイルス(BAENV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、テナガザル白血病ウイルス(GALV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、コアラレトロウイルス(KORV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、マソンファイザー(Mason-Pfizer)サルウイルス(MPMV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、POK11ERV逆転写酵素もしくはそのバリエーション、サルレトロウイルス2型(SRV2)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、ウーリーサル肉腫ウイルス(WMSV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Vp96逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Vc95逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Ec48逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Gs逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Er逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Ne144逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Tf1逆転写酵素もしくはそのバリエーション、またはRs09415逆転写酵素(「CRISPR-RT」)もしくはそのバリエーションを含んでもよい。

【0012】

様々な他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、配列番号33のMMLV RT野生型に基づくバリエーションRT配列を含み得、配列番号172~177もしくは183~184のバリエーション、または配列番号172~177もしくは183~184のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含し得る。

【0013】

さらに様々な他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Ec48 RTに基づくバリエーションRT配列を含み得、配列番号188~195、256、および257のバリエーション、または配列番号188~195、256、および257のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含し得る。

【0014】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Tf1 RTに基づくバリエーションRT配列を含み得、配列番号196～213のバリエーション、または配列番号196～213のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含し得る。

【0015】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、PERV RTに基づくバリエーションRT配列を含み得、配列番号214～215もしくは234～238のバリエーション、または配列番号214～215もしくは234～238のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含し得る。

【0016】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、AVIRE RT野生型(配列番号216)に基づくバリエーションRT配列を含み得、配列番号217～221のバリエーション、または配列番号217～221のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含し得る。

【0017】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、KORV RT野生型(配列番号222)に基づくバリエーションRT配列を含み得、配列番号223～227のバリエーション、または配列番号223～227のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含し得る。

【0018】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、WMSV RT野生型(配列番号228)に基づくバリエーションRT配列を含み得、配列番号229～233のバリエーション、または配列番号229～233のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含し得る。

【0019】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Ne144 RT野生型(配列番号239)に基づくバリエーションRT配列を含み得、配列番号240のバリエーション、または配列番号240のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含し得る。

【0020】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまた

10

20

30

40

50

は融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Vc95 RT野生型(配列番号241)に基づくバリエーションRT配列を含み得、配列番号242のバリエーション、または配列番号242のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含し得る。

【0021】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Gs RT野生型(配列番号60)に基づくバリエーションRT配列、または配列番号159~171のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

10

【0022】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、AVIRE RT、KORV RT、およびWMSV RTに基づく五変異体バリエーションRT配列を含み得、配列番号243~245のバリエーション、または配列番号243~245のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含し得る。

20

【0023】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Tfl-rat4(配列番号251)、Tflevo3.1(配列番号252)、Tflevo+rat-1(配列番号254)、Tflevo+rat2(配列番号255)、Ec48-v2(配列番号256)、Ec48-evo3(配列番号257)のバリエーションRT配列、または配列番号251~257のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

30

【0024】

他の態様において、本開示は、配列番号1の核酸配列によってコードされてもよく、本明細書において開示されるバリエーションCas9ドメインまたはバリエーションRTドメインのいずれか1つで改変され得る、配列番号2のPEmaxを包含するプライムエディター融合タンパク質を包含する、改善されたプライムエディターおよびプライムエディターシステムについて記載する。本開示はまた、配列番号2~8の融合タンパク質、ならびに配列番号9~32の進化した核酸プログラム型DNA結合タンパク質および配列番号33~46、48、49、51~53、55~57、59、60、63~78、185、216、222、228、239および241の逆転写酵素を含む融合タンパク質を包含する、他の改善されたプライムエディターバリエーションを提供する。本開示はまた、配列番号2および配列番号3~8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%、または少なくとも最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する融合タンパク質を企図する。本開示はまた、配列番号9~32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%、または少なくとも最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する進化した核酸プログラム型DNA結合タンパク質を企図する。さらに、本開示は、配列番号33~46、48、49、51~53、55~57、59、60、63~78、185、216、222、228、239、および241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%、または少なくとも最

40

50

大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する逆転写酵素を企図する。

【0025】

加えて、本明細書は、本明細書に記載されている進化したおよび/または改変されたプライムエディターをコードおよび/または発現する核酸分子、ならびに本明細書に記載の進化したおよび/または改変されたプライムエディターを発現するための発現ベクターまたは構築物、該核酸分子および発現ベクターを含む宿主細胞、ならびに本明細書に記載の核酸に基づく態様を送達および/または投与するための組成物を提供する。加えて、本開示は、本明細書に記載されている、単離された進化したおよび/または改変されたプライムエディター、ならびに該単離された進化したおよび/または改変されたプライムエディターを含む組成物を提供する。よりさらに、本開示は、進化したおよび/または改変されたプライムエディターを作製する方法、ならびに核酸分子、例としてゲノムを編集することを包含する用途において、進化したおよび/または改変されたプライムエディターまたは進化したおよび/または改変されたプライムエディターをコードする核酸分子を、最新技術を形成するプライムエディターと比較して、好ましくは配列文脈に依存しない様式で(すなわち、所望の編集部位は特定の配列コンテキストを必要としない)改善された効率で使用方法を提供する。態様において、本明細書において提供する作製する方法は、プライムエディター(例として、Cas9ドメインまたは逆転写酵素ドメイン)の1つ以上の構成成分を進化させるために利用されてもよい改善されたファージ支援連続進化(PACE)システムである。本明細書はまた、好ましくは配列文脈に依存しない様式で、本明細書に記載のプライム編集システム(例として、本明細書に記載されている単離された進化したおよび/または改変されたプライムエディターまたはそれをコードするベクターもしくは構築物の形態で)を用いて、標的核酸分子、例として、ゲノムの単一核酸塩基を効率的に編集し、プライム編集を行うための方法を提供する。よりさらに、本明細書は、標的核酸分子、例としてゲノムを、プライム編集システム(例として、単離された進化したおよび/または改変されたプライムエディタータンパク質またはそれをコードするベクターの形態で)と接触させ、プライム編集を行って、遺伝的疾患を処置するおよび/または遺伝的形質(例として、目の色)を変化させることによって、遺伝的疾患を処置する、および/またはは遺伝的形質もしくは状態を変更するかもしくは変化させるための治療方法を提供する。

【0026】

本発明者らは、驚くべきことに、プライム編集の編集効率が、カノニカルなプライムエディター(すなわち、PE2)の1つ以上の構成成分が改変された場合に、有意に増加される場合がある(例として、2倍増加、3倍増加、4倍増加、5倍増加、6倍増加、7倍増加、8倍増加、9倍増加、または10倍以上増加)ことを見出した。改変は、1つ以上の構成成分(例として、Cas9構成成分、逆転写酵素構成成分、またはリンカー)の改変アミノ酸配列を包含してもよい。

【0027】

本発明者らは、エラーを起こしやすい二本鎖DNA切断を必要とせずにゲノムDNA配列の挿入、欠失または置き換えを可能にするプライム編集を開発した。プライム編集は、Cas9を標的ゲノム部位に向かわせ、所望の編集をインストールするための情報をコードする操作されたプライム編集ガイドRNA(pegRNA)と対合した操作されたCas9ニッカーゼ-逆転写酵素融合タンパク質(例として、PE1またはPE2)を使用してもよい。プライム編集は、多段階の編集プロセスを介して進行する:1)Cas9ドメインは、pegRNAのスペーサー配列によって特定される標的ゲノムDNA部位に結合し、標的ゲノムDNA部位にニックを入れる;2)逆転写酵素ドメインは、逆転写のための鋳型としてpegRNA上の操作された伸長を使用して編集されたDNA鎖の合成を開始するためのプライマーとしてニックの入ったゲノムDNAを使用する-これは編集されたDNA配列を含有する一本鎖3'フラップを生成する;3)細胞DNA修復は、編集された3'フラップによる侵入を介して生じる5'フラップ種の転移、元のDNA配列を含有する5'フラップの切除、および編集されたDNA鎖を組み込むための新しい3'フラップのライゲーシオンによって3'フラップ中間体を分解し、1つの編集された鎖と1つの編集されていない鎖のヘテロ二重鎖を形成する;ならびに4)細

胞DNA修復は、編集された鎖を修復のための鋳型として使用してヘテロ二重鎖内の未編集の鎖を置き換え、編集プロセスを完了する。

【0028】

所望の編集の効率的な組み込みは、新たに合成された3'フラップがゲノムDNA部位に相同な配列の一部を含有することを必要とする。この相同性により、編集された3'フラップは、DNA二重鎖への組み込みに関して内在性DNA鎖(対応する5'フラップ)と競合することが可能になる。編集された3'フラップは内在性5'フラップよりも少ない配列相同性を含有するので、競合は5'フラップ鎖を優先すると予想される。よって、プライム編集の効率における潜在的な制限要因は、編集を含有する3'フラップが5'フラップ鎖に効果的に侵入および転移できないことである場合がある。その上、成功した3'フラップの侵入および5'フラップの除去は、二本鎖DNAゲノムの一方の鎖に編集を組み込むだけである。編集の永続的なインストールは、編集された鎖を鋳型として使用して未編集の相補的DNA鎖を置き換えるための細胞DNA修復を必要とする。二次sgRNA(すなわち、PE3システム)を使用して編集に隣接する未編集の鎖にニックを導入することによって、編集された鎖よりも未編集の鎖の置き換えを促進するように細胞が作製され得るが(上の工程4)、このプロセスは依然としてDNA修復の第2段階に依存する。

10

【0029】

napDNAbpおよびプライムエディターのポリメラーゼは、一緒に接合されて、融合タンパク質を形成してもよい。一部の態様において、napDNAbpおよびプライムエディターのポリメラーゼは、リンカーによって接合されて融合タンパク質を形成する。ある特定の態様において、リンカーは、配列番号79~93のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号79~93のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様において、リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、38、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸長である。

20

【0030】

他の態様において、リンカーは、ある特定の態様において、アミノ酸配列SGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVS GGGSSGGGS(配列番号79)に対応するSGGSx2-NLS^{SV40}-SGGSx2を包含してもよい。

30

【0031】

方法(例として、プライムエディター、pegRNA)で使用される構成成分は、DNAベクター上にコードされてもよい。一部の態様において、プライムエディター、pegRNAは、1つ以上のDNAベクター上にコードされる。ある特定の態様において、1つ以上のDNAベクターは、AAVまたはレンチウイルスDNAベクターを含む。一部の態様において、AAVベクターは、血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。

【0032】

本開示の方法において利用されるプライムエディターは、追加の構成成分にさらに接合されてもよい。ある特定の態様において、第2のリンカーは、自己加水分解性リンカーである。ある特定の態様において、第2のリンカーは、配列番号79~93のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号79~93のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様において、第2のリンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50アミノ酸長である。

40

【0033】

一部の態様において、標的部位にインストールされた核酸分子に対する1つ以上の改変は、1つ以上のトランジション、1つ以上のトランスバージョン、1つ以上の挿入、1つ以

50

上の欠失、または1つ以上の逆位を含む。ある特定の態様において、1つ以上のトランジションは、(a)TからC;(b)AからG;(c)CからT;および(d)GからAからなる群から選択される。ある特定の態様において、1つ以上のトランスバージョンは、(a)TからA;(b)TからG;(c)CからG;(d)CからA;(e)AからT;(f)AからC;(g)GからC;および(h)GからTからなる群から選択される。ある特定の態様において、1つ以上の改変は、(1)G:C塩基対からT:A塩基対に、(2)G:C塩基対からA:T塩基対に、(3)G:C塩基対からC:G塩基対に、(4)T:A塩基対からG:C塩基対に、(5)T:A塩基対からA:T塩基対に、(6)T:A塩基対からC:G塩基対に、(7)C:G塩基対からG:C塩基対に、(8)C:G塩基対からT:A塩基対に、(9)C:G塩基対からA:T塩基対に、(10)A:T塩基対からT:A塩基対に、(11)A:T塩基対からG:C塩基対に、または(12)A:T塩基対からC:G塩基対に変化させることを含む。一部の態様において、1つ以上の改変は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチドの挿入または欠失を含む。

10

【0034】

本開示の方法は、1つ以上の疾患関連遺伝子に対する補正を行うために使用されてもよい。一部の態様において、1つ以上の改変は、疾患関連遺伝子に対する補正を含む。ある特定の態様において、疾患関連遺伝子は、心疾患;高血圧;アルツハイマー病;関節炎;糖尿病;がん;および肥満からなる群から選択される多遺伝子性障害に関連する。ある特定の態様において、疾患関連遺伝子は、アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症;アルファ-1アンチトリプシン欠損症;嚢胞性線維症;デュシェンヌ型筋ジストロフィー;ガラクトース血症;ヘモクロマトーシス;ハンチントン病;メープルシロップ尿症;マルファン症候群;神経線維腫症1型;先天性爪甲厚膜;フェニルケトン尿症;重度の複合免疫不全;鎌状赤血球症;スミス・レムリ・オピッツ症候群;トリヌクレオチド反復障害;プリオン病;およびテイ・サックス病からなる群から選択される一遺伝子性障害に関連する。

20

【0035】

別の側面では、本開示は、プライム編集によって核酸分子を編集するための組成物を提供する。一部の態様において、組成物は、プライムエディター、pegRNAを含み、組成物は、標的部位で核酸分子に1つ以上の改変をインストールすることが可能である。

【0036】

組成物は、プライム編集の効率を高め、および/またはインデル形成の頻度を低下させる場合がある。一部の態様において、プライム編集効率は、PE2によるプライム編集と比較して、少なくとも1.5倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3.0倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4.0倍、少なくとも4.5倍、少なくとも5.0倍、少なくとも5.5倍、少なくとも6.0倍、少なくとも6.5倍、少なくとも7.0倍、少なくとも7.5倍、少なくとも8.0倍、少なくとも8.5倍、少なくとも9.0倍、少なくとも9.5倍、または少なくとも10.0倍増加する。一部の態様において、インデル形成の頻度は、PE2による編集と比較して、少なくとも1.5分の1倍、少なくとも2.0分の1倍、少なくとも2.5分の1倍、少なくとも3.0分の1倍、少なくとも3.5分の1倍、少なくとも4.0分の1倍、少なくとも4.5分の1倍、少なくとも5.0分の1倍、少なくとも5.5分の1倍、少なくとも6.0分の1倍、少なくとも6.5分の1倍、少なくとも7.0分の1倍、少なくとも7.5分の1倍、少なくとも8.0分の1倍、少なくとも8.5分の1倍、少なくとも9.0分の1倍、少なくとも9.5分の1倍、または少なくとも10.0分の1倍低下する。

30

40

【0037】

本開示の組成物において利用されるプライムエディターは、複数の構成成分を含む。一部の態様において、プライムエディターは、napDNAbpおよびポリメラーゼを含む。一部の態様において、napDNAbpは、ヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレアーゼ不活性Cas9ドメイン、もしくはCas9ニッカーゼドメインまたはそのバリエーションである。ある特定の態様において、napDNAbpは、Cas9、Cas12e、Cas12d、Cas12a、Cas12b1、Cas13a、Cas12c、およびアルゴノートからなる群から選択され、ニッカーゼ活性を任意に有する。ある特定の態様において、napDNAbpは、配列番号9~32のいず

50

れか1つのアミノ酸配列、または配列番号9～32のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある特定の態様において、napDNAbpは、配列番号10(すなわち、PE1およびPE2のnapDNAbp)のアミノ酸配列、または配列番号10と少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様において、ポリメラーゼは、DNA依存性DNAポリメラーゼまたはRNA依存性DNAポリメラーゼである。一部の態様において、ポリメラーゼは逆転写酵素である。ある特定の態様において、逆転写酵素は、配列番号33～46、48、49、51～53、55～57、59、60、63～78、185、216、222、228、239、および241のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号33～46、48、49、51～53、55～57、59、60、63～78、185、216、222、228、239、および241のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0038】

napDNAbpおよびプライムエディターのポリメラーゼは、一緒に接合されて、融合タンパク質を形成してもよい。一部の態様において、napDNAbpおよびプライムエディターのポリメラーゼは、リンカーによって接合されて融合タンパク質を形成する。ある特定の態様において、リンカーは、配列番号79～93のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号79～93のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様において、リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、38、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸長である。

20

【0039】

本明細書において開示される組成物において使用される構成成分は、DNAベクター上にコードされてもよい一部の態様において、プライムエディター、pegRNAは、1つ以上のDNAベクター上にコードされる。ある特定の態様において、1つ以上のDNAベクターは、AAVまたはレンチウイルスDNAベクターを含む。一部の態様において、AAVベクターは、血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。

【0040】

本開示の組成物において利用されるプライムエディターはまた、追加の構成要素にさらに結合されてもよい一部の態様において、融合タンパク質としてのプライムエディターは、第2のリンカーによってさらに接合される。ある特定の態様において、第2のリンカーは、自己加水分解性リンカーである。ある特定の態様において、第2のリンカーは、配列番号79～93のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号79～93のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様において、第2のリンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50アミノ酸長である。

40

【0041】

一部の態様において、標的部位にインストールされた核酸分子に対する1つ以上の改変は、1つ以上のランジション、1つ以上のランスポージョン、1つ以上の挿入、1つ以上の欠失、または1つ以上の逆位を含む。ある特定の態様において、1つ以上のランジションは、(a)TからC;(b)AからG;(c)CからT;および(d)GからAからなる群から選択される。ある特定の態様において、1つ以上のランスポージョンは、(a)TからA;(b)TからG;(c)CからG;(d)CからA;(e)AからT;(f)AからC;(g)GからC;および(h)GからTからなる群から選択される。ある特定の態様において、1つ以上の改変は、(1)G:C塩基対からT:A塩基対に、(2)G:C塩基対からA:T塩基対に、(3)G:C塩基対からC:G塩基対に、(4)T:A塩基対からG:C塩基対に、(5)T:A塩基対からA:T塩基対に、(6)T:A塩基対からC:G塩基対

50

に、(7)C:G塩基対からG:C塩基対に、(8)C:G塩基対からT:A塩基対に、(9)C:G塩基対からA:T塩基対に、(10)A:T塩基対からT:A塩基対に、(11)A:T塩基対からG:C塩基対に、または(12)A:T塩基対からC:G塩基対に変化させることを含む。一部の態様において、1つ以上の改変は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチドの挿入または欠失を含む。

【0042】

本開示の組成物は、1つ以上の疾患関連遺伝子に対する補正を行うために使用されてもよい。一部の態様において、1つ以上の改変は、疾患関連遺伝子に対する補正を含む。ある特定の態様において、疾患関連遺伝子は、心疾患;高血圧;アルツハイマー病;関節炎;糖尿病;がん;および肥満からなる群から選択される多遺伝子性障害に関連する。ある特定の態様において、疾患関連遺伝子は、アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症;アルファ-1アンチトリプシン欠損症;嚢胞性線維症;デュシェンヌ型筋ジストロフィー;ガラクトース血症;ヘモクロマトーシス;ハンチントン病;メープルシロップ尿症;マルファン症候群;神経線維腫症1型;先天性爪甲厚膜;フェニルケトン尿症;重度の複合免疫不全;鎌状赤血球症;スミス・レムリ・オピッツ症候群;トリヌクレオチド反復障害;プリオン病;およびテイ・サックス病からなる群から選択される一遺伝子性障害に関連する。

【0043】

別の側面では、本開示は、プライム編集によってDNA標的部位を編集するためのポリヌクレオチドを提供する。一部の態様において、ポリヌクレオチドは、napDNABp、ポリメラーゼをコードする核酸配列を含み、napDNABpおよびポリメラーゼは、pegRNAの存在下で、DNA標的部位に1つ以上の改変をインストールすることが可能である。

【0044】

本開示のポリヌクレオチドにおいて利用されるプライムエディターは、複数の構成成分(例として、napDNABpおよびポリメラーゼ)を含む。一部の態様において、napDNABpは、ヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレアーゼ不活性Cas9ドメイン、もしくはCas9ニッカーゼドメインまたはそのバリエーションである。ある特定の態様において、napDNABpは、Cas9、Cas12e、Cas12d、Cas12a、Cas12b1、Cas13a、Cas12c、およびアルゴノートからなる群から選択され、ニッカーゼ活性を任意に有する。ある特定の態様において、napDNABpは、配列番号2~8のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号2~8のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある特定の態様において、napDNABpは、配列番号10(すなわち、PE1およびPE2のnapDNABp)のアミノ酸配列、または配列番号10と少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様において、ポリメラーゼは、DNA依存性DNAポリメラーゼまたはRNA依存性DNAポリメラーゼである。一部の態様において、ポリメラーゼは逆転写酵素である。ある特定の態様において、逆転写酵素は、配列番号33~46、48、49、51~53、55~57、59、60、63~78、185、216、222、228、239、および241のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号33~46、48、49、51~53、55~57、59、60、63~78、185、216、222、228、239、および241のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0045】

napDNABpおよびプライムエディターのポリメラーゼは、一緒に接合されて、融合タンパク質を形成してもよい。一部の態様において、napDNABpおよびプライムエディターのポリメラーゼは、リンカーによって接合されて融合タンパク質を形成する。ある特定の態様において、リンカーは、配列番号9~32のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号9~32のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様において、リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、

22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、38、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸長である。

【0046】

本明細書において開示されるポリヌクレオチドはベクターを含んでもよい。一部の態様において、ポリヌクレオチドはDNAベクターである。ある特定の態様において、DNAベクターは、AAVまたはレンチウイルスDNAベクターである。一部の態様において、AAVベクターは、血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。

【0047】

本開示のポリヌクレオチドによってコードされるプライムエディターはまた、追加の構成成分にさらに接合されてもよい。ある特定の態様において、第2のリンカーは、自己加水分解性リンカーを含む。ある特定の態様において、第2のリンカーは、配列番号79～93のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号79～93のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様において、第2のリンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50アミノ酸長である。

【0048】

一部の態様において、標的部位にインストールされた核酸分子に対する1つ以上の改変は、1つ以上のトランジション、1つ以上のトランスバージョン、1つ以上の挿入、1つ以上の欠失、または1つ以上の逆位を含む。ある特定の態様において、1つ以上のトランジションは、(a)TからC;(b)AからG;(c)CからT;および(d)GからAからなる群から選択される。ある特定の態様において、1つ以上のトランスバージョンは、(a)TからA;(b)TからG;(c)CからG;(d)CからA;(e)AからT;(f)AからC;(g)GからC;および(h)GからTからなる群から選択される。ある特定の態様において、1つ以上の改変は、(1)G:C塩基対からT:A塩基対に、(2)G:C塩基対からA:T塩基対に、(3)G:C塩基対からC:G塩基対に、(4)T:A塩基対からG:C塩基対に、(5)T:A塩基対からA:T塩基対に、(6)T:A塩基対からC:G塩基対に、(7)C:G塩基対からG:C塩基対に、(8)C:G塩基対からT:A塩基対に、(9)C:G塩基対からA:T塩基対に、(10)A:T塩基対からT:A塩基対に、(11)A:T塩基対からG:C塩基対に、または(12)A:T塩基対からC:G塩基対に変化させることを含む。一部の態様において、1つ以上の改変は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチドの挿入または欠失を含む。

【0049】

本開示のポリヌクレオチドは、1つ以上の疾患関連遺伝子に対する補正を行うために使用されてもよい。一部の態様において、1つ以上の改変は、疾患関連遺伝子に対する補正を含む。ある特定の態様において、疾患関連遺伝子は、心疾患;高血圧;アルツハイマー病;関節炎;糖尿病;がん;および肥満からなる群から選択される多遺伝子性障害に関連する。ある特定の態様において、疾患関連遺伝子は、アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症;アルファ-1アンチトリプシン欠損症;嚢胞性線維症;デュシェンヌ型筋ジストロフィー;ガラクトース血症;ヘモクロマトーシス;ハンチントン病;メーブルシロップ尿症;マルファン症候群;神経線維腫症1型;先天性爪甲厚膜;フェニルケトン尿症;重度の複合免疫不全;鎌状赤血球症;スミス・レムリ・オピッツ症候群;トリヌクレオチド反復障害;プリオン病;およびテイ・サックス病からなる群から選択される一遺伝子性障害に関連する。

【0050】

別の側面では、本開示は細胞を提供する。一部の態様において、細胞は、本明細書に記載のポリヌクレオチドのいずれかを含む。

【0051】

別の側面では、本開示は医薬組成物を提供する。一部の態様において、医薬組成物は、

本明細書において開示される組成物のいずれかを含む。一部の態様において、医薬組成物は、本明細書において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賦形剤を含む。一部の態様において、医薬組成物は、本明細書において開示されるポリヌクレオチドのいずれかを含む。一部の態様において、医薬組成物は、本明細書において開示されるポリヌクレオチドのいずれかおよび薬学的に許容される賦形剤を含む。

【0052】

別の側面では、本開示はキットを提供する。一部の態様において、キットは、本明細書において開示される組成物のいずれか、医薬賦形剤、およびプライム編集によってDNA標的部位を編集するための説明書を含む。一部の態様において、キットは、本明細書において開示されるポリヌクレオチドのいずれか、医薬賦形剤、およびプライム編集によってDNA標的部位を編集するための説明書を含む。

10

【0053】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本明細書において提示される特定の態様の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の1つ以上を参照することによってよりよく理解され得る本開示のある特定の側面をさらに実証するために包含される。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】図1は、PE2タンパク質の最適化を示す概略図を提供する。配列番号80が示される。

【0055】

20

【図2】図2は、ある範囲の遺伝子標的(HEK3、EMX1、RNF2、FANCF、FUNX1、DNMT1、VEGFA、HEK4、PRNP、APOE、CXCR4、HEK3)でのHEK293T細胞(低プラスミド用量)におけるPE2および様々な他のPE構築物を使用する意図した編集の頻度の倍率変化を示す。

【0056】

【図3】図3は、ある範囲の遺伝子標的(HEK3、FANCF、RUNX1、VEGFA)でのHeLa細胞におけるPE3および様々なプライムエディター構築物を使用する意図した編集の頻度の倍率変化を示す。

【0057】

【図4】図4は、様々なPE構築物を使用するHEK293T編集対HeLa編集におけるプライム編集の比較を示す。

30

【0058】

【図5】図5は、HeLa細胞におけるPE3のNLSの構成の最適化を示す。

【0059】

【図6】図6は、配列番号2に対応する最終PEmax構築物を示す概略図を提供する。

【0060】

【図7】図7は、PEmaxが意図された編集に加えてインデルを増加させることを示す。

【0061】

【図8A】図8A～8Cは、PEmaxの発現を示す。

40

【図8B】図8A～8Bは、HeLa細胞における編集効率を最大化するためのプライムエディターバリエーションのスクリーニングを示す。すべてのPEの構成は、Cas9 H840A突然変異を有する。NLS^{SV40}は、双節型SV40 NLSを示す。*NLS^{SV40}は、PKKKRKV(配列番号94)NLSSV40コンセンサス配列の外側に1-aaの欠失を含有する。n=3の独立した生物学的反復の個々の値のすべてが示される。

【図8C】図8Cは、HeLa細胞におけるPE3max(PEmaxタンパク質を含むPE3編集システム)およびPE3(PE2タンパク質を含むPE3編集システム)の比較を示す(n=3の独立した生物学的反復の平均)。

【0062】

【図9】図9は、PEmaxの構成が疾患関連遺伝子標的および細胞型における編集を強化することを示す。図9は、PE2およびPEmaxエディター構成の概略図を提供する。bpNL

50

S^{SV40}、双節型SV40 NLS。MMLV RT、モロニー Maus 白血病ウイルス逆転写酵素五変異体。GSコドン、ジェンスクリプトのヒトコドン最適化。

【0063】

【図10】図10は、プライムエディターのファージ支援連続進化(PACE)回路の概略図を提供する。PACE回路は、疾患特異的進化、異なるプライムエディタードメインの進化、および全エディターの進化に有用である。

【0064】

【図11】図11は、HEK293T細胞における進化したGs突然変異体の編集効率を示す。

【0065】

【図12】図12は、低用量(75ngエディター)でのHEK293T細胞における進化したPE2逆転写酵素(RT)突然変異体の編集効率を示す。進化した突然変異体は、低用量で大きな利益をもたらす。

【0066】

【図13】図13は、Cas9および逆転写酵素進化のためのPACE回路の概略図を提供する。

【0067】

【図14】図14は、HEK293T細胞におけるCas9変異プライムエディターの編集効率を示す。

【0068】

【図15】図15は、N2A細胞における進化したプライムエディター突然変異体の編集効率を示す。

【0069】

【図16】図16は、固有の逆転写酵素が、HEK293T細胞のRNF2およびHEK3部位で検出可能なプライム編集活性を示すことを示す。M-MLV*は、M-MLV RTの操作された五変異体バリエーションである。

【0070】

【図17】図17は、レトロウイルス逆転写酵素がプライム編集活性を示すことを示す。固有のレトロウイルス逆転写酵素(RT)酵素は、FANCFおよびHEK3遺伝子座におけるHEK293T細胞においてプライム編集活性を示す。MMTV、PERV、AVIRE、KORVおよびWMSVは、野生型(WT)M-MLV酵素よりも良好な性能を示す。

【0071】

【図18】図18は、PERV五量体とPE2との比較を示す。五変異体、すなわちPERVレトロウイルスRT(21.6)の操作されたバージョンは、WT酵素よりも改善された性能を示す。21.6は、FANCF+5GからT、HEK3+1 His insおよびHEK3+1 FLAG insの編集については、五変異体であるM-MLV RT(PE2)の操作されたバージョンと同等の編集を有するが、VEGFA+2 GからA、RNF2+1 CからA、EMX1+5 GからTおよびDNMT1-15欠失編集については編集が少ない。

【0072】

【図19】図19は、酵母レトロトランスポゾンRT酵素であるTf1 RTがHEK293T細胞においてプライム編集活性を示すことを示す。酵母レトロトランスポゾンRT酵素であるTf1は、HEK293T細胞においてプライム編集活性を示す。Tf1は、WT M-MLV逆転写酵素よりも高い編集を有するが、五変異体操作酵素(PE2)よりも低い活性しか有さない。

【0073】

【図20】図20は、突然変異体S297QおよびK118Rが編集活性を改善することを示す。(S297QおよびK118R突然変異を有する)Tf1の構造的に誘導された合理的に設計されたバリエーションは、WT酵素よりも改善された編集を示す。二重突然変異体は、試験した4つの部位でWT酵素よりも1.3~4.2倍優れている。PE2は、合理的に設計された突然変異体よりも優れた性能を有する。RTとRNA-DNA基質との接触を増加させると、PEの転帰が改善される。

【0074】

10

20

30

40

50

【図 2 1】図 21 は、HEK293T 細胞における Tf1 20bp PANCE 突然変異体の編集効率を示す。Tf1 バリエーション(PANCE を使用して進化)5.27、5.59 および 5.60 は、HEK293T 細胞において WT 酵素 Tf1 バリエーションと比較して改善された編集を示す。バリエーション 5.59 および 5.60 は、試験した部位において PE2 と同等の編集を有する。

【0075】

【図 2 2】図 22 は、N2a 細胞における進化した Tf1 突然変異体の編集効率を示す。マウス Neuro2a 細胞における Tf1 バリエーション(PACE または PANCE を使用して進化)5.27、5.47、5.59 および 5.60 を使用する編集が示される。WT および進化した Tf1 バリエーション(5.47 および 5.60) は、Dnmt1 遺伝子座において PE2 よりも高い編集を示す。

【0076】

【図 2 3】図 23 は、固有の小型細菌逆転写酵素が HEK293T 細胞においてプライム編集活性を示すことを示す。

【0077】

【図 2 4】図 24 は、HEK293T 細胞における Ec48 20bp PANCE 突然変異体の編集効率を示す。Ec48 バリエーション(PANCE を使用して進化)3.8、3.35、3.36 および 3.38 は、HEK293T 細胞において WT Ec48 酵素と比較して改善された編集を示す。

【0078】

【図 2 5】図 25 は、N2a 細胞における進化した Ec48 突然変異体の編集効率を示す。Ec48 バリエーション(PACE または PANCE を使用して進化)3.8、3.23、3.35、3.36、3.37 および 3.38 をマウス Neuro2a 細胞において使用した。進化した Ec48 バリエーションは、Dnmt1 遺伝子座で PE2 と同等の編集を示す。

【0079】

【図 2 6】図 26 は、N 末端から C 末端方向への PEmax の構造的構成成分を提供する。

【0080】

【図 2 7 A】図 27A は、(a) Cas9 ドメインの PACE 進化、(b) RT ドメインの PACE 進化、および (c) RT ドメインを代替 RT ドメインで置き換えることを包含する、プライムエディター、例として PE2 を改善するための戦略を例示する。

【0081】

【図 2 7 B】図 27B は、PACE 進化した Cas9 ドメインおよび MMLV ドメインまたはそのバリエーションを含む、本明細書において開示されるプライムエディターの態様のリストを提供する。アミノ酸置換(例として、「T128N」)は、配列番号 33 の野生型 MMLV タンパク質のアミノ酸位置を指す。

【0082】

【図 2 8】図 28 は、PE2 の MMLV ドメインの代わりに、または別のプライムエディターにおいて使用することができる、本明細書の例 2 に記載の代替逆転写酵素ドメインのリストを提供する。

【0083】

【図 2 9】図 29 は、HEK293T 細胞における 4 つの異なる遺伝子座での WT 酵素と比較して、レトロウイルス RT AVIRE、KORV、WMSV および PERV への PE2 突然変異の組み込みが平均プライム編集活性を改善することを示す。

【0084】

【図 3 0】図 30 は、5 つすべての突然変異の PERV-RT への組み込みが、HEK293T 細胞における 9 つの異なる編集にわたって WT 酵素と比較して活性を 6.6 倍改善することを示す。(21.6 突然変異は D199N、T305K、W312F、E329P、L602W である)。

【0085】

【図 3 1 A】図 3 1 A ~ 3 1 D は、図 10 の PE-PACE 回路の作成および検証を示す。図 3 1 A は、回路内での PE2 RT フェージの最初の一晚の増殖を示す。

【図 3 1 B】図 3 1 B は、pegRNA の一晚の増殖スクリーニングを示す。

【図 3 1 C】図 3 1 C は、最適化された pegRNA を有する回路における PE1 および PE2 の一晚の増殖を示す。

10

20

30

40

50

【図31D】図31Dは、PE1 RTファージのPANCE選択を示す。緑色で陰影を付けた丸はドリフトであり、選択圧は加えられなかった。

【0086】

【図32】図32は、PE1のPANCEによって導入されたM-MLV RTにおける突然変異の概要を提供する。

【0087】

【図33】図33A~33Bは、改変されたPE-PACE回路である。図33Aは、T7 RNAPの発現がRBSまたはプロモーターのいずれかを介して減少するにつれてファージ増殖が減少することを示す。これにより、ストリンジェンシーが向上する。図33Bは、20bp挿入PE-PACE回路のためのpegRNA最適化を示す。x軸上の数字は、異なるpegRNAを示す。

10

【0088】

【図34】図34は、Tf1の進化したバリエーション(PANCEを使用して進化)、5.27、5.59および5.60が、HEK293T細胞においてWT酵素Tf1バリエーションと比較して改善された編集を示すことを示す棒グラフである。バリエーション5.59および5.60は、上記で試験した部位においてPE2と同等な編集を有する。

【0089】

【図35】図35は、HEK293T細胞において活性を示す7つの固有の小型細菌RT酵素の編集活性を示す。

【0090】

【図36】図36は、進化したバリエーション38.14が、HEK293T細胞における4つの遺伝子座にわたってWT酵素より平均で23倍優れていることを示す。

20

【0091】

【図37】図37は、Vc95バリエーション(L11M+S75A+V97M+N146D+N245T)が、4つの遺伝子座にわたってWT酵素より平均7倍優れていることを示す。

【0092】

【図38】図38A~38Bは、Gs RTの進化を示す。(A)PANCEまたは(B)PACEに由来するGs RT突然変異体についてのHEK293T細胞における哺乳動物プライム編集。

【0093】

【図39】図39は、Cas9のPE-PACE進化を示す。棒グラフは、図13のPE-PACEシステムを使用して、HEK293T細胞におけるPE2の編集効率を3つの進化したプライムエディターと比較する。進化したエディターは、PE2のCas9(H840A)構成成分に対する改変を含む。

30

【0094】

【図40】図40は、バリエーションI260L、E274R、R288QおよびQ293Kが、HEK293T細胞においてWTよりも改善された編集を示した、Tf1逆転写酵素の構造誘導操作を示す。

【0095】

【図41】図41は、バリエーションK118R、S188K、I64L、I64W、N316Q、K321R、L133NがHEK293T細胞においてWTよりも改善された編集を示した、28個のTf1逆転写酵素突然変異体の構造誘導操作を示す。

40

【0096】

【図42】図42は、突然変異の組合せ(5.19=野生型Tf1+K118R+S297Q;5.618=K118R+S297Q+S188K+I64L+I260L+R288Q;5.59=E22K+P70T+G72V+M102I+K106R+A139T+L158Q+F269L+A363V+K413E+S492N)を含む合理的に設計されたTf1バリエーションの編集能力を示し、バリエーション5.618は、HEK293T細胞において最良の進化したバリエーション5.59と同等の編集を示した。

【0097】

【図43】図43は、合理的な設計および進化アプローチから誘導された突然変異の組合せ(5.59=E22K+P70T+G72V+M102I+K106R+A139T+L158Q+F269L+A363V+K413E+S492N;5.618=K118R+S297Q+S188K+I64L+I260L+R28

50

8Q;5.612=5.59+K118R+S297Q+S188K+I64L+I260L)を含むTf1バリエーションの編集能力を示し、バリエーション5.59は、HEK293T細胞においてさらに改善された活性を示し、Tf1バリエーション5.612は、PE2よりも改善された活性を示した。

【0098】

【図44A】図44A~44Bは、Ec48逆転写酵素バリエーションを得た例示的な進化アプローチを示す。図44Aは、より高いストリンジェンシー株に対してPANCEを使用する選択後のEc48の遺伝子型を示す。

【図44B】図44Bは、sd8調節配列および20bpの欠失を含むProDの代わりに使用された20bpの欠失と組み合わされたSyn 4.0調節配列を含むProBと呼ばれるよりストリンジェントなプロモーターの使用を示す。

【0099】

【図45】図45は、HEK293T細胞におけるEc48突然変異体の編集能力を示し、バリエーション3.500(E60K+K87E+E165D+D243N+R267I+E279K+K318E+K343N)および3.501(E60K+K87E+S151T+E165D+D243N+R267I+E279K+V303M+K318E+K343N)は、以前に特徴付けられた最良の進化したバリエーション3.35(E54K+K87E+D243N+R267I+E279K+K318E)よりも優れた性能を有した。

【0100】

【図46】図46は、構造誘導操作によって予測された5つの突然変異(K118R、S188K、I260L、S297QおよびR288Q)を使用するTf1ベースのプライムエディターの編集効率の改善を示す。

【0101】

【図47】図47は、rat1(K118R+S188K)、rat2(K118R+S188K+I260L)、rat3(K118R+S188K+I260L+S297Q)およびrat4(K118R+S188K+I260L+S297Q+R288Q)バリエーションを生成するために突然変異を組み合わせる場合のTf1ベースのプライムエディターの改善された編集を示す。

【0102】

【図48】図48は、Tf1evo3.1およびTf1evo3.2バリエーションを使用するTf1ベースのプライムエディターの改善された編集を示す。

【0103】

【図49】図49は、有理突然変異を最良進化バリエーションに組み合わせると、特定の部位で平均して編集がわずかに改善されることを示す。

【0104】

【図50A】図50A~50Bは、構造誘導操作によって予測された5つの突然変異を使用するEc48ベースのプライムエディターの編集効率の改善を示す。図50Aは、T189N Ec48突然変異体の編集効率を示す。

【図50B】図50Bは、R378K、K307R、T385R、L182NおよびR315K突然変異体の編集効率を示す。

【0105】

【図51】図51は、突然変異を組み合わせるEc48-v2(R315K+L182N+T189N)バリエーションを生成する場合のEc48ベースのプライムエディターの編集効率の改善を示す。

【0106】

【図52】図52は、Ec48-evo3バリエーションが編集効率のさらなる改善を示すことを示す。

【0107】

【図53】図53は、PEmax構成におけるTf1およびEc48バリエーションの示された標的遺伝子における編集率として表される編集効率を示す。

【0108】

【図54】図54は、示されたM-MLV突然変異体によってN2A細胞で実施された短いRTT編集の改善の概要を示す。

【0109】

10

20

30

40

50

【図55A】図55A～55Bは、示されているM-MLV突然変異体による長いRTT編集の改善の概要を示す。図55Aは、HEK293T細胞における全長PE2maxに対する改善を示す。

【図55B】図55Bは、HEK293T細胞における切断型PE2maxと比較した改善を示す。
【0110】

【図56】図56は、N2A細胞における哺乳動物プライム編集を改善する追加のPACEおよびPANCE進化したおよび操作されたCas9突然変異体を示す。

【0111】

【図57A】図57A～57Cは、テイ・サックス病回路を示す。図57Aは、T7 RNAPにおいて病原性断片が挿入される場所を実証する回路設定を示す。

【図57B】図57Bは、プライム編集前の突然変異含有T7領域の配列を示す。

【図57C】図57Cは、正しいフレームが復元される、プライム編集後に得られたシーケンシングを示す。

【0112】

【図58A】図58A～58Bは、Ec48およびGsバリエーションの編集パーセントとして表される編集効率を示す。図58Aは、Ec48-3.35、Ec48-3.500およびEc48-TSD1バリエーションの編集効率を示す。

【図58B】図58Bは、Gs811、Gs813、Gs814、Gs815、Gs816、Gs-TSD1、Gs-TSD2およびGs-TSD3バリエーションの編集効率を示す。

【0113】

【図59】図59は、各レトロウイルスRT酵素の五変異体バージョンの個々の突然変異体よりも改善された編集能力を示す。AVIRE RT、KORV RTおよびWMSV RTについて、編集を改善した5つの突然変異を組み合わせ、編集効率に相加効果をもたらした。最終的なバリエーションPERV_penta、AVIRE_penta、KORV_pentaおよびWMSV_pentaは、5回の編集にわたって平均して編集効率のおよそ4倍～7倍の改善を実証した。

【発明を実施するための形態】

【0114】

定義

別段に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術および科学用語は、この発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。以下の参考文献は、当業者に、本発明で使用される多くの用語の一般的な定義を提供する: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed., 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書において使用される場合、以下の用語は、特に指定されない限り、それらに帰する意味を有する。

【0115】

Cas9

「Cas9」または「Cas9ヌクレアーゼ」という用語は、Cas9ドメインまたはその断片を含む、RNAにガイドされるヌクレアーゼ(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)を指す。「Cas9ドメイン」は、本明細書において使用される場合、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断片である。「Cas9タンパク質」は、全長Cas9タンパク質である。Cas9ヌクレアーゼはまた、ときにcasn1ヌクレアーゼまたはCRISPR(クラスター化された規則的な配置の短い回文配列リピート(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat))関連ヌクレアーゼとしても言及される。CRISPRは、可動遺伝因子(ウイルス、転移因子、および接合性プラスミド)に対して保護をもたらす適応免疫システムである。CRISPRクラスターは、スペーサー、先行する可動因子に相補的な配列、および標的化侵入核酸を含有する。CRISPRクラスターは転写され、プロセッシングされてCRISPR RNA(crRNA)になる

。II型CRISPRシステムにおいて、pre-crRNAの補正プロセッシングは、transでコードされた低分子RNA(tracrRNA)、内在性リボヌクレアーゼ3(rnc)、およびCas9ドメインを必要とする。tracrRNAは、pre-crRNAの、リボヌクレアーゼ3に補助されるプロセッシングのためのガイドとして働く。続いて、Cas9/crRNA/tracrRNAは、スパーサーに相補的な直線状または環状のdsDNA標的をエンドヌクレアーゼにより切断する。crRNAに相補的ではない標的鎖は、最初にエンドヌクレアーゼによりカットされ、次いで3'-5'をエキソヌクレアーゼによりトリミングされる。本来、DNAの結合および切断は、典型的には、タンパク質および両RNAを必要とする。しかしながら、crRNAとtracrRNAの両方の側面を単一のRNA種に組み込むように、シングルガイドRNA(「sgRNA」または単純に「gRNA」)が操作され得る。例として、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)を参照されたい。Cas9は、CRISPR反復配列(PAMまたはプロトスパーサー隣接モチーフ)中の短いモチーフを認識することで、自己対非自己を区別するのに役立つ。Cas9ヌクレアーゼ配列および構造は当業者に周知である(例として、それらの各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、“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)を参照されたい)。Cas9オルソログは、以下に限定されないが、S. pyogenes および S. thermophilus を包含する様々な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とって明らかであり、このようなCas9ヌクレアーゼおよび配列は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Chylinski, Rhun, and Charpentier, “The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems” (2013) RNA Biology 10:5, 726-737に開示された生物および遺伝子座からのCas9配列を包含する。一部の態様において、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させる1以上の突然変異を含む。

【0116】

ヌクレアーゼが不活性化されたCas9ドメインは、「dCas9」タンパク質(ヌクレアーゼが「不活性型」のCas9を表す)と互換的に呼ばれてもよい。不活性なDNA切断ドメインを有するCas9ドメイン(またはその断片)を生成するための方法は公知である(例として、それらの各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、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を参照されたい)。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に相補的な鎖を切断するのに対し、RuvC1サブドメインは非相補鎖を切断する。これらのサブドメイン内の突然変異は、Cas9のヌクレアーゼ活性をサイレンシングさせ得る。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))。一部の態様において、Cas9の断片を含むタンパク質が提供される。例えば、一部の態様において、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D

NA切断ドメインのうち一方を含む。一部の態様において、Cas9を含むタンパク質またはその断片は、「Cas9バリエーション」と呼ばれる。Cas9バリエーションは、Cas9またはその断片との相同性を共有する。例えば、Cas9バリエーションは、野生型Cas9(例として、配列番号9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。一部の態様において、Cas9バリエーションは、野生型Cas9(例として、配列番号9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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、またはそれより多くのアミノ酸変化を有していてもよい。一部の態様において、Cas9バリエーションは、その断片が、野生型Cas9(例として、配列番号9のSpCas9)の対応する断片と、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%同一となるように、配列番号9のCas9の断片(例として、gRNA結合ドメインまたはDNA切断ドメイン)を含む。一部の態様において、断片は、対応する野生型Cas9(例として、配列番号9のSpCas9)のアミノ酸の長さの、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%同一の、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

【0117】

本明細書における野生型カノニカルなStreptococcus pyogenes Cas9(SpCas9)配列参照は、以下のアミノ酸配列を有する：

30

40

50

【表 1】

説明	配列	配列番号
SpCas9 <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> M1 SwissProt 受託番号 Q99ZW2 野生型	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGN TDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRR KNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKH ERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTKADL RLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQ TYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQL PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDI LRVNTETKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEK MDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGN SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTN FDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGM RKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKI ECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEE NEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMK QLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDG FANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIA NLAGSPAIIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIE ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPV ENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEV VKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDK LIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHD AYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA KSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLI ETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPT VAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRML ASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPED NEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKV LSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDT TIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD	9

10

20

30

【0118】

CRISPR

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。DNAのスニペットは、類似のウイルスによる続く攻撃からの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、CRISPR関連タンパク質(Cas9およびそのホモログを含む)およびCRISPR関連RNAのアレイと併せて、有効に原核生物免疫防御システムを含む。本来、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。ある種の型のCRISPRシステム(例として、II型CRISPRシステム)では、pre-crRNAの正しいプロセシングは、トランスにコードされる低分子RNA(tracrRNA)、内在性リボヌクレアーゼ3(rnc)およびCas9タンパク質を必要とする。tracrRNAは、pre-crRNAの、リボヌクレアーゼ3に補助されるプロセシングのためのガイドとして働く。続いてCas9/crRNA/tracrRNAはRNAに対して相補的な直線状または環状dsDNA標的を

40

50

エンドヌクレアーゼにより切断する。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によりカットされ、次いで3'-5'エキソヌクレアーゼによりトリミングされる。本来、DNAの結合および切断は、典型的には、タンパク質および両RNAを必要とする。しかしながら、シングलगイドRNA(「sgRNA」または単純に「gRNA」)は、crRNAとtracrRNA両方の側面を単一のRNA種のガイドRNAに組み込むように操作され得る。例として、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)を参照されたい。Cas9は、CRISPR反復配列(PAMまたはプロトスペーサー隣接モチーフ)中の短いモチーフを認識することで、自己対非自己を区別するのに役立つ。Cas9ヌクレアーゼ配列および構造だけでなくCRISPR生物学は当業者に周知である(例として、それら各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、“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)を参照されたい)。Cas9オルソログは、以下に限定されないが、S. pyogenesおよびS. thermophilusを包含する様々な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とって明らかであり、このようなCas9ヌクレアーゼおよび配列は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Chylinski, Rhun, and Charpentier, “The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems”(2013) RNA Biology 10:5, 726-737に開示された生物および遺伝子座からのCas9配列を包含する。

【0119】

ある種の型のCRISPRシステム(例として、II型CRISPRシステム)では、pre-crRNAの正しいプロセッシングは、トランスにコードされる低分子RNA(tracrRNA)、内在性リボヌクレアーゼ3(rnc)、およびCas9タンパク質を必要とする。tracrRNAは、pre-crRNAの、リボヌクレアーゼ3に補助されるプロセッシングのためのガイドとして働く。続いてCas9/crRNA/tracrRNAはRNAに対して相補的な直線状または環状核酸標的をエンドヌクレアーゼにより切断する。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によりカットされ、次いで3'-5'エキソヌクレアーゼによりトリミングされる。本来、DNAの結合および切断は、典型的には、タンパク質および両RNAを必要とする。しかしながら、シングलगイドRNA(「sgRNA」または単純に「gRNA」)が、crRNAとtracrRNA両方の態様を単一のRNA種のガイドRNAに組み込むように操作され得る。

【0120】

一般的に、「CRISPRシステム」は、集合的に、CRISPR関連(「Cas」)遺伝子の発現を伴うか、またはその活性を導く転写物および他のエレメントを指し、Cas遺伝子、tracr(トランス活性化CRISPR)配列(例として、tracrRNAまたは活性な部分的tracrRNA)、tracr mate配列(内在性CRISPRシステムの文脈において、「ダイレクト反復」およびtracrRNAによってプロセッシングされる部分的なダイレクト反復を包摂する)、ガイド配列(内在性CRISPRシステムの文脈において「スペーサー」とも呼ばれる)、またはCRISPR遺伝子座からの他の配列および転写物をコードする配列を包含する。システムのtracrRNAはガイドRNA上に存在するtracr mate配列に対して(完全にまたは部分的に)相

補的である。

【0121】

DNA合成鑄型

本明細書において使用される場合、「DNA合成鑄型」という用語は、プライムエディターのポリメラーゼによって鑄型鎖(所望の編集を含有しており、次いでプライム編集の機序によって、対応する内在性DNA鎖を標的部位にて置き換える、3'一本鎖DNAフラップをコードする)として利用される、PEgRNAの伸長アームの領域または部分を指す。伸長アームは、DNA合成鑄型を包含しており、DNAまたはRNAから構成されてもよい。RNAの場合には、プライムエディターのポリメラーゼは、RNA依存性DNAポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)であり得る。DNAの場合には、プライムエディターのポリメラーゼは、DNA依存性DNAポリメラーゼであり得る。様々な態様において、DNA合成鑄型は、「編集鑄型」および「相同アーム」、ならびに任意の5'末端改変領域e2の全部または一部を含んでもよい。すなわち、e2領域の性質に応じて(例として、これが、ヘアピン、トゥーループ、またはステム/ループの2次構造を包含するかどうかにかかわらず)、ポリメラーゼは、e2領域を何もコードしていなくても、またはその一部もしくは全部をコードしていてもよい。別の言い方をすれば、3'伸長アームの場合には、DNA合成鑄型は、ポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)によるDNAの一本鎖の合成のための鑄型として動作してもよい、プライマー結合部位(PBS)の5'末端からgRNAコアの3'末端までに及ぶ伸長アームの部分を包含し得る。5'伸長アームの場合には、DNA合成鑄型は、PEgRNA分子の5'末端から編集鑄型の3'末端に及ぶ伸長アームの部分を包含し得る。好ましくは、DNA合成鑄型は、3'伸長アームまたは5'伸長アームのいずれかを有するPEgRNAのプライマー結合部位(PBS)を除外する。本明細書に記載のある特定の態様は、編集鑄型および相同アーム、すなわち、DNA合成の間に鑄型として実際に使用されるPEgRNA伸長アームの配列を包含する「RT鑄型」を指す。「RT鑄型」という用語は、「DNA合成鑄型」という用語と同等である。

10

20

【0122】

編集鑄型

「編集鑄型」という用語は、ポリメラーゼ、例として、DNA依存性DNAポリメラーゼ、RNA依存性DNAポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)によって合成される一本鎖3'DNAフラップに所望の編集をコードする伸長アームの部分を指す。本明細書に記載のある特定の態様は、編集鑄型と相同アームとの両方を一緒に指す「RT鑄型」、すなわち、DNA合成中に鑄型として実際に使用されるPEgRNA伸長アームの配列を指す。「RT編集鑄型」という用語はまた、「DNA合成鑄型」という用語とも等価であるが、ここでRT編集鑄型は、逆転写酵素であるポリメラーゼを有するプライムエディターの使用を反映し、DNA合成鑄型は、いずれのかのポリメラーゼ有するプライムエディターの使用をより広く反映する。

30

【0123】

伸長アーム

「伸長アーム」という用語は、プライマー結合部位および逆転写酵素の編集鑄型を包含するいくつかの機能を提供するPEgRNAのヌクレオチド配列構成成分を指す。一部の態様において、伸長アームは、ガイドRNAの3'末端に位置付けされる。他の態様において、伸長アームは、ガイドRNAの5'末端に位置付けされる。一部の態様において、伸長アームはまた、相同アームも包含する。様々な態様において、伸長アームは、5'から3'方向に以下の構成成分:相同アーム、編集鑄型、およびプライマー結合部位を含む。逆転写酵素の重合活性は5'から3'方向であるため、相同アーム、編集鑄型、およびプライマー結合部位の好ましい配置は、逆転写酵素が、アニールされたプライマー配列によって一旦プライミングされると、編集鑄型を相補的な鑄型鎖として使用してDNAの一本鎖を重合するように、5'から3'方向にある。伸長アームの長さなどのさらなる詳細は、本明細書に他の箇所に記載されている。

40

【0124】

50

伸長アームはまた、一般に2つの領域:例えば、プライマー結合部位(PBS)およびDNA合成鑄型を含むものとして記載されていてもよい。プライマー結合部位は、プライムエディター複合体によってニックを有するようになり、これによってニックを有する内在性鎖上に3'末端が晒された場合に、標的部位の内在性DNA鎖から形成されるプライマー配列に結合する。本明細書において説明される通り、プライマー配列の、PEgRNAの伸長アーム上のプライマー結合部位への結合は、晒された3'末端(すなわち、プライマー配列の3')を有する二重鎖領域を作出し、これは次いで、晒された3'末端からDNA合成鑄型の長さに沿ってDNAの一般的の重合を開始するポリメラーゼのための基質を提供する。一本鎖DNA産物の配列は、DNA合成鑄型の相補体である。重合は、重合が終結するまでDNA合成鑄型(または伸長アーム)の5'へと続く。よって、DNA合成鑄型は、プライムエディター複合体のポリメラーゼによって一本鎖DNA産物(すなわち、所望の遺伝子編集情報を含む3'一本鎖DNAフラップ)中にコードされ、PEに誘導されたニック部位のすぐ下流にある標的部位の対応する内在性DNA鎖に最終的に置き換わる伸長アームの部分を表す。理論に拘束されるものではないが、DNA合成鑄型の重合は、終結という事象まで、伸長アームの5'末端へと続く。重合は、以下に限定されないが、(a)PEgRNAの5'末端に到達すること(例として、5'伸長アームの場合には、DNAポリメラーゼが単に鑄型を使い果たす)、(b)通り抜けられないRNA2次構造(例として、ヘアピンまたはステム/ループ)に到達すること、あるいは(c)複製終結シグナル、例として、ポリメラーゼを遮断もしくは阻害する特定のヌクレオチド配列、またはスーパーコイル状のDNAもしくはRNAなどの核酸トポロジシグナルに到達すること、を包含する様々な形で終結してもよい。

10

20

【0125】

融合タンパク質

「融合タンパク質」という用語は、本明細書において使用される場合、少なくとも2つの異なるタンパク質に由来する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指す。あるタンパク質は、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、よってそれぞれ、「アミノ末端の融合タンパク質」または「カルボキシ末端の融合タンパク質」を形成してもよい。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、タンパク質を標的部位への結合へと導く、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んでもよい。別の例は、逆転写酵素に対するCas9またはその等価物を包含する。本明細書において提供されるタンパク質のいずれも、当技術分野で公知のいずれかの方法によって産生されてもよい。例えば、本明細書において提供されるタンパク質は、ペプチドリンカーを含む融合タンパク質に特に適した、組換えタンパク質の発現および精製を介して産生されてもよい。組換えタンパク質の発現および精製のための方法は周知であり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、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。

30

【0126】

ガイドRNA(「gRNA」)

本明細書において使用される場合、「ガイドRNA」という用語は、大部分が一般的にCRISPR-Cas9のCasタンパク質に関連し、Cas9と会合して、Cas9タンパク質をDNA分子中の特定の配列(ガイドRNAのプロトスペース配列との相補性を包含する)に向かわせる、特定のタイプのガイド核酸である。しかしながら、この用語はまた、天然に存在するかもしれない天然には存在しない(例として、操作または組換え)かにかかわらず、Cas9等価物、ホモログ、オルソログ、またはパラログと会合し、Cas9等価物を特定の標的ヌクレオチド配列に局在化するように別にプログラムする、等価なガイド核酸分子も包含する。Cas9等価物は、Cpf1(V型CRISPR-Casシステム)、C2c1(V型CRISPR-Casシステム)、C2c2(VI型CRISPR-Casシステム)およびC2c3(V型CRISPR-Casシステム)を包含する、いずれかの型のCRISPRシステム(例として、II型、V型、VI型)からの他のnapDNA

40

50

bpも包含してもよい。さらなるCas等価物は、その内容が参照により本明細書に組み込まれる、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。ガイドRNAの例示的配列および構造は本明細書に提供されている。加えて、適切なガイドRNA配列を設計するための方法も、本明細書において提供されている。本明細書において使用される場合、「ガイドRNA」は、「プライム編集ガイドRNA」(または「PEgRNA」)と称されるガイドRNAの改変形態と対照的に、「従来のガイドRNA」とも呼ばれる場合がある。

【0127】

ガイドRNAまたはPEgRNAは、以下に限定されないが、以下を包含する様々な構造エレメントを含んでもよい:

【0128】

スパーサー配列-標的DNA中のプロトスパーサーと同じ配列を有するガイドRNAまたはPEgRNA(約20ntsの長さを有する)中の配列。

【0129】

gRNAコア(またはgRNA足場または骨格配列)-は、Cas9結合を担うgRNA内の配列を指し、これは、Cas9を標的DNAへガイドするのに使用される20bpのスパーサー/標的化配列を包含しない。

【0130】

伸長アーム-プライマー結合部位およびポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)によって目的の遺伝子変化を含有する一本鎖DNAフラップをコードするDNA合成鑄型配列を含み、次いで、対応する内在性鎖を置き換えることによって内在性DNA中に組み込まれ、それによって所望の遺伝子変化をインストールする、PEgRNAの3'末端または5'末端の一本鎖伸長。

【0131】

転写ターミネーター-ガイドRNAまたはPEgRNAは分子の3'に転写終結配列を含んでもよい。

【0132】

宿主細胞

「宿主細胞」という用語は、本明細書において使用される場合、本明細書に記載のベクター、例としてMLH1バリエーションをコードする核酸分子ならびにCas9またはCas9等価物および逆転写酵素を含む融合タンパク質を含むベクターを宿主とし、複製し、および発現し得る細胞を指す。

【0133】

リンカー

「リンカー」という用語は、本明細書において使用される場合、2つの他の分子または部分を連結する分子を指す。リンカーは、2つの融合タンパク質を接合するリンカーの場合には、アミノ酸配列であり得る。例えば、Cas9は、アミノ酸リンカー配列によって逆転写酵素に融合され得る。リンカーは、2つのヌクレオチド配列を一緒に接合する場合には、ヌクレオチド配列でもあり得る。例えば、本発明の場合には、従来のガイドRNAは、スパーサーまたはリンカーヌクレオチド配列を介して、RT鑄型配列およびRTプライマー結合部位を含んでもよいプライム編集ガイドRNAのRNA伸長に連結される。他の態様において、リンカーは有機分子、基、ポリマー、または化学的部分である。一部の態様において、リンカーは、5~100アミノ酸長、例えば5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、30~35、35~40、40~45、45~50、50~60、60~70、70~80、80~90、90~100、100~150、または150~200アミノ酸長である。より長いまたはより短いリンカーも企図される。ある特定の態様において、リンカーは自己加水分解性リンカー(例として、本明細書においてさらに記載されている2A自己切断性ペプチド)である。2A自己切断性ペプチドなどの自己加水分解性リンカーは、タンパク質翻訳中にリボソームス

10

20

30

40

50

キッピングを誘導することが可能であり、その結果、リボソームは2つの遺伝子または遺伝子断片間でペプチド結合を作製することができない。

【0134】

napDNABp

本明細書において使用される場合、「核酸プログラム型DNA結合タンパク質」または「napDNABp」(そのCas9が一例である)という用語は、DNA分子中の特定の配列を標的とし、結合するためにRNA:DNAハイブリダイゼーションを使用するタンパク質を指す。各napDNABpは、ガイド核酸またはその一部(例として、ガイドRNAのプロトスペーサー)に相補的なDNA鎖(すなわち、標的鎖)を含むDNA配列にnapDNABpを局在化する、少なくとも1つのガイド核酸(例として、ガイドRNA)に関連する。換言すれば、ガイド核酸は、相補的な配列に局在化し、結合するnapDNABp(例として、Cas9または等価物)を「プログラム」する。

10

【0135】

理論に拘束されるものではないが、napDNABp-ガイドRNA複合体の結合機序は、一般に、napDNABpが二本鎖DNA標的の巻き戻しを誘導するRループを形成し、それによってnapDNABpによって結合した領域中の鎖を分離する工程を包含する。ガイドRNAプロトスペーサーは次いで「標的鎖」とハイブリダイズする。これは、標的鎖に相補的な「非標的鎖」に取って代わり、Rループの一本鎖領域を形成する。一部の態様において、napDNABpは1つ以上のヌクレアーゼ活性を包含し、次いでDNAをカットすることで、様々な種類の病変がなくなる。例えば、napDNABpは、非標的鎖を第1の位置でカットする、および/または標的鎖を第2の位置でカットする、ヌクレアーゼ活性を含んでいてもよい。ヌクレアーゼ活性に応じて標的DNAがカットされることで、両鎖ともカットされた「二本鎖切断」を形成し得る。他の態様において、標的DNAは単一の部位のみでカットされ得る、すなわち、DNAは一方の鎖上に「ニックを有する」。異なるヌクレアーゼ活性を有する例示的napDNABpは、「Cas9ニッカーゼ」(「nCas9」)、およびヌクレアーゼ活性を有さない非活性化Cas9(「不活性型Cas9」または「dCas9」)を包含する。これらのおよび他のnapDNABpに関する例示的配列が本明細書において提供されている。

20

【0136】

ニッカーゼ

「ニッカーゼ」という用語は、2つのヌクレアーゼドメインのうちの1つが不活性化されたCas9を指す。この酵素は、標的DNAの一方の鎖のみを切断することが可能である。

30

【0137】

核酸分子

「核酸」という用語は、本明細書において使用される場合、ヌクレオチドのポリマーを指す。ポリマーは、天然のヌクレオシド(すなわち、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)、ヌクレオシド類似体(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、C5プロモウリジン、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、7デアザアデノシン、7デアザグアノシン、8オキソアデノシン、8オキソグアノシン、O(6)メチルグアニン、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、ジヒドロウリジン、メチルシュードウリジン、1-メチルアデノシン、1-メチルグアノシン、N6-メチルアデノシン、および2-チオシチジン)、化学改変された塩基、生物学的に改変された塩基(例として、メチル化された塩基)、インターカレートされた(intercalated)塩基、改変された糖(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、2'-O-メチルシチジン、アラビノース、およびヘキソース)、または改変されたホスファート基(例として、ホスホロチオアートおよび5'-Nホスホラミダイト連結)を包含していてもよい。

40

【0138】

50

PACE

「ファージ支援連続進化(PACE)」という用語は、本明細書において使用される場合、ファージをウイルスベクターとして採用する連続的進化を指す。PACE技術の一般概念は、例えば、2010年3月11日に国際公開第2010/028347号として公開された、2009年9月8日に出願された国際PCT出願PCT/US2009/056194号;2012年6月28日に国際公開第2012/088381号として公開された、2011年12月22日に出願された国際出願PCT/US2011/066747号;2015年5月5日に発行された米国特許出願第9,023,594号、2015年9月11日に国際公開第2015/134121号として公開された2015年1月20日に出願された国際PCT出願、PCT/US2015/012022号、および2016年10月20日に国際公開第2016/168631号として公開された2016年4月15日に出願された国際PCT出願、PCT/US2016/027795号に記載されており、それらの各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0139】

PEgRNA

本明細書において使用される場合、「プライム編集ガイドRNA」または「PEgRNA」または「伸長されたガイドRNA」という用語は、本明細書に記載のプライム編集方法および組成物を実践するための1つ以上の追加の配列を包含するよう改変されたガイドRNAの特殊な形態を指す。本明細書に記載されているように、プライム編集ガイドRNAは、核酸配列の1以上の「伸長された領域」を含む。伸長された領域は、以下に限定されないが、一本鎖のRNAまたはDNAを含んでもよい。さらに、伸長された領域は、従来のガイドRNAの3'末端で生じてよい。他の配置において、伸長された領域は、従来のガイドRNAの5'末端で生じてよい。また他の配置において、伸長された領域は、従来のガイドRNAの末端領域に、例えば、napDNAbpに会合するおよび/または結合するgRNAコア領域に生じてよい。伸長された領域は、一本鎖DNAを(プライムエディターのポリメラーゼによって)コードし、次いで、(a)編集されるべき内在性標的DNAと相同であるよう設計されており、および(b)内在性標的DNA中に導入されるかまたは組み込まれるべき少なくとも1つの所望のヌクレオチド変化(例として、トランジション、トランスバージョン、欠失、または挿入)を含む「DNA合成鋳型」を含む。伸長された領域はまた、他の機能的配列エレメント(以下に限定されないが、「プライマー結合部位」および「スパーサーまたはリンカー」配列など)、または他の構造的エレメント(以下に限定されないが、

20

30

【0140】

ある特定の態様において、PEgRNAは、5'伸長アーム、スパーサー、およびgRNAコアを有する。5'伸長は、5'から3'方向に逆転写酵素鋳型、プライマー結合部位、およびリンカーをさらに含む。逆転写酵素鋳型はより幅広く「DNA合成鋳型」と呼ばれてもよく、ここで、本明細書に記載のプライムエディターのポリメラーゼはRTではなく別のタイプのポリメラーゼである。

40

【0141】

ある特定の他の態様において、PEgRNAは、5'伸長アーム、スパーサー、およびgRNAコアを有する。5'伸長は、5'から3'方向に逆転写酵素鋳型、プライマー結合部位、およびリンカーをさらに含む。逆転写酵素鋳型はより幅広く「DNA合成鋳型」と呼ばれてもよく、ここで、本明細書に記載のプライムエディターのポリメラーゼはRTではなく別のタイプのポリメラーゼである。

【0142】

さらに他の態様において、PEgRNAは、5'から3'方向に、スパーサー(1)、gRNAコア(2)、および伸長アーム(3)を有する。伸長アーム(3)はPEgRNAの3'末端にある。伸長アーム(3)は、3'から5'方向に「プライマー結合部位」(A)、「編集鋳型」(B)、および

50

「相同アーム」(C)をさらに含む。伸長アーム(3)は任意の改変領域を3'および5'末端に含んでもよく、これらは同じ配列であっても、または異なる配列であってもよい。加えて、PEgRNAの3'末端は、転写ターミネーター配列を含んでいてもよい。PEgRNAのこれらの配列エレメントはさらに、本明細書に記載および定義されている。

【0143】

さらに他の態様において、PEgRNAは、5'から3'方向に、伸長アーム(3)、スペーサー(1)、およびgRNAコア(2)を有する。伸長アーム(3)はPEgRNAの5'末端にある。伸長アーム(3)は3'から5'方向に「プライマー結合部位」(A)、「編集鑄型」(B)、および「相同アーム」(C)をさらに含む。伸長アーム(3)は任意の改変領域を3'および5'末端に含んでもよく、これらは同じ配列であっても、または異なる配列であってもよい。PEgRNAは3'末端に転写ターミネーター配列を含んでもよい。PEgRNAのこれらの配列エレメントはさらに、本明細書に記載および定義されている。

10

【0144】

PE1

本明細書において使用される場合、「PE1」は、以下の構造: [NLS] - [Cas9(H840A)] - [リンカー] - [MMLV_RT(wt)] + 所望のPEgRNAを有するCas9(H840A)および野生型MMLV RTを含む融合タンパク質を含むPE複合体を指し、ここで、PE融合体は、以下に示す配列番号3のアミノ酸配列を有する;

20

30

40

50

【化 1】

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGN
TDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK
VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTD
KADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEEENPIN
ASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSND
LAEDAKLQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI
TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGG
ASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHA
ILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYFTVYNELTKVKYV
TEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE
DRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYA
HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNF
MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPV
ENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNK
VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGL
SELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLV
SDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYD
VRKMAIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
WDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDW
DPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKKGSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDF
LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF
LYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKV
LSAYNKHRRDKPIREQAENIIHLFTLNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDT
LIHQSTGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSTL
NIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTPVSIKQY
PMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNRVED
IHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDFAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLT
WTRLPPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALL
QTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREF
LGTAFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGLTFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTK
PFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAG
KLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTRVQFGPVVALNPATLL
PLPEEGLQHNCILDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTET
EVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTDSTRYAFATAHIGEIYRRRGLLTSE
GKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDT
TLLIENSSPSGGSKRTADGSEFEPKKRKV (配列番号 3)

10

20

30

40

キー:

核局在化配列(NLS) 上部:(配列番号95)、下部:(配列番号96)

CAS9(H840A) (配列番号 10)

33-アミノ酸リンカー(配列番号80)

M-MLV 逆転写酵素(配列番号33)

【 0 1 4 5 】

PE2

本明細書において使用される場合、「PE2」は、Cas9(H840A)および以下の構造: [NLS] - [Cas9(H840A)] - [リンカー] - [MMLV_RT(D200N)(T330P)(L603W)(T306K)(W313F)] + 所望のPEgRNAを有するバリエーションMMLV RTを含む融合タンパク質を含むPE複合体を指し、PE融合体は、以下に示す配列番号4のアミノ酸配列を有する

50

【化 2】

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGN
TDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK
VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTD
KADRLRIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPIN
ASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD
LAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI
TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGG
ASQEEFYKFIPKILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHA
ILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYV
TEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE
DRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYA
HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNF
MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPV
ENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNK
VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGL
SELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLV
SDFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDKVYD
VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
WDKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDW
DPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDF
LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF
LYLASHYEKLKGSPEDENEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKV
LSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDT
LIHQSTGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS/TL
NIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIHPLKATSTPVSIIQY
PMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNRVED
IHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLCLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLT
WTRLPGQGFKNSTPLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLAATSELDCCQGTRALL
QTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREF
LGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTK
PFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGWRRPVAYLSKKLDPVAAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAG
KLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLDTRVQFGPVVALNPATLL
PLPEGLQHNCILDIAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTET
EVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKNVYTDSTYAFATAHIGEIYRRRGWLT
EGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDT
STLLIENSSPSGGSKRTADGSEFEPKKRKV (配列番号 4)

キー:

核局在化配列(NLS) 上部:(配列番号95)、下部:(配列番号96)

CAS9(H840A) (配列番号 10)

33-アミノ酸リンカー(配列番号80)

M-MLV 逆転写酵素(配列番号34)

【0146】

PE3

本明細書において使用される場合、「PE3」は、PE2と、PE2と複合体化する第2の鎖ニッキングガイドRNAとを指し、編集された鎖の選好的置き換えを誘導するために非編集DNA鎖上にニックを導入する。

【0147】

PE3b

本明細書において使用される場合、「PE3b」はPE3を指すが、第2の鎖ニッキングガイドRNAは、所望の編集のインストール後までは第2の鎖ニックが導入されないように時

間的コントロールのために設計される。これは、元の対立遺伝子ではなく編集された鎖のみに適合するスペーサー配列を有するgRNAを設計することによって達成される。以降ではPE3bと呼ばれるこの戦略を使用すると、プロトスペーサーと編集されない対立遺伝子との間のミスマッチは、PAM鎖上の編集事象が起こる後までは、sgRNAによるニッキングを好まないはずである。

【0148】

PEmax

本明細書において使用される場合、「PEmax」は、以下の構造を有するCas9(R221K N39K H840A)およびバリエーションMMLV RT五変異体(D200N T306K W313F T330 P L603W)を含む融合タンパク質を含むPE複合体を指す: [双節型NLS] - [Cas9(R221K)(N394K)(H840A)] - [リンカー] - [MMLV_RT(D200N)(T330P)(L603W)] - [双節型NLS] - [NLS] + 所望のPEgRNA、ここで、PE融合体は、配列番号2のアミノ酸配列、および以下に示される配列番号1の核酸配列を有する:

10

【化3-1】

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSHEMA
KVDDSFHRLLESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDST
DKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPI
NASGVDAKAILSARLSKSRKLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF
DLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT
EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID
GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLKREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGE
LHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETI
TPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKV
KYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEIS
GVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA

20

30

40

50

【化 3 - 2】

NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV
VDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKD
DSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVY
GDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET
NGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKL
IARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELA
LPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVIL
ADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYT
STKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKR
KVSGGSSGGSTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQA
PLIIPKATSTPVS IKQYPMSQEARLG IKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGT
NDYRPVQDLREV NKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVL DLKDAFFCLRLHPT
SQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRL PQGFKNSPTLFNEALHRDLAD FRIQHPDLILLQ
YVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEG
QRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTL
FNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWR
RPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALV
KQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCILDILA
EAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGT
SAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKN
KDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLL
IENSSPSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVGSGPAAKRVKLD(配列番号 2)

10

20

30

【化 4 - 1】

ATGAAACGGACAGCCGACGGAAGCGAGTTCGAGTCACCAAAGAAGAAGCGGAA
AGTCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGG
CTGGGCGCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGT
GCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCT
GCTGTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGC
CAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGAT
CTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGA
AGAGTCCTTCCTGGTGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTA

40

50

【化 4 - 2】

CCACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCT
GATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATC
GAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAG
CTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGC
GGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAAG
CTGGAAAATCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTC
GGAAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAAC
TTCGACCTGGCCGAGGATGCCAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGAC
GACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTG
TTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTG
AGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAG
AGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGTGCGG
CAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC
GGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAG
TTCATCAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTG
AAGCTGAAGAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGC
AGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGG
CAGGAAGATTTTTACCCATTCCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAG
ATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAAC
AGCAGATTGCGCTGGATGACCAGAAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCCCTGG
AACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCAGAGCTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAG
CACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTG
AAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAG
AAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAAGTGACCGTG
AAGCAGCTGAAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTG
GAAATCTCCGGCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCAC
GATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAAC
GAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGA
GAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAA
GTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAG
CCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCT
GGATTTCTGAAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAAAACCTTCATGCAGCTGATC
CACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCAGGTGTCC
GGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCC
GCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTG
AAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGA
GAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAA
GCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACA
CCCCGTGGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCT
GCAGAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCT
GTCCGACTACGATGTGGACGCTATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGA
CTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAG
CGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCTGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGCG
GCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAAGTTCGACAATCTGAC
CAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAA

10

20

30

40

50

【化 4 - 3】

GAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCT
GGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGA
AGTGAAAAGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGA
TTTCCAGTTTACAAAAGTGC GCGAGATCAACAACACCACCACGCCCCACGAC
GCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAG
CTGAAAAGCGAGTTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAAG
ATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTC
TTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACG
GCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAAACCGGGGAG
ATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGC GGAAGTGCTGAGC
ATGCCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTC
AGCAAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGA
AAGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTG
GCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAAGTGGAAGAGGGCAAGTCCAAGAAA
CTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGC
TTCGAGAAGAATCCCATCGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTG
AAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAA
ACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAAC
GAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACT
ATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTG
TGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGT
TCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAAGTGCTGTCCG
CCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTT
TGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGA
CGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGA
CCTGTCTCAGCTGGGAGGTGACTCCGGCGGAAGCTCTGGTGGCAGCAAGCG
GACCGCCGACGGCTCTGAATTCGAGAGCCCTAAGAAGAAAAGAAAGGTGAG
CGGAGGCTCTAGCGGCGGAAGCACCCTGAACATTGAAGACGAGTATAGACTG
CATGAAACAAGCAAGGAACCCGACGTGTCCCTGGGCTCCACCTGGCTGTCCGAC
TTTCCCAGGCCTGGGCCGAGACAGGAGGAATGGGCCTGGCCGTGCGGCAGGCA
CCCCTGATCATCCCTCTGAAGGCCACCTCTACACCCGTGAGCATCAAGCAGTACC
CTATGTCTCAGGAGGCCAGACTGGGCATCAAGCCTCACATCCAGAGGCTGCTGG
ACCAGGGCATCCTGGTGCCATGCCAGAGCCCCTGGAACACACCACTGCTGCCCCG
TGAAGAAGCCAGGCACCAATGACTATAGACCCGTGCAGGATCTGAGAGAGGTGA
ACAAGAGGGTGGAGGATATCCACCCCAACCGTGCCCAACCCTTACAATCTGCTGTC
CGGCCTGCCCCCTTCTCACCAGTGGTATACAGTGCTGGACCTGAAGGATGCCTTC
TTTTGTCTGAGACTGCACCCTACCAGCCAGCCACTGTTTCGCCTTTGAGTGAGGG
ACCCTGAGATGGGCATCTCTGGCCAGCTGACCTGGACACGCCTGCCTCAGGGCTT
CAAGAATAGCCCAACACTGTTTAACGAGGCCCTGCACCGCGACCTGGCAGATTT
CCGGATCCAGCACCCAGATCTGATCCTGCTGCAGTACGTGGACGATCTGCTGCTG
GCCGCCACCAGCGAGCTGGATTGCCAGCAGGGAACACGCGCCCTGCTGCAGACC
CTGGGAAACCTGGGATATAGGGCATCCGCCAAGAAGGCCCAGATCTGTCAGAAG
CAGGTGAAGTACCTGGGCTATCTGCTGAAGGAGGGCCAGAGATGGCTGACAGAG
GCCAGGAAGGAGACAGTGATGGGCCAGCCAACACCCAAGACCCCAAGACAGCT
GAGGGAGTTCCTGGGCAAAGCAGGATTTTGCAGGCTGTTTCATCCCAGGATTCGC

10

20

30

40

50

【化 4 - 4】

AGAGATGGCAGCACCTCTGTACCCACTGACCAAGCCGGGCACCCTGTTTAATTGG
GGCCCTGACCAGCAGAAGGCCTATCAGGAGATCAAGCAGGCCCTGCTGACAGCA
CCAGCCCTGGGCCTGCCAGACCTGACCAAGCCTTTCGAGCTGTTTGTGGATGAGA
AGCAGGGCTACGCCAAGGGCGTGCTGACCCAGAAGCTGGGACCATGGAGACGG
CCCGTGGCCTATCTGTCCAAGAAGCTGGACCCAGTGGCAGCAGGATGGCCACCA
TGCTTGAGGATGGTGGCAGCAATCGCCGTGCTGACAAAGGATGCCGGCAAGCTG
ACCATGGGACAGCCACTGGTCATCCTGGCACCACACGCAGTGGAGGCCCTGGTG
AAGCAGCCTCCAGATCGCTGGCTGTCTAACGCCCGGATGACACACTACCAGGCC
CTGCTGCTGGACACCGATCGCGTGCAGTTTGGCCCTGTGGTGGCCCTGAATCCAG
CCACCCTGCTGCCTCTGCCAGAGGAGGGCCTGCAGCACAACCTGTCTGGACATCCT
GGCAGAGGCACACGGAACAAGGCCAGACCTGACCGATCAGCCCCTGCCTGACGC
CGATCACACATGGTATACCGATGGAAGCTCCCTGCTGCAGGAGGGCCAGAGGAA
GGCAGGAGCAGCAGTGACCACAGAGACAGAAGTGATCTGGGCCAAGGCCCTGC
CAGCAGGCACATCCGCCCAGCGGGCCGAGCTGATCGCCCTGACCCAGGCCCTGA
AGATGGCCGAGGGCAAGAAGCTGAACGTGTACACAGACTCCAGATATGCCTTTCG
CCACCGCACACATCCACGGAGAGATCTACAGGCGCCGGGGCTGGCTGACCTCTG
AGGGCAAGGAGATCAAGAACAAGGATGAGATCCTGGCCCTGCTGAAGGCCCTGT
TTCTGCCCAAGCGGCTGAGCATCATCCACTGTCCTGGACACCAGAAGGGACACTC
CGCCGAGGCAAGGGGCAATCGGATGGCCGACCAGGCCGCCAGAAAGGCTGCTAT
TACTGAAACTCCCGACACTTCCACTCTGCTGATTGAAAACCTCCTCCCCTTCTGGCG
GCTCAAAAAGAACCGCCGACGGCAGCGAATTCGAGTCTCCCAAGAAGAAGAGGA
AAGTCGGCTCTGGCCCTGCCGCTAAGAGAGTGAAAGCTGGAC (配列番号 1)

10

20

キー:

双節型SV40核局在化配列(NLS)上部: (配列番号 95)、

30

CAS9(R221K N39K H840A) (配列番号 11)SGGSx2- 双節型 SV40NLS-SGGSx2 リンカー (配列番号 79)

M-MLV 逆転写酵素 (D200N T306K W313F T330P L603W) (配列番号 34)

他のリンカー配列 (配列番号 81)

双節型 SV40 NLS (配列番号 97)

他のリンカー配列 (配列番号 82)

c-Myc NLS (配列番号 98)

40

【0149】

ポリメラーゼ

本明細書において使用される場合、「ポリメラーゼ」という用語は、本明細書に記載のプライムエディターシステムに関連して使用されてよいヌクレオチド鎖を合成する酵素を指す。ポリメラーゼは「鑄型依存性」ポリメラーゼであり得る(すなわち、鑄型鎖のヌクレオチド塩基の順序に基づいてヌクレオチド鎖を合成するポリメラーゼ)。ポリメラーゼは、「鑄型非依存性」ポリメラーゼでもまたあり得る(すなわち、鑄型鎖の要件なしにヌクレオチド鎖を合成するポリメラーゼ)。ポリメラーゼは、「DNAポリメラーゼ」または「RNAポリメラーゼ」としてさらに類別されてもよい。様々な態様において、プライム

50

エディターシステムはDNAポリメラーゼを含む。様々な態様において、DNAポリメラーゼは、「DNA依存性DNAポリメラーゼ」であり得る(すなわち、それによると、鋳型分子はDNAの鎖である)。このような場合には、DNA鋳型分子はPEgRNAであり得、伸長アームはDNAの鎖を含む。このような場合には、PEgRNAはキメラまたはハイブリッドPEgRNAと呼ばれてもよく、これはRNA部分(すなわち、スパーサーおよびgRNAコアを包含するガイドRNA構成成分)およびDNA部分(すなわち、伸長アーム)を含む。様々な他の態様において、DNAポリメラーゼは、「RNA依存性DNAポリメラーゼ」であり得る(すなわち、それによると、鋳型分子はRNAの鎖である)。このような場合には、PEgRNAはRNAであり、すなわちRNA伸長を包含する。「ポリメラーゼ」という用語は、ヌクレオチドの重合を触媒する酵素を指してもよい(すなわちポリメラーゼ活性)。一般的に、酵素は、ポリヌクレオチド鋳型配列にアニールしたプライマー(例として、PEgRNAのプライマー結合部位にアニールしたプライマー配列など)の3'末端において合成を開始し、鋳型鎖の5'末端の方へ進むことになる。「DNAポリメラーゼ」はデオキシヌクレオチドの重合を触媒する。DNAポリメラーゼを参照して本明細書において使用される場合、DNAポリメラーゼという用語は、「その機能的断片」を包含する。「その機能的断片」は、ポリメラーゼのアミノ酸配列全体未満を包摂し、少なくとも1つのセットの条件下においてポリヌクレオチドの重合を触媒する能力を保持する、野生型または突然変異体DNAポリメラーゼのいずれかの部分を指す。このような機能的断片は別個の実態として存在し得てもよいが、または融合タンパク質などのより大きいポリペプチドの構成要素であってもよい。

10

20

【0150】 プライム編集

本明細書において使用される場合、「プライム編集」という用語は、遺伝子編集のためのアプローチを指し、napDNAbp、ポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)、および次いで標的DNA配列に組み込まれる所望の新たな遺伝情報をコードする(または遺伝情報を欠失する)ためのDNA合成鋳型を包含する特殊なガイドRNAを使用する。古典的なプライム編集は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Anzalone, A.V. et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature 576, 149-157 (2019)の発明者らの刊行物に記載されている。

30

【0151】

プライム編集は、特定のDNA部位に新たな遺伝情報を直接的に書き込む汎用的かつ精密なゲノム編集法であるゲノム編集のためのプラットフォームを表し、ポリメラーゼ(すなわち、融合タンパク質の形態で、またはそうでなければnapDNAbpとトランスで提供される)と会合して作用する核酸プログラム型DNA結合タンパク質(「napDNAbp」)を使用し、プライム編集システムはプライム編集(PE)ガイドRNA(「PEgRNA」)によりプログラムされ、これは、標的部位を特定すると共に、ガイドRNA上に(例として、ガイドRNAの5'もしくは3'末端、または内部部分に)操作された伸長(DNAまたはRNAのいずれか)によって置き換えDNA鎖の形態での所望の編集の合成の鋳型となる。所望の編集(例として、1核酸塩基置換)を含有する置き換え鎖は、編集されるべき標的部位の(ニック部位のすぐ下流の)内在性鎖と同じ(またはそれに対して相長的である)配列を共有する(それが所望の編集を包含するということを例外とする)。DNA修復および/または複製機構によって、ニック部位の下流の内在性鎖は、所望の編集を含有する新たに合成された置き換え鎖によって置き換えられる。一部の場合には、プライム編集は「検索および置換」ゲノム編集技術と考えられてもよく、これは、本明細書に記載されているプライムエディターが、編集されるべき所望の標的部位を検索し位置付けるのみならず、同時に、対応する標的部位の内在性DNA鎖の代わりにインストールされる所望の編集を含有する置き換え鎖をコードするからである。本開示のプライムエディターは、部分的には、標的プライム逆転写(TPRT)または「プライム編集」の機序が、高効率および遺伝的柔軟性を有する精密なCRISPR/Casベースのゲノム編集を行うために活用または適合され得るという発見に関する。天然には、TPRTは、哺乳動物非LTRレトロトランスポゾンおよび細菌群IIイン

40

50

トロンなどの可動DNAエレメントによって使用される。本発明者らは、本明細書において、Casタンパク質-逆転写酵素融合体または関係するシステムをトランスで使用して、ガイドRNAにより特定のDNA配列を標的化し、標的部位に一本鎖ニックを生成し、ガイドRNAに組み込まれた操作された逆転写酵素鑄型の逆転写のためのプライマーとして、ニックを有するDNAを使用する。しかしながら、概念はDNAポリメラーゼ構成成分として逆転写酵素を使用するプライムエディターから始まるが、本明細書に記載のプライムエディターは逆転写酵素に限定されず、実質的にいずれかのDNAポリメラーゼの使用を包含してもよい。実際、本出願は、至る所で、「逆転写酵素」を有するプライムエディターを指してもよいが、逆転写酵素がプライム編集で作用してもよいDNAポリメラーゼの唯一のタイプであることがここで示される。ゆえに、本明細書は「逆転写酵素」に言及し、当業者は、いずれかの好適なDNAポリメラーゼが逆転写酵素の代わりに使用されてもよいことを認識するべきである。ゆえに、一側面では、プライムエディターはCas9(または同等のnapDNAbp)を含んでもよく、これは、標的DNAの相補的なプロトSpacerにアニールするSpacer配列を含有する特定のガイドRNA(すなわち、PEgRNA)とそれを会合させることによって、DNA配列を標的化するようにプログラムされる。特定のガイドRNAは、所望の遺伝変異を含有するDNAの置き換え鎖をコードする伸長の形態の新たな遺伝情報も含有し、これは、標的部位における対応する内在性DNA鎖を置き換えるために使用される。PEgRNAからの情報を標的DNAに移入するために、プライム編集の機序は、DNAの1つの鎖の標的部位へニックを入れて3'ヒドロキシル基を曝露することを伴う。次いで、曝露された3'ヒドロキシル基を使用して、PEgRNA上の編集コード伸長のDNA重合を標的部位に直接プライミングすることができる。様々な態様において、編集を含有する置き換え鎖の重合のための鑄型を提供する伸長は、RNAまたはDNAから形成され得る。RNA伸長の場合には、プライムエディターのポリメラーゼはRNA依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素など)であり得る。DNA伸長の場合には、プライムエディターのポリメラーゼはDNA依存性DNAポリメラーゼであってもよい。本明細書において開示されるプライムエディターによって形成される新たに合成された鎖(すなわち、所望の編集を含有する置き換えDNA鎖)は、所望のヌクレオチド変化(例として、単一ヌクレオチドの変化、欠失、もしくは挿入、またはそれらの組合せ)の包含を例外として、ゲノム標的配列に対して相同的である(すなわち、それと同じ配列を有する)であろう。DNAの新たに合成された(または置き換え)鎖は一本鎖DNAフラップともまた呼ばれてよく、これは相補的で相同的な内在性DNA鎖とのハイブリダイゼーションについて競合し、それによって対応する内在性鎖に取って代わる。ある特定の態様において、システムは、エラーを起こしやすい逆転写酵素の使用と組み合わせることができる(例として、Cas9ドメインとの融合タンパク質として提供されるか、またはCas9ドメインに対してトランスで提供される)。エラーを起こしやすい逆転写酵素は一本鎖DNAフラップの合成の間に変異を導入し得る。ゆえに、ある特定の態様において、エラーを起こしやすい逆転写酵素は、標的DNAへのヌクレオチド変化を導入するために利用され得る。システムと共に使用されるエラーを起こしやすい逆転写酵素に依存して、変化はランダムまたは非ランダムであり得る。ハイブリダイズした中間体(内在性DNA鎖にハイブリダイズした逆転写酵素によって合成される一本鎖DNAフラップを含む)の分解は、内在性DNAの得られる取って代わられたフラップの除去(例として、5'末端DNAフラップエンドヌクレアーゼFEN1による)、標的DNAに対する合成された一本鎖DNAフラップのライゲーション、ならびに細胞性のDNA修復および/または複製プロセスの結果としての所望のヌクレオチド変化の同化を包含し得る。鑄型によるDNA合成は、挿入および欠失を包含するいずれかのヌクレオチドの改変について1塩基精度をもたらすので、このアプローチの範囲は非常に幅広く、予見可能には、基礎研究および処置学において無数の適用に使用され得る。

【0152】

様々な態様において、プライム編集は、プライム編集ガイドRNA(PEgRNA)と複合体化した核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)と標的DNA分子(これについて、ヌクレオチド配列の変化が導入されることが望まれる)を接触させることによって作

動する。様々な態様において、プライム編集ガイドRNA(PEgRNA)は、ガイドRNAの3'もしくは5'末端、またはガイドRNAにおける分子内の位置に伸長を含み、所望のヌクレオチド変化(例として、単一ヌクレオチドの変化、挿入または欠失)をコードする。工程(a)において、napDNABp/伸長gRNA複合体はDNA分子と接触し、伸長gRNAはnapDNABpをガイドして標的遺伝子座に結合させる。工程(b)では、標的遺伝子座のDNAの鎖の1つにニックが導入され(例として、ヌクレアーゼまたは化学的薬剤による)、それによって利用可能な3'末端を標的遺伝子座の鎖の1つに生じる。ある特定の態様において、ニックは、Rループ鎖に対応するDNAの鎖、すなわちガイドRNA配列にハイブリダイズされない鎖、すなわち「非標的鎖」に生じる。しかしながら、ニックは鎖のどちらかに導入され得る。すなわち、ニックは、Rループの「標的鎖」(すなわち、伸長されたgRNAのプロトSpacerにハイブリダイズした鎖)または「非標的鎖」(すなわち、Rループの一本鎖部分を形成し、標的鎖に相補的な鎖)に導入され得た。工程(c)では、DNA鎖の3'末端(ニックによって形成される)は、逆転写をプライミングするためにガイドRNAの伸長された部分と相互作用する(すなわち、「標的プライムRT」)。ある特定の態様において、3'末端DNA鎖は、ガイドRNAの伸長された部分の特異的なRTプライミング配列、すなわちPEgRNA上の「逆転写酵素プライミング配列」または「プライマー結合部位」にハイブリダイズする。工程(d)では、逆転写酵素(または他の好適なDNAポリメラーゼ)が導入され、これは、プライミングされた部位の3'末端からプライム編集ガイドRNAの5'末端の方へDNAの一本鎖を合成する。DNAポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)はnapDNABpに融合され得るか、または代替的にはnapDNABpに対してトランスで提供され得る。これは、ニック部位のまたはそれに隣接する内在性DNAに対して、そうでなければ相同的である所望のヌクレオチド変化(例として、1塩基の変化、挿入、もしくは欠失、またはこれらの組合せ)を含む一本鎖DNAフラップを形成する。工程(e)では、napDNABpおよびガイドRNAが放出される。工程(f)および(g)は一本鎖DNAフラップの分解に関し、その結果、所望のヌクレオチド変化が標的遺伝子座に組み込まれるようになる。このプロセスは、一旦3'一本鎖DNAフラップが内在性DNA配列に侵入およびハイブリダイズすると形成する対応する5'内在性DNAフラップを除去することによって、所望の産物形成へと駆動され得る。理論に拘束されるものではないが、細胞の内在性DNA修復および複製プロセスは、ミスマッチDNAを分解して、ヌクレオチド変化を組み込んで、所望の変更された産物を形成する。プロセスはまた、「第2の鎖ニックング」による生成物形成に向けて駆動され得る。このプロセスは次の遺伝子変化の少なくとも1以上を導入してもよい:トランスバージョン、トランジション、欠失、および挿入。

【0153】

「プライムエディター(PE)システム」または「プライムエディター(PE)」または「PEシステム」または「PE編集システム」という用語は、本明細書に記載の標的プライム逆転写(TPRT)を使用するゲノム編集の方法を伴う組成物を指し、napDNABp、逆転写酵素、融合タンパク質(例として、napDNABpおよび逆転写酵素を含む)、プライム編集ガイドRNA、ならびに融合タンパク質およびプライム編集ガイドRNAを含む複合体、ならびに補助的なエレメント、例えば、プライム編集プロセスを編集された産物形成の方へ駆動することを助けるための第2鎖ニックング構成成分(例として、第2の鎖sgRNA)および5'内在性DNAフラップ除去エンドヌクレアーゼ(例として、FEN1)を包含するが、これらに限定されない。

【0154】

ここまで記載された態様において、PEgRNAは、ガイドRNA(これは、それ自体が、Spacer配列およびgRNAコアまたは足場を含む)とプライマー結合部位およびDNA合成鑄型を含む5'または3'伸長アームとを含む単一分子を構成するが、PEgRNAは2つの個々の分子の形態をとってもよく、ガイドRNAと、トランスプライムエディターRNA鑄型(tPERT)とから構成され、これは、本質的に、伸長アーム(特に、プライマー結合部位およびDNA合成ドメインを包含する)およびRNA-タンパク質動員ドメイン(例として、MS2アプタマーまたはヘアピン)を同じ分子上に収容し、これは、tPERT動員タンパク質(例

として、MS2アプタマーに結合するMS2cpタンパク質)を含む改変されたプライムエディター複合体へと共局在または動員されるようになる。

【0155】

プライムエディター

「プライムエディター」という用語は、PEgRNA(または「伸長ガイドRNA」)の存在下で標的ヌクレオチド配列に対してプライム編集を実行することが可能なnapDNABp(例として、Cas9ニッカーゼ)および逆転写酵素を含む構築物を指す。「プライムエディター」という用語は、融合タンパク質、またはPEgRNAと複合体化された融合タンパク質、および/または第2鎖ニッキングsgRNAとさらに複合体化された融合タンパク質を指してもよい。一部の態様において、プライムエディターはまた、本明細書に記載されている非編集鎖の第2部位ニッキング工程へ向かうことが可能な、融合タンパク質(napDNABpと融合した逆転写酵素)、PEgRNA、および通常のガイドRNAを含む複合体も指してもよい。一部の態様において、プライムエディターという用語は、トランスで提供されるか、そうでなければ互いに融合しないnapDNABpおよび逆転写酵素を指す。

【0156】

プライマー結合部位

「プライマー結合部位」または「PBS」という用語は、伸長アームの構成成分としてPEgRNA上に(典型的には伸長アームの3'末端に)位置するヌクレオチド配列を指し、プライムエディターによる標的配列のCas9ニッキング後に形成されるプライマー配列に結合するのに役立つ。他の箇所で詳述されるように、プライムエディターのCas9ニッカーゼ構成成分が標的DNA配列の1本の鎖にニックを有する場合、3'末端ssDNAフラップが形成され、これはPEgRNA上のプライマー結合部位にアニールして逆転写をプライミングするプライマー配列に役立つ。

【0157】

プロトスペーサー

本明細書において使用される場合、「プロトスペーサー」という用語は、PAM(プロトスペーサー隣接モチーフ)配列に隣接するDNA上の配列(約20bp)を指す。プロトスペーサーはガイドRNAのスペーサー配列と同じ配列を共有する。ガイドRNAは標的DNA上のプロトスペーサー配列の相補体(具体的には、その1つの鎖、すなわち標的DNA配列の「非標的鎖」に対する「標的鎖」)にアニーリングする。Cas9が機能するためには、Cas9遺伝子の細菌種に応じて異なる特異的プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)も必要である。S.pyogenesに由来する最も一般的に使用されるCas9ヌクレアーゼは、ゲノムDNA上の標的配列の直接的に下流に見られる非標的鎖上のNGGというPAM配列を認識する。当業者は、最新技術の文献が、場合によっては、それを「スペーサー」と指すよりもむしろ、ガイドRNAそれ自体の上の約20nt標的特異的ガイド配列として「プロトスペーサー」を指すということを認識するであろう。ゆえに、一部の場合には、本明細書において使用される場合、「プロトスペーサー」という用語は「スペーサー」という用語と互換的に使用されてもよい。「プロトスペーサー」または「スペーサー」のいずれかの出現の周囲の記載という文脈は、用語がgRNAまたはDNA標的を参照しているかどうかについて読み手に情報提供することを助けるであろう。

【0158】

プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)

本明細書において使用される場合、「プロトスペーサー隣接配列」または「PAM」という用語は、Cas9ヌクレアーゼの重要な標的化構成成分であるおよそ2~6塩基対のDNA配列を指す。典型的には、PAM配列はいずれかの鎖上にあり、Cas9によってカットされる部位の5'から3'方向においては下流である。カノニカルなPAM配列(すなわち、Streptococcus pyogenesのCas9ヌクレアーゼまたはSpCas9に会合されるPAM配列)は5'-NGG-3'であり、「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配列が異なる生物からの異なるCas9ヌクレアーゼまたは同等タンパク質と関連され得る。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特異性を変更するように改変されてもよい。

【0159】

例えば、配列番号9のカノニカルなSpCas9アミノ酸配列を参照して、PAM配列は1つ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)PAM特異性をNGANまたはNGNGへと変更するD1135V、R1335Q、およびT1337R「VQRバリエント」、(b)PAM特異性をNGAGへと変更するD1135E、R1335Q、およびT1337R「EQRバリエント」、ならびに(c)PAM特異性をNGCGへと変更するD1135V、G1218R、R1335E、およびT1337R「VRERバリエント」を包含する。加えて、カノニカルなSpCas9のD1135EバリエントはなおNGGを認識するが、それは野生型SpCas9タンパク質と比較して選択的である。

10

【0160】

異なる細菌種からのCas9酵素(すなわち、Cas9オルソログ)は様々なPAM特異性を有し得るということも認識されるであろう。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(NmCas)はNNNNGATTを認識する。別の例では、*Streptococcus thermophilis*からのCas9(StCas9)はNNAGAAWを認識する。なお別の例では、*Treponema denticola*からのCas9(TdCas)はNAAAACを認識する。これらは例であって、限定することを意味しない。さらに、非SpCas9が種々のPAM配列に結合することがさらに認識され、これは、好適なSpCas9 PAM配列が所望の標的のカットされる部位に存在しない場合にそれらを有用にする。その上、非SpCas9は、それらをSpCas9よりも有用にする他の特徴を有してもよい。例えば、*Staphylococcus aureus*からのCas9(SaCas9)はSpCas9よりも約1キロボース小さく、そのため、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(参照により本明細書に組み込まれる)に対してさらなる参照がなされてもよい。

20

【0161】

逆転写酵素

「逆転写酵素」という用語はRNA依存性DNAポリメラーゼとして特徴付けられるポリメラーゼのあるクラスについて記載する。すべての公知の逆転写酵素はRNA鋳型からDNA転写物を合成するためにプライマーを必要とする。歴史的には、逆転写酵素は主としてmRNAをcDNAに転写するために使用されており、これは次いでさらなる操作のためにベクターにクローニングされ得る。トリ骨髄芽球症(myoblastosis)ウイルス(AMV)逆転写酵素は最初の広く用いられるRNA依存性DNAポリメラーゼであった(Verma, Biochim. Biophys. Acta 473:1(1977))。酵素は、5'-3'RNA指向性DNAポリメラーゼ活性、5'-3'DNA指向性DNAポリメラーゼ活性、およびRNase H活性を有する。RNase HはRNA-DNAハイブリッドのRNA鎖に特異的なプロセッシブな5'および3'リボヌクレアーゼである(Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, New York: Wiley & Sons(1984))。公知のウイルス逆転写酵素はブルーフリーディングにとって必要な3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を欠くので、転写のエラーは逆転写酵素によって修正され得ない(Saunders and Saunders, Microbial Genetics Applied to Biotechnology, London: Croom Helm(1987))。AMV逆転写酵素の活性およびその関連するRNase H活性の詳細な研究は、Berger et al., Biochemistry 22:2365-2372(1983)によって提示されている。分子生物学に鋭意用いられる別の逆転写酵素はモロニー Maus 白血病ウイルス(M-MLVまたは「MMLV」)を起源とする逆転写酵素である。例として、Gerard, G. R., DNA 5:271-279(1986)およびKotewicz, M. L., et al., Gene 35:249-258(1985)を参照されたい。RNase H活性を実質的に欠くM-MLV逆転写酵素もまた記載されている。例として、米国特許第5,244,797号を参照されたい。本発明はいずれかのかかる逆転写酵素またはそれらのバリエントもしくは突然変異体の使用を企図する。

30

40

【0162】

50

加えて、本発明は、エラーを起こしやすい、すなわちエラーを起こしやすい逆転写酵素と呼ばれてもよい逆転写酵素、または重合の間にヌクレオチドの高忠実性組み込みを支持しない逆転写酵素の使用を企図する。ガイドRNAと共に組み込まれたRT鋳型に基づく一本鎖DNAフラップの合成の間に、エラーを起こしやすい逆転写酵素は、RT鋳型配列とミスマッチである1以上のヌクレオチドを導入し得、それによって、一本鎖DNAフラップの誤りがちな重合によってヌクレオチド配列に変化を導入する。次いで、一本鎖DNAフラップの合成の間に導入されるこれらのエラーは、対応する内在性標的鎖に対するハイブリダイゼーション、取って代わられた内在性鎖の除去、ライゲーション、ならびに次いで内在性DNA修復および/または配列決定プロセスのもう1つのラウンドによって、二本鎖分子上に取り入れられるようになる。

10

【0163】

本開示は、一部の態様において、MMLV RTを含むプライムエディターを提供する。

【0164】

逆転写

本明細書において用いられる「逆転写」という用語は、酵素がRNAを鋳型として用いてDNA鎖(つまり、相補的なDNAまたはcDNA)を合成する能力を指示する。いくつかの態様では、逆転写は「エラーを起こしやすい逆転写」であり得る。これは、それらのDNA重合活性がエラーを起こしやすい、ある種の逆転写酵素の特性を指す。

【0165】

タンパク質、ペプチド、およびポリペプチド

「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」という用語は本明細書中、互換的に使用され、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重合体を指す。用語は、いずれのサイズ、構造、もしくは機能の、タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドを指す。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アミノ酸長であろう。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一群を指してもよい。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチド中のアミノ酸の1以上は、例えば、炭水化物基、ヒドロキシル基、ホスファート基、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のためのリンカー、官能基化、または他の改変などのような化学的実体の付加によって改変されていてもよい。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドはまた、単一分子であっても、または多分子複合体であってもよい。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ただの断片であってもよい。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、天然に存在するもの、組換え体、または合成物、またはいずれのこれらの組合せであってもよい。本明細書において提供されるタンパク質のいずれも、当技術分野で公知のいずれかの方法によって産生されてもよい。例えば、本明細書において提供されるタンパク質は、ペプチドリンカーを含む融合タンパク質に特に適した、組換えタンパク質の発現および精製を介して産生されてもよい。組換えタンパク質の発現および精製のための方法は周知であり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、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。

20

30

40

【0166】

スペーサー配列

本明細書において使用される場合、ガイドRNAまたはPEgRNAに関連する「スペーサー配列」という用語は、標的DNA配列中のプロトスペーサー配列と同じ配列を共有するヌクレオチド配列を含有する約20ヌクレオチドのガイドRNAまたはPEgRNAの部分を指す。スペーサー配列は、プロトスペーサー配列の相補体アニールして、標的部位にssRNA/ssDNAハイブリッド構造および内在性DNA鎖の対応するRループssDNA構造を形成する。

【0167】

50

標的部位

「標的部位」という用語は、本明細書において開示されるプライムエディター(PE)によって編集される核酸分子内の配列を指す。さらに、標的部位は、プライムエディター(PE)およびgRNAの複合体が結合する核酸分子内の配列を指す。

【0168】

バリエーション

本明細書において使用される場合、「バリエーション」という用語は、天然に存在するものから逸脱したパターンを有する属性(qualities)を呈するものを意味するとして解釈されるべきであり、例として、バリエーションCas9は、野生型Cas9アミノ酸配列と比較してアミノ酸残基中に1以上の変化を含むCas9である。「バリエーション」という用語は、参照配列と少なくとも75%、または少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも99%のパーセント同一性を有し、参照配列と同じかまたは実質的に同じ機能活性(単数もしくは複数)を有する、相同のタンパク質を包摂する。用語はまた、参照配列の突然変異体、トランケーション体、またはドメインであって、参照配列と同じかまたは実質的に同じ機能活性(単数もしくは複数)を提示するものも包括する。

10

【0169】

ベクター

「ベクター」という用語は、本明細書において使用される場合、目的の遺伝子をコードするよう改変され得る核酸であって、宿主細胞中へ入って宿主細胞内で突然変異または複製し、次いでベクターの複製形態を別の宿主細胞中へ移入することができる核酸を指す。例示的な好適なベクターは、レトロウイルス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、および接合性プラスミドなどの、ウイルスベクターを包含する。追加の好適なベクターは、本開示に基づき当業者にとって明らかであろう。

20

【0170】

ある特定の態様の詳細な説明

本開示は、改善された編集効率および/または低減されたインデル形成を有するプライム編集のための組成物および方法を提供する。特に、本開示は、napDNABpドメインおよび/または逆転写酵素ドメインを包含する1つ以上の構成成分が改変された(例として、アミノ酸配列は、PE1またはPE2などの開始点プライムエディターに対して変化する)改善されたプライムエディタータンパク質を提供する。例において例示され、本明細書に記載されるように、様々な戦略を使用して、バリエーションまたは操作されたタンパク質構成成分、例えばバリエーションnapDNABpドメインおよびバリエーションRTドメイン、例えばPACEおよびPANCE進化法、および置き換え相同ドメインによるドメインの置換(例として、図27Aの図を参照されたい)を得ることができる。

30

【0171】

本開示は、操作されたCas9ドメイン、操作された逆転写酵素ドメイン、または操作されたCas9ドメインと操作された逆転写酵素ドメインとの組合せを含む、プライムエディタータンパク質を包含する改善されたプライムエディターシステムについて記載する。プライムエディターシステムの場合には、プライムエディターの構成成分(すなわち、Cas9ドメインおよびRTドメイン)は、個々のエレメント(すなわち、カップリングされていないか、または融合されていない)として提供することができる。プライムエディター融合タンパク質の場合には、プライムエディター構成成分(すなわち、Cas9ドメインおよびRTドメイン)は融合タンパク質として提供される。

40

【0172】

様々な態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたCas9ドメインは、配列番号178、配列番号179、もしくは配列番号180のバリエーションCas9配列、または配列番号178、配列番号179もしくは配列番号180のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少な

50

くとも98%、少なくとも99%もしくは少なくとも99.5%もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得るが、ただし、アミノ酸配列は、野生型Cas9に対して、D23G、H99Q、H99R、E102K、E102S、E102R、N175K、D177G、K218R、N309D、I312V、E471K、G485S、K562N、D608N、I632V、D645N、D645E、R654C、G687D、G715E、H721Y、R753K、R753G、H754R、K775R、E790K、T804A、K918A、K1003R、M1021Y、E1071K、およびE1260Dからなる群から選択される少なくとも1つの置換を含むことを条件とする。

【0173】

様々な態様において、本明細書において提供されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質は、核酸-プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)およびマウス乳癌ウイルス(MMTV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、トリ肉腫白血病ウイルス(ASLV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、ブタ内在性レトロウイルス(PERV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、HIV-MMLV逆転写酵素もしくはそのバリエーション、AVIRE逆転写酵素もしくはそのバリエーション、ヒビ内在性ウイルス(BAEVM)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、テナガザル白血病ウイルス(GALV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、コアラレトロウイルス(KORV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、マソンファイザー(Mason-Pfizer)サルウイルス(MPMV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、POK11ERV逆転写酵素もしくはそのバリエーション、サルレトロウイルス2型(SRV2)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、ウーリーサル肉腫ウイルス(WMSV)逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Vp96逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Vc95逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Ec48逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Gs逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Er逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Ne144逆転写酵素もしくはそのバリエーション、Tf1逆転写酵素もしくはそのバリエーション、またはRs09415逆転写酵素(「CRISPR-RT」)もしくはそのバリエーションを含んでもよい。

【0174】

様々な他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、配列番号33のMMLV RT野生型に基づくバリエーションRT配列を含むことができ、配列番号172~177もしくは183~184のバリエーション、または配列番号172~177もしくは183~184のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含でき、アミノ酸配列は、残基13I、19I、32T、38V、60Y、111L、120R、126Y、128N、128F、128H、129S、132S、138R、157F、175Q、175S、200S、200Y、200N、200C、222F、223A、223M、223T、223W、223Y、234I、246I、249S、287A、292T、302A、302K、306K、316R、346K、373N、388C、402A、445N、457I、および462Sのうちの少なくとも1つを含む。

【0175】

さらに様々な他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Ec48 RTに基づくバリエーションRT配列を含むことができ、配列番号188~195、256および257のバリエーション、または配列番号188~195、256および257のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含でき、アミノ酸配列は、残基36V、54K、60K、87E、151T、165D、182N、189N、205K、214L、243N、267I、277F、279K、303M、307R、315K、317S、318E、324Q、326E、328K、343N、372K、378K、および385のうちの少なくとも1つを含む。

【0176】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまた

は融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Tf1 RTに基づくバリエーションRT配列を含むことができ、配列番号196～213および251～255のバリエーション、または配列番号196～213および251～255のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含でき、アミノ酸配列は、残基14A、22K、64L、64W、70T、72V、102I、106R、118R、133N、139T、158Q、188K、260L、269L、274R、288Q、293K、297Q、316Q、321R、356E、363V、413E、423V、および492Nのうちの少なくとも1つを含む。

【0177】

10

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、PERV RTに基づくバリエーションRT配列を含むことができ、配列番号214～215もしくは234～238のバリエーション、または配列番号214～215もしくは234～238のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含でき、アミノ酸配列は残基199N、305K、312F、329P、および602Wのうちの少なくとも1つを含む。

【0178】

20

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、AVIRE RT野生型(配列番号216)に基づくバリエーションRT配列を含むことができ、配列番号217～221のバリエーション、または配列番号217～221のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含でき、アミノ酸配列は残基199N、305K、312F、329P、および604Wのうちの少なくとも1つを含む。

【0179】

30

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、KORV RT野生型(配列番号222)に基づくバリエーションRT配列を含むことができ、配列番号223～227のバリエーション、または配列番号223～227のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含でき、アミノ酸配列は残基197N、303K、310F、327P、および599Wのうちの少なくとも1つを含む。

【0180】

40

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、WMSV RT野生型(配列番号228)に基づくバリエーションRT配列を含むことができ、配列番号229～233のバリエーション、または配列番号229～233のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含でき、アミノ酸配列は残基197N、303K、311F、327P、および599Wのうちの少なくとも1つを含む。

【0181】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Ne144 RT野生型(配列番号239)に基づくバリエーションRT配列を含むことができ、配列番号240のバリエーション、または配列番号240のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%

50

、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%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含でき、アミノ酸配列は残基157T、165T、および288Vのうちの少なくとも1つを含む。

【0182】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Vc95 RT野生型(配列番号241)に基づくバリエーションRT配列を含むことができ、配列番号242のバリエーション、または配列番号242のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含でき、アミノ酸配列は残基11M、75A、97M、146D、および245Tのうちの少なくとも1つを含む。

10

【0183】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Gs RT野生型(配列番号60)に基づくバリエーションRT配列、または配列番号159~171のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含ことができ、アミノ酸配列は、残基12D、16E、16V、17P、20G、37R、37P、38H、40C、41N、41S、45R、67T、67R、72E、73V、78V、93R、123V、126F、129G、162N、190L、206V、233K、234V、263G、264S、267M、279E、287I、291K、309T、344S、358S、360S、363G、374A、および412Hのうちの少なくとも1つを含む。

20

【0184】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、AVIRE RT、KORV RT、およびWMSV RTに基づく五変異体バリエーションRT配列を含むことができ、配列番号243~245のバリエーション、または配列番号243~245のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を包含でき、AVIRE RTは、残基199N、305K、312F、329P、および604Wを含み、KORV RTは残基197N、303K、310F、327P、および599Wを含み、WMSV RTは残基197N、303K、311F、327P、および599Wを含む。

30

【0185】

また他の態様において、本明細書において開示されるプライムエディターシステムまたは融合タンパク質の操作されたRTドメインは、Tfl-rat4(配列番号251)、Tflevo3.1(配列番号252)、Tflevo+rat-1(配列番号254)、Tflevo+rat2(配列番号255)、Ec48-v2(配列番号256)、Ec48-evo3(配列番号257)のバリエーションRT配列、または配列番号251~257のいずれかと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは少なくとも99.5%、もしくは最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得るが、ただし、配列は、本開示において提供されるアミノ酸置換のうちの少なくとも1つを含むことを条件とする。

40

【0186】

他の態様において、本開示は、配列番号1の核酸配列によってコードされてもよく、本明細書において開示されるバリエーションCas9ドメインまたはバリエーションRTドメインのいずれか1つで改変され得る、配列番号2のPEmaxを包含するプライムエディター融合タンパ

50

ク質を包含する、改善されたプライムエディターおよびプライムエディターシステムについて記載する。本開示はまた、配列番号2～8の融合タンパク質、ならびに配列番号9～32の進化した核酸プログラム型DNA結合タンパク質および配列番号33～46、48、49、51～53、55～57、59、60、63～78、185、216、222、228、239および241の逆転写酵素を含む融合タンパク質を包含する、他の改善されたプライムエディターバリエーションを提供する。本開示はまた、配列番号2および配列番号3～8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%、または少なくとも最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する融合タンパク質を企図する。本開示はまた、配列番号9～32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%、または少なくとも最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する進化した核酸プログラム型DNA結合タンパク質を企図する。さらに、本開示は、配列番号33～46、48、49、51～53、55～57、59、60、63～78、185、216、222、228、239、および241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%、または少なくとも最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する逆転写酵素を企図する。

10

【0187】

加えて、本明細書は、本明細書に記載されている進化したおよび/または改変されたプライムエディターをコードおよび/または発現する核酸分子、ならびに本明細書に記載の進化したおよび/または改変されたプライムエディターを発現するための発現ベクターまたは構築物、該核酸分子および発現ベクターを含む宿主細胞、ならびに本明細書に記載の核酸に基づく態様を送達および/または投与するための組成物を提供する。加えて、本開示は、本明細書に記載されている、単離された進化したおよび/または改変されたプライムエディター、ならびに該単離された進化したおよび/または改変されたプライムエディターを含む組成物を提供する。よりさらに、本開示は、進化したおよび/または改変されたプライムエディターを作製する方法、ならびに核酸分子、例としてゲノムを編集することを包含する用途において、進化したおよび/または改変されたプライムエディターまたは進化したおよび/または改変されたプライムエディターをコードする核酸分子を、最新技術を形成するプライムエディターと比較して、好ましくは配列文脈に依存しない様式で(すなわち、所望の編集部位は特定の配列コンテキストを必要としない)改善された効率で使用するを提供する。態様において、本明細書において提供する作製する方法は、プライムエディター(例として、Cas9ドメインまたは逆転写酵素ドメイン)の1つ以上の構成成分を進化させるために利用されてもよい改善されたファージ支援連続進化(PACE)システムである。本明細書はまた、好ましくは配列文脈に依存しない様式で、本明細書に記載のプライム編集システム(例として、本明細書に記載されている単離された進化したおよび/または改変されたプライムエディターまたはそれをコードするベクターもしくは構築物の形態で)を用いて、標的核酸分子、例として、ゲノムの単一核酸塩基を効率的に編集し、プライム編集を行うための方法を提供する。よりさらに、本明細書は、標的核酸分子、例としてゲノムを、プライム編集システム(例として、単離された進化したおよび/または改変されたプライムエディタータンパク質またはそれをコードするベクターの形態で)と接触させ、プライム編集を行って、遺伝的疾患を処置するおよび/または遺伝的形質(例として、目の色)を変化させることによって、遺伝的疾患を処置する、および/または遺伝的形質もしくは状態を変更するもしくは変化させるための治療方法を提供する。

20

30

40

【0188】

したがって、本開示は、プライム編集によって核酸分子を編集するための方法であって、核酸分子を改変されたプライムエディターおよびpegRNAと接触させ、それによって編集効率を高め、および/またはインデル形成を低下させて、標的部位に核酸分子に対する1つ以上の改変をインストールすることに関与する方法を提供する。本開示は、改変napDNAbpおよび/またはポリメラーゼドメインを含む改変されたプライムエディタータン

50

パク質をコードする核酸配列を含むプライム編集によってDNA標的部位を編集するためのポリヌクレオチドであって、napDNABpおよびポリメラーゼドメインが、pegRNAの存在下で、編集効率を高め、および/またはインデル形成を低下させて、DNA標的部位に1つ以上の改変をインストールすることが可能である、ポリヌクレオチドをさらに提供する。本開示は、本開示の組成物およびポリヌクレオチドを含むベクター、細胞およびキット、ならびにこのようなベクター、細胞およびキットを作製する方法、ならびにこのような組成物、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞およびキットをin vitro、ex vivo(例として、体外の細胞を改変する細胞ベースの治療中に)およびin vivoで細胞に送達する方法をさらに提供する。

【0189】

改変されたプライムエディター

本開示は、以下に限定されないが、PEmaxなどの改変されたプライムエディターおよびプライムエディター融合タンパク質を提供し、napDNABpドメインおよびRTドメインの一方または両方が本明細書において開示される操作されたCas9またはRTバリエーションの1つと置き換えられたPEmaxのバリエーションをさらに包含できる。

【0190】

一態様において、改変されたプライムエディター融合タンパク質は、PEmax(配列番号2)、または配列番号2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%、もしくは少なくとも最大100%の配列同一性を有するアミノ酸配列である。PEmaxは、配列番号2のアミノ酸配列および配列番号1の核酸配列を有する。

【0191】

PEmax(配列番号2の)は、N末端からC末端に向かって、(a)双節型SV40 NLSドメイン(配列番号95)、(b)該配列に対してR221K、N394KおよびH840Aでアミノ酸置換を有する配列番号10の野生型SpCas9に基づくSpCas9、(c)リンカー配列、(d)該配列に対してD200N T306K W313F T330P L603Wでアミノ酸置換を有する配列番号33の野生型MMLV RTに基づくジェンスクリプトのコード最適化MMLV RT五変異体、(e)リンカー、(f)双節型SV40 NLSドメイン、(g)リンカー、および(h)c-Myc NLSドメインを包含する。これらのアミノ酸配列は、以下のように提供される:

配列番号2のPEmax構成成分の配列:

⇒双節型SV40 NLS

MKRTADGSEFESPCKKKRKV(配列番号95)

⇒SpCas9 R221K N394K H840A

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSPKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA
EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHAHMIKFRGHFLIEGDL
NPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKILSARLSKSRKLENLIAQLPGE
KKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADL
FLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQQLPEKY
KEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIPILEKMDGTEELLVKLKREDLLRKQRTF
DNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFA
WMTRKSEETITPWNFEVVDKGSASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYEFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFD
SVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEER
LPTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVK
VMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQL
QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTTRSDKN
RGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR
QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVR

10

20

30

40

50

EINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKAT
AKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQ
VNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAK
VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFE
NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHK
HYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPA
AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号11)

⇒リンカー=(SGGSx2-双節型SV40 NLS-SGGSx2):

SGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSS (配列番号79)

⇒ジェンスクリプトのコドン最適化 MMLV RT五変異体(D200N T306K W313F T33
OP L603W)

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPKATST
PVS IKQYPMSQEARLG IKPHIQRL LDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQD
LREV NKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFE
WRDP EMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLL
LAATSELD CQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEA
RKETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPD
QQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLT KPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYL
SKKLD PVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDR
WLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC LDILAEAHGTR
PD LTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETETEV I WAKALPAGTSAQRAE
LIALTQALKMAEGKKLN VYTD SRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILAL
LKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番号34)

⇒他のリンカー配列

SGGS (配列番号81)

⇒双節型SV40 NLS

KRTADGSEFESPKKKRKV (配列番号97)

⇒他のリンカー配列

GSG (配列番号82)

⇒c-Myc NLS

PAAKRVKLD (配列番号98)

【0192】

本明細書において企図されるプライムエディターは、一部の態様において、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)および逆転写酵素ドメイン(RT)が、それらのプライム編集機能を行う目的のDNA編集部位に別々に局在化および/または標的化することが可能であるようにトランスで提供されるシステムを含む。他の態様において、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)および逆転写酵素ドメイン(RT)は、融合タンパク質として提供される。

【0193】

核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)および逆転写酵素ドメイン(RT)が融合タンパク質の形態で提供されるこれらの態様において、本明細書において開示される改変されたプライムエディターは、いずれかの好適な構造構成を含んでもよい。例えば、融合タンパク質は、N末端からC末端方向に、napDNAbpをポリメラーゼ(例として、DNA依存性DNAポリメラーゼまたはRNA依存性DNAポリメラーゼ、例えば逆転写酵素)に融合されて含んでもよい。他の態様において、融合タンパク質は、N末端からC末端方向に、ポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)をnapDNAbpに融合させて含んでもよい。融合したドメインは、リンカー、例としてアミノ酸配列によって任意に接合されてもよい。他の態様において、融合タンパク質は構造NH₂-[napDNAbp]-[ポリメラーゼ]-COOH;またはNH₂-[ポリメラーゼ]-[napDNAbp]-COOHを含んでもよく、「」-「」の

10

20

30

40

50

それぞれの例は任意のリンカー配列の存在を示す。ポリメラーゼが逆転写酵素である態様において、融合タンパク質は構造 NH_2 -[napDNAbp]-[RT]- COOH ;または NH_2 -[RT]-[napDNAbp]- COOH を含んでもよく、「」-「」のそれぞれの例は任意のリンカー配列の存在を指示する。

【0194】

様々な態様において、改変されたプライムエディターはPE1に基づいてよく、PE1の1つ以上の構成成分は、バリエーションドメインで置換されている。例えば、PE1 SpCas9ドメインは、改変SpCas9ドメインと交換されてもよい。または、RTドメインは、改変されたRTドメイン(例として、コドン最適化バリエーション)と交換されてもよい。

【0195】

PE1は、H840A突然変異(すなわち、Cas9ニッカーゼ)およびM-MLV RT野生型、ならびにCas9ニッカーゼドメインのC末端をRTドメインのN末端に結合するN末端NLS配列(19アミノ酸)およびアミノ酸リンカー(32アミノ酸)を含むCas9バリエーションを包含する。PE1融合タンパク質は以下の構造を有する:[NLS]-[Cas9(H840A)]-[リンカー]-[MMLV_RT(wt)]。PE1およびその個々の構成成分のアミノ酸配列は以下の通りである:

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

説明	配列
PE1融合タンパク質	<u>MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKV</u>
CAS9(H840A)-MM	<u>PSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRR</u>
LV_RT(WT)	<u>YTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHER</u>
	<u>HPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLLIYLALA</u>
	<u>HMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINA</u>
	<u>SGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLG</u>
	<u>LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFL</u>
	<u>AAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK</u>
	<u>ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL</u>
	<u>EKMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAIL</u>
	<u>RRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR</u>
	<u>KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK</u>
	<u>HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLF</u>
	<u>KTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD</u>
	<u>LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAH</u>
	<u>LFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLK</u>
	<u>SDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA</u>
	<u>GSPAIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQ</u>
	<u>KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY</u>
	<u>YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLT</u>
	<u>RSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL</u>
	<u>TKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKY</u>
	<u>DENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDA</u>
	<u>YLNNAVGTALIKKYPKLESEFVYGDKVYDVRKMIKSEQEIG</u>
	<u>KATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD</u>
	<u>KGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDK</u>
	<u>LIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVK</u>
	<u>ELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIHKLPKYSLFEL</u>
	<u>ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSP</u>
	<u>EDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLSA</u>
	<u>YNKHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS</u>
	<u>TKEVLDATLIHQSTGLYETRIDLSQLGGDSSGGSSGGSSGSETPG</u>
	<u>TSESATPESSGGSSGGSSTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFP</u>
	<u>QAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQR</u>

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

説明	配列
	LLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPT VPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPE MGISGQLTWRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHDPDLILLQYVD DLLLAATSELDCCQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLL KEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAFCRLWIPGFAEM AAPLYPLTKTGTLFNWGPDDQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELF VDEKQGYAKGVLTQKLGWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIA VLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLL DTRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCILDILAEAHGTRPDLTDP LPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETETEVIAKALPAGTSAQRAE LIALTQALKMAEGKKLVYTDSTRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKN KDEILALLKALFLPKRLSHHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAIT ETPDTSTLLIENSSPSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (配列番号 3) 符号: 核局在化配列(NLS) 上:(配列番号 95)、下:(配列番号 96) CAS9(H840A) (配列番号 10) 33-アミノ酸リシンカー(配列番号 80) M-MLV 逆転写酵素 (配列番号 33)
PE1 - N-末端NLS	MKRTADGSEFESPKKKRKV (配列番号 95)
PE1 - CAS9 (H840A) (METマイ ナス)	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVD DSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKK LVDSSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQL VQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKN GLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQ IGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYK FIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS EETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLY EYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVT VKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFL DNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRR RYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFQMQLIHDD SLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL VKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELG SQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTNRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELDAKAGFIKRQLVETRQIT KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYKLESEFVYGDYKVYDVR KMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNG ETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVIVKKTEVQTGGFSKESILPK RNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLLK SVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLLASHYEKLKGPED

10

20

30

40

【表 2 - 3】

説明	配列
	NEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH DKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 10)
CAS9ドメインと RTドメインとの 間のPEI-リンカ ー(33アミノ酸)	SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS (配列番号 80)
PEI-M-MLV RT	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQ APLIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPW NTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLP PSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPENGISGQLTWT RLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLAATSE LDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQ RWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAP LYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIQALLTAPALGLPDLTKPFELFV DEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVA AIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTH YQALLLDTRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGT RPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAK ALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTDSDRYAFATAHIIHGEI YRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQKGHSA EARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番号 33)
PEI-C-末端NLS	SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (配列番号 96)

10

20

【0196】

様々な他の態様において、改変されたプライムエディタータンパク質は、PE2に基づ
くことができ、PE2の1つ以上の構成成分は、バリエーションドメインで置換されてもよい。
例えば、PE2 SpCas9ドメインは、改変SpCas9ドメインと交換されてもよい。または
、PE2のRTドメインは、改変されたRTドメイン(例として、コドン最適化バリエーション)と
交換されてもよい。

30

【0197】

PE2は、H840A突然変異(すなわち、Cas9ニッカーゼ)を含むCas9バリエーションならび
に突然変異D200N、T330P、L603W、T306K、およびW313Fを含むM-MLV RT、
ならびにCas9ニッカーゼドメインのC末端をRTドメインのN末端に接合させるN末端NL
S配列(19アミノ酸)およびアミノ酸リンカー(33アミノ酸)を包含する。PE2融合タンパ
ク質は以下の構造を有する: [NLS] - [Cas9(H840A)] - [リンカー] - [MMLV_RT(
D200N)(T330P)(L603W)(T306K)(W313F)]。PE2のアミノ酸配列は以下の通り
である:

40

【表 3 - 1】

PE2融合タンパ ク質	MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPS KKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRR KNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNI VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLLIYLALAHMIKFRGHF LIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSAR
CAS9(H840A)- MMLV_RT	

50

【表 3 - 2】

D200N T330P L603W T306K W313F	LSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDA KLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRV NTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQ SKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIPLEKMDGTEELLVKLNREDLLR KQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTR IPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIE RMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPA FLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE DRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREM IEERLKTIAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIIKGILQTVKYVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQ TTQKGQKNSRERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYL YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTR SDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKA ERGLSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDK LIREVKVITLKSILVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEJGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY GGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNP IDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDE HIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLT NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDL S <u>QLGGDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS</u><u>TLNIEDEYRLH</u> <u>ETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIHPLKATSTPVS</u><u>IKQ</u> <u>YPMSEQEARLGIPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQD</u> <u>LREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLRHLPTSQ</u> <u>PLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHP</u> <u>DLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQV</u> <u>KYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPG</u> <u>FAEMAAPLYPLIKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLT</u><u>KPFE</u> <u>LFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAAGWPPCLRMVAAIAV</u> <u>LTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLD</u><u>TD</u> <u>RVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC</u><u>LDILAEAHGTRPD</u><u>LTQPLPDADH</u> <u>TWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVITETET</u><u>EWAKALPAGTSAQRAELIALTQALK</u> <u>MAEGKKLNYYTDSRYAFATAHIGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKA</u> <u>LFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENS</u> <u>SPSGGSKRTADGSEFEPKKRKV</u> (配列番号 4) 符号: 核局在化配列(NLS) 上:(配列番号 95)、下:(配列番号 96) CAS9(H840A) (配列番号 10) 33-アミノ酸リシカー (配列番号 80) M-MLV 逆転写酵素 (配列番号 34)
PE2 - N-末端 NLS	MKRTADGSEFESPKKKRKV (配列番号 95)

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

PE2 - CAS9 (H840A) (MET マイナス)	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGA LLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFH RLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDK ADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDFIQLVQTYNQLF ENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDYYDDLDNLLAQIGDQYADFLAAKN LSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKN REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKIL TFRIPYYVGPLARGNSRFWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIE RMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLS GEQKKAIVDLLFKTNRKVTYKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNA SLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAICK GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVEMARENQTTQKGQKNSRERM RIEEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDIN RLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTSDKNRGKSDNVPSEEVVKM KNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQI TKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKV REINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV WDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTVEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIA RKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGSKKLLKSVKELLGITIM ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIJKLPKYSLFELENGRKRMLASAG ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHY LDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLT NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIITGLYETRIDLSQLG GD (配列番号 10)	10
CAS9ドメイン とRTドメイン との間の PE2 - リンカー (33ア ミノ酸)	SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS (配列番号 80)	20
PE2 - MMLV_RT D200N T330P L603W T306K W313F	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPL IPLKATSTPVSIIKQYPMSQEARLGKPHIQRLDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREVNRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYT VLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSP TLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLAATSELDCQQGTRALLQ TLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVMGQ PTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQ QKAYQEIQQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPW RRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILA PHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTRVQFGPVVALNPATLL PLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTQPLPDADHTWYTDGSSLLQEG QRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLN	30
		40

【表 3 - 4】

	VYTDSRYAFATAHIIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKR LSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番号 34)
PE2 - C-末端 NLS	SGGSKRTADGSEFEPKKRKV (配列番号 96)

さらに他の態様において、本明細書において開示される改変されたプライムエディタータンパク質は、他のプライムエディタータンパク質配列に基づく場合があり、ここで、このような融合の1つ以上を超える構成成分は、バリエーションドメインで置換される。このような開始点プライムエディタータンパク質は、以下を包含してもよい：

【表 4 - 1】

PE融合タンパク質	<u>MKRTADGSEFESPKKKRKVTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKP</u>
MMLV_RT(WT)-32A	<u>HIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVE</u>
A-CAS9(H840A)	<u>DIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLCLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFE</u>
	WRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSTLFDLALHRLADFRIQHPDLI
	LLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQ
	VKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAFCRL
	WIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLP
	DLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGW
	PPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLS
	NARMTHYQALLDTRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCILDILA
	EAHGTRPDLTQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVITETEV
	WAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVTDSRYAFATAHIHG
	EIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQKGHSA
	EARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP <u>SGGSSGGSSGSETP</u>
	<u>GTSESATPESSGGSSGGSSDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYK</u>
	VPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
	RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLVESFLVEEDKK
	HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIY
	LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE
	NPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI
	ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGD
	QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH
	HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQE
	EFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQ
	IHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYVVGPLAR
	GNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKKGASAQSFIERMTNFD
	KNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLS
	GEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE
	DRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFED
	REMIERLKTIAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLING
	IRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQ
	VSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDLVKVMGRH
	KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGKELGSQILK
	EHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV
	DAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMK
	NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLV
	ETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSD

10

20

30

40

【表 4 - 2】

	FRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESE FVYGDYKVVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEI TLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQV NIVKKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF DSPTVAYSVLVVAKEKKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKN PIDFLEAKGYKEVKKDLIHKLPKYSLFELNGRKRMLASAGEL QKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQA ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKRKV (配列番 号 5) 符号: 核局在化配列(NLS) 上:(配列番号 95)、下:(配列番号 96) CAS9(H840A) (配列番号 10) 33-アミノ酸リンカー(配列番号 80) M-MLV 逆転写酵素(配列番号 33)	10
PE融合タンパク質 MMLV_RT(WT)- 60AA-CAS9(H840A)	MKRTADGSEFESPKKKRKVTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLS DPQAWAETGGMGLAVRQAPLIHPLKATSTPVSQKYPMSQEARLGK HIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNRVE DIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDFAFFCLRLHPTSQPLFAFE WRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSTPLFDEALHRDLADFRIQHPDLI LLQYVDDLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQ VKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAFCRL WIPGFAEMAAPLYPLTKTGLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLP DLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAW PPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLS NARMTHYQALLDTRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILA EAHGTRPDLTQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTEVI WAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKNVYTDSTRYAFATAHIG EIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQKQHS EARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSPSSGGSSGSGSETP GTSESATPESAGSYPDVDPYAGSAAPAAKKKKLDGSGSGSS GGSDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQ EIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI EGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNF DLAEDAKLQLSKD TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSD AILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ QLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMD GTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQE DFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSE ETITPWNFEEVVDKGASASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSL LYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKT NRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL KIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHL FDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFL	20 30 40

【表 4 - 3】

	KSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIAN LAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQ TTQKGQKNSRERMKRIIEGIGELGSQILKEHPVENTQLQNEK LYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSID NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ RKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIE TNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFS KESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAVK EKGKSKKLKSVKELGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKK DLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF LYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSK RVILADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLG GDSGGSKRTADGSEFEPKKRKY (配列番号 6) 符号: 核局在化配列(NLS) 上:(配列番号 95)、下:(配列番号 96) CAS9(H840A)(配列番号 10) アミノ酸リンカー(配列番号 83) M-MLV 逆転写酵素 (配列番号 33)	10
PE融合タンパク質	MKRTADGSEFESPKKKRKYVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEY KVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTA RRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDK KHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADRLI YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF ENPINASGVDAKAIL SARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGN LIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLNLLAQIG DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYE HHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPH QIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNF DKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFL SGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV EDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLE DREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLIN GIRDKQSGKTILDFLKS DGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKA QVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGR HKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIIEGIGELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKM KNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ LVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLV SDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLE SEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFK TEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMP	20
CAS9(H840A)-FEN1- MMLV_RT D200N T330P L603W T306K W313F		30
		40

【表 4 - 4】

	QVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYG GFDSPTVAYSVLVVAKEVEKSKKLKSVKELLGITIMERSSE KNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASA GELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFV EQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD KPIR EQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATL IHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPES SGSSGGSSGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSI YQFLIAVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIPVY VFDGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKFT KRLVKVTKQHNDCKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVKAGK VYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSRILQELG LNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSIEEIVRRLD PNKYPPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPEVELKWSEPNEEELIKF MCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLLDDFFKVTGSLSSAK RKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKRGKSGGSSGGSSGSETPGTSE SATPESSGGSSGGSSTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQA WAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRL LDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREV NKRVEDIHPT VPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDP EMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQY VDDL LLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYL GYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIP GFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQOKAYQEIKQALLTAPALGLPDL TKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAAGWPP CLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNA RMTHYQALLLDTRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC LDILAEA HGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWA KALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVTDSRYAFATAHIHGEIY RRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEA RGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSPSGGSKRTADGSEFEPKK KRKV (配列番号 7) 符号: 核局在化配列(NLS) 上:(配列番号 95)、下:(配列番号 96) CAS9(H840A) (配列番号 10) 33-アミノ酸リンカー1 (配列番号 80) <i>M-MLV 逆転写酵素</i> (配列番号 34) 33-アミノ酸リンカー2 (配列番号 80) FEN1 (配列番号 111)

10

20

30

40

【0199】

さらに他の態様において、本開示で使用されるプライムエディターはPEmaxを含み得る。PEmaxは、以下の構造を有するCas9(R221K N39K H840A)およびバリエーションM MLV RT五変異体(D200N T306K W313F T330P L603W)を含む複合体である: [双節型NLS] - [Cas9(R221K)(N394K)(H840A)] - [リンカー] - [MMLV_RT(D200N)(T330P)(L603W)] - [双節型NLS] - [NLS] + 所望のPEgrRNA、ここで、PE融合体は、以下に示される配列番号2のアミノ酸配列を有する。

50

【表 5 - 1】

PEmax融合タンパク質 [双節型NLS]- [Cas9(R221K)(N394K) (H840A)]-[リンカー]- [MMLV_RT(D200N) (T330P)(L603W)]-[双 節型NLS]-[NLS]	MKRTADGSEFESPKKKRKVDDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDE YKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLK RTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLV EEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDK ADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQ TYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRKLENLIAQLPGE KKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAQLQSKD TYDD DLDNLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK NGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLKRED LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREK IEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEV VDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYEFTVYN ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVK QLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDK DFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDK VMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANL AGSPAIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIEMARENQ TTQKGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNE KLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDD SIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAK LITQRKFDNLTKAERGGLSELDAKAGFIKRQLVETRQITKHV AQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF YKVINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDY KVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLAN GEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIV KKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD PKKYGGFDS PTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKN PIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFEL ENGRKRMLASAG ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFV EQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKP IREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGSKRTADGSEF ESPKKKRKVSGGSSGGSTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWL SDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTPVSIKQYPMSQEA RLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQD LREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVL DLKDAFFC LRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNE ALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLAATSELDCQQGTRALL QTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKE TVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKP GTLFNWGPDQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEK QGYAKGVLTKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVA AIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNAR MTHYQALLLDTRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC LDIL AEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT

10

20

30

40

50

【表 5－2】

	TETEVWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDS RYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPK RLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLI ENSSPSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVGSGPAARKVKLD (配列番 号 2) 符号: <u>双節型SV40 核局在化配列(NLS)</u> 上: (配列番号 95)、下: (配列番号 97) CAS9(R221K N394K H840A) (配列番号 11) <u>SGGSx2-双節型SV40NLS-SGGSx2 リンカー</u> (配列番号 79) M-MLV 逆転写酵素(D200N T306K W313F T330P L603W) (配列番号 34) <u>他のリンカー配列</u>(配列番号 81 および 82) <u>C-MYC NLS</u> (配列番号 98)

10

【0200】

様々な態様において、本明細書において企図される方法および組成物において利用されるプライムエディタータンパク質は、本明細書において開示されるプライムエディター配列と少なくとも約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%同一であるアミノ酸配列を有する上で開示される配列のいずれかのバリエントを包含してもよい。

20

【0201】

napDNABpドメインおよびその改変バリエント

様々な態様において、PEmaxを包含する本明細書において開示される改変されたプライムエディタータンパク質は、核酸プログラム可能DNA結合タンパク質(napDNABp)を含む。

30

【0202】

様々な態様において、改変されたプライムエディタータンパク質は、例えば配列番号9のカノニカルなStreptococcus pyogenesのCas9配列を包含する野生型Cas9配列を有するnapDNABpドメインを含んでもよい。

【0203】

他の態様において、改変されたプライムエディタータンパク質は、例えば、以下に示すように、野生型SpCas9に対してH840A置換を有する配列番号12のStreptococcus pyogenesのCas9のニッカーゼバリエント(配列番号9の)を包含する改変されたCas9配列を有するnapDNABpドメインを含んでもよい。

40

【表 6】

Cas9ニッカー ゼ <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> Q99ZW2 Cas9(H840A を含む)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTIAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGELSEDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRP LIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDA TLHQSI TGLYETRIDLSQLGGD	配列番号 12

10

20

30

【0204】

一態様において、「PEmax」と呼ばれるプライムエディターのnapDNAbp構成要素またはドメインは、以下の置換:R221K、N394K、およびH840Aを有する配列番号9のカノニカルなSpCas9アミノ酸配列に基づく以下のアミノ酸配列を含む。

40

SpCas9 R221K N394K H840A:

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLKREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT

50

VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFD
SVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEER
LKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVK
VMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQL
QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN
RGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR
QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVR
EINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIASEQEIGKAT
AKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQ
VNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAK
VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFE
NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGGSPEDNEQKQLFVEQHK
HYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPA
AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD(配列番号11)

10

20

30

40

50

【0205】

改変されたプライムエディタータンパク質は、編集効率の改善をもたらすnapDNABp(例として、Cas9)ドメイン中の1つ以上の突然変異をさらに含んでもよい。例えば、本開示は、PACEを使用する改善されたプライムエディタータンパク質の開発について記載する。一部の態様において、プライムエディター(例として、融合タンパク質、またはnapDNABpおよび逆転写酵素がトランスで提供されるプライムエディター)は、D23G、H99Q、H99R、E102K、E102S、E102R、N175K、D177G、K218R、N309D、I312V、E471K、G485S、K562N、D608N、I632V、D645N、D645E、R654C、G687D、G715E、H721Y、R753K、R753G、H754R、K775R、E790K、T804A、K918A、K1003R、M1021Y、E1071K、およびE1260Dからなる群から選択される配列番号9に対する1つ以上の突然変異を含むCas9バリエーションを含む。一部の態様において、このようなCas9バリエーションは単一の突然変異を含み、単一の突然変異は、D23G、H99Q、H99R、E102K、E102S、E102R、N175K、D177G、K218R、N309D、I312V、E471K、G485S、K562N、D608N、I632V、D645N、D645E、R654C、G687D、G715E、H721Y、R753K、R753G、H754R、K775R、E790K、T804A、K918A、K1003R、M1021Y、E1071K、およびE1260Dから選択される。一部の態様において、Cas9バリエーションはR753G突然変異を含む。ある特定の態様において、Cas9バリエーションは、H721Y突然変異およびR753G突然変異;E102K突然変異およびR753G突然変異;またはE102K突然変異、H721Y突然変異、およびR753G突然変異を含むある特定の態様において、Cas9バリエーションは、配列番号178~180のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0206】

一部の態様において、本明細書に記載の組成物および方法において使用される改善されたプライムエディタータンパク質は、*Streptococcus pyogenes*由来の野生型Cas9のアミノ酸配列に対して、位置R753X(式中、Xはいずれかのアミノ酸である)における突然変異を含む:

【表 7】

説明	配列	配列番号
SpCas9 <i>Streptococcus pyogenes</i> (R753Xを含 み、「X」は いずれかの アミノ酸で ある)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGN TDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRR KNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKH ERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADL RLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQ TYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQL PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDI LRVNTETTKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEK MDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTN FDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGM RKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKI ECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEE NEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMK QLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDG FANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIA NLAGSPAIIKKGILQTVKVVDLVKVMGXHKPENIVIE ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGKELGSQILKEHPV ENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEV VKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDK LIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHD AYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA KSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLI ETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPT VAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRML ASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPED NEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKV LSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDT TIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD	13

10

20

30

【0207】

一部の態様において、R753X突然変異は、R753G突然変異である。

40

50

【表 8】

説明	配列	配列番号
SpCas9 <i>Streptococcus pyogenes</i> (R753Gを含む)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGN TDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRR KNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKH ERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADL RLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVVDKLFQVLVQ TYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQL PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDI LRVNTTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEK MDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTN FDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGM RKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKI ECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEE NEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMK QLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDG FANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIA NLAGSPAIKKGILQTVKVVDLVKVMGGHKKPENIVIE MARENQTTQKGQKNSRERMKRIIEGIKELGSQILKEHP VENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE VVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSE LDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEND KLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAH DAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRP LIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTE VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSP TVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSE KNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKR LASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPE DNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDK VLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYF DTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLG GD	配列番号 14

10

20

30

【0208】

本明細書に記載の方法および組成物において利用される改善されたプライムエディタータンパク質は、上記の改変Cas9配列のいずれか、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そのいずれかのバリエーションを含んでもよいが、ただし、バリエーションは、本明細書において提供されるアミノ酸置換の1つを含むことを条件とする。本明細書に記載のタンパク質はまた、アミノ酸配列の関連する位置にR753XまたはR753Gに対応する突然変異を含むいずれかのCas9タンパク質(例として、以下に記載のものを包含する)を包含してもよい。

40

【0209】

本開示は、本明細書に記載の突然変異の1つ以上(すなわち、R221K、N394K、R753Gおよび/またはH840A)を用いた当技術分野で公知のいずれかのCas9タンパク質の改変

50

、および本明細書に記載のPEmax構成特徴の1つ以上(例として、最適化されたMMLV RT五変異体、NLS、リンカーなど)を用いたいずれかの改変Cas9タンパク質の組合せを企図する。

【0210】

一部の態様において、本明細書に記載の改善されたプライムエディタータンパク質は、対応するアミノ酸位置において本明細書に記載の1つ以上の突然変異により改変されてもよい以下の他の野生型SpCas9配列のいずれかを包含する：

【表9-1】

説明	配列
SpCas9 <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> MGAS1882野生 型 NC_017053.1	ATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCACAAATAG CGTCGGATGGGCGGTGATCACTGATGATTATAAGGTTCCGTCCTAA AAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACAGACCGCCACAGTATCAAAA AAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGGCAGTGGAGAGACAGCGG AAGCGACTCGTCTCAAACGGACAGCTCGTAGAAGGTATACACGTC GGAAGAATCGTATTTGTTATCTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGA TGGCGAAAGTAGATGATAGTTTCTTTTCATCGACTTGAAGAGTCTT TTTTGGTGGAAAGAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCCTATTTTTG GAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATATCCAACCTA TCTATCATCTGCGAAAAAAATTGGCAGATTCTACTGATAAAGCGG ATTTGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTAAGTTTCG TGGTCATTTTTGATTGAGGGAGATTTAAATCCTGATAATAGTGAT GTGGACAAACTATTTATCCAGTTGGTACAAATCTACAATCAATTA TTTGAAGAAAACCTATTAACGCAAGTAGAGTAGATGCTAAAGC GATTCTTTCTGCACGATTGAGTAAATCAAGACGATTAGAAAATCT CATTGCTCAGCTCCCCGGTGAGAAGAGAAATGGCTTGTTTGGGAA TCTCATTGCTTTGTCATTGGGATTGACCCCTAATTTTAAATCAAAT TTTGATTGGCAGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAGATACT TACGATGATGATTTAGATAAATTTATTGGCGCAAATTGGAGATCAA TATGCTGATTTGTTTTTGGCAGCTAAGAATTTATCAGATGCTATTT TACTTTTCAGATATCCTAAGAGTAAATAGTGAAATAACTAAGGCTC CCCTATCAGCTTCAATGATTAAGCGCTACGATGAACATCATCAAG ACTTGACTCTTTTAAAAGCTTTAGTTTCGACAACAACCTCCAGAAA AGTATAAAGAAATCTTTTTTGATCAATCAAAAAACGGATATGCAG GTTATATTGATGGGGGAGCTAGCCAAGAAGAATTTTATAAATTTA TCAAACCAATTTTAGAAAAAATGGATGGTACTGAGGAATTATTGG TGAAACTAAATCGTGAAGATTTGCTGCGCAAGCAACGGACCTTTG ACAACGGCTCTATTTCCCATCAAATTCCTTGGGTGAGCTGCATG CTATTTTGAGAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTAAAAGACA ATCGTGAGAAGATTGAAAAAATCTTGACTTTTTCGAATTCCTTATT ATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTGCATGGATGA CTCGGAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAATTTTGAAGAAG TTGTGATAAAGGTGCTTCAGCTCAATCATTATTGAACGCATGA CAAACCTTGATAAAAAATCTTCAAATGAAAAAGTACTACCAAAC ATAGTTTGCTTTATGAGTATTTTACGGTTTATAACGAATTGACAAA GGTCAAATATGTTACTGAGGGAATGCGAAAACCAGCATTTCTTTC AGGTGAACAGAAAGAAAGCCATTGTTGATTTACTCTTCAAAACAAA TCGAAAAGTAACCGTTAAGCAATTAAGAAGATTATTTCAAAA AAATAGAATGTTTTGATAGTGTGAAATTTTCAAGGAGTTGAAGATA GATTTAATGCTTCATTAGGCGCCTACCATGATTTGCTAAAAATTAT TAAAGATAAAGATTTTTTGGATAATGAAGAAAATGAAGATATCTT AGAGGATATTGTTTTAACATTGACCTTATTTGAAGATAGGGGGAT GATTGAGGAAAGACTTAAAAACATATGCTCACCTCTTTGATGATAA GGTGATGAAACAGCTTAAACGTCGCCGTTATACTGGTTGGGGACG TTTGTCTCGAAAATTGATTAATGGTATTAGGGATAAGCAATCTGG CAAAACAATATTAGATTTTTTGAATCAGATGGTTTTGCCAATCG CAATTTTATGCAGCTGATCCATGATGATAGTTTGACATTTAAAGA AGATATTCAAAAAGCACAGGTGTCTGGACAAGGCCATAGTTTACA TGAACAGATTGCTAACTTAGCTGGCAGTCCTGCTATTAATAAAGG TATTTTACAGACTGTAAAAAATTGTTGATGAACTGGTCAAAGTAAT

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

	GGGGCATAAGCCAGAAAATATCGTTATTGAAATGGCACGTGAAA ATCAGACAACTCAAAAGGGCCAGAAAAATTCGCGAGAGCGTATG AAACGAATCGAAGAAGGTATCAAAGAATTAGGAAGTCAGATTCT TAAAGAGCATCCTGTTGAAAATACTCAATTGCAAAATGAAAAGCT CTATCTCTATTATCTACAAAATGGAAGAGACATGTATGTGGACCA AGAATTAGATATTAATCGTTTAAAGTGATTATGATGTGATCACAT TGTTCCACAAAGTTTCATTAAGACGATTCAATAGACAATAAGGT ACTAACGCGTTCTGATAAAAAATCGTGGTAAATCGGATAACGTTCC AAGTGAAGAAGTAGTCAAAAAGATGAAAACTATTGGAGACAAC TTCTAAACGCCAAGTTAATCACTCAACGTAAGTTTGATAATTTAA CGAAAGCTGAACGTGGAGGTTTGAGTGAACCTTGATAAAGCTGGTT TTATCAAACGCCAATTGGTTGAAACTCGCCAAATCACTAAGCATG TGGCACAAATTTTGGATAGTCGCATGAATACTAAATACGATGAAA ATGATAAACTTATTCGAGAGGTTAAAGTGATTACCTTAAATCTA AATTAGTTTCTGACTTCCGAAAAAGATTTCCAATTCATAAAGTAC GTGAGATTAAACAATTACCATCATGCCCCATGATGCGTATCTAAATG CCGTCGTTGGAAGTGCCTTGATTAAAGAAATATCCAAAAGTTGAAT CGGAGTTTGTCTATGGTGATTATAAAGTTTATGATGTTTCGTAAAT GATTGCTAAGTCTGAGCAAGAAATAGGCAAGCAACCGCAAAAT ATTTCTTTTACTCTAATATCATGAACCTTCTTCAAAACAGAAATTAC ACTTGCAAATGGAGAGATTTCGCAAACGCCCTCTAATCGAAACTAA TGGGGAAACTGGAGAAATTGTCTGGGATAAAGGGCGAGATTTTG CCACAGTGCACAAAGTATTGTCCATGCCCCAAGTCAATATTGTCA AGAAAACAGAAGTACAGACAGGCGGATTCTCCAAGGAGTCAATT TTACCAAAAAGAAATTTCGACAAAGCTTATTGCTCGTAAAAAAGAC TGGGATCCAAAAAATATGGTGGTTTTGATAGTCCAACGGTAGCT TATTCAGTCCTAGTGGTTGCTAAGGTGGAAAAAGGGAAATCGAA GAAGTTAAATCCGTTAAAGAGTTACTAGGGATCACAATTATGGA AAGAAGTTCCTTTGAAAAAATCCGATTGACTTTTTAGAAAGCTAA AGGATATAAGGAAGTTAAAAAGACTTAATCATTAAACTACCTA AATATAGTCTTTTTGAGTTAGAAAACGGTTCGTAAACGGATGCTGG CTAGTGCCGGAGAATTACAAAAAGGAAATGAGCTGGCTCTGCCA AGCAAATATGTGAATTTTTATATTTAGCTAGTCATTATGAAAAGT TGAAGGGTAGTCCAGAAGATAACGAACAAAAACAATTGTTTGTG GAGCAGCATAAGCATTATTTAGATGAGATTATTGAGCAAATCAGT GAATTTTCTAAGCGTGTTATTTTAGCAGATGCCAATTTAGATAAA GTTCTTAGTGATATAACAAACATAGAGACAAACCAATACGTGAA CAAGCAGAAAATATTATTCATTTATTTACGTTGACGAATCTTGGA GCTCCCCTGCTTTTAAATATTTTGATACAACAATTGATCGTAAAC GATATACGTCTACAAAAGAAGTTTTAGATGCCACTCTTATCCATC AATCCATCACTGGTCTTTATGAAACACGCATTGATTTGAGTCAGC TAGGAGGTGACTGA (配列番号 15)	10
		20
		30
SpCas9 <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> MGAS1882野 生型 NC_017053.1	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKN LIGALLFGSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKV DDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKK LADSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLV QIYNQLFEENPINASRVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKRNGL FGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGD QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNSEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL	40

10

30

【表 9 - 4】

	TTGCATGCTATACTTAGAAGGCAGGAGGATTTTTATCCGTTCCCTCA AAGACAATCGTGAAAAGATTGAGAAAATCCTAACCTTTTCGCATAC CTTACTATGTGGGACCCCTGGCCCGAGGGAACCTCTCGGTTTCGCAT GGATGACAAGAAAGTCCGAAGAAACGATTACTCCATGGAATTTT GAGGAAGTTGTCGATAAAGGTGCGTCAGCTCAATCGTTCATCGAG AGGATGACCAACTTTGACAAGAATTTACCGAACGAAAAAGTATT GCCTAAGCACAGTTTACTTTACGAGTATTTACAGTGTACAATGA ACTCACGAAAGTTAAGTATGTCACTGAGGGCATGCGTAAACCCGC CTTCTAAGCGGAGAACAGAAGAAAGCAATAGTAGATCTGTTATT CAAGACCAACCGCAAAGTGACAGTTAAGCAATTGAAAGAGGACT ACTTTAAGAAAATTGAATGCTTCGATTCTGTGCGAGATCTCCGGGG TAGAAGATCGATTTAATGCGTCACTTGGTACGTATCATGACCTCC TAAAGATAATTAAGATAAGGACTTCCTGGATAACGAAGAGAAT GAAGATATCTTAGAAGATATAGTGTTGACTCTTACCCTCTTTGAA GATCGGGAAATGATTGAGGAAAGACTAAAAACATACGCTCACCT GTTGCGAGATAAGGTTATGAAACAGTTAAAGAGGCGTCGCTATAC GGGCTGGGGACGATTGTGCGGAAACTTATCAACGGGATAAGAG ACAAGCAAAGTGGTAAAACTATTCTCGATTTTCTAAAGAGCGACG GCTTCGCCAATAGGAACTTTATGCAGCTGATCCATGATGACTCTTT AACCTTCAAAGAGGATATACAAAAGGCACAGGTTTCCGGACAAG GGGACTCATTCACGAACATATTGCGAATCTTGCTGGTTCCGCCAG CCATCAAAAAGGGCATACTCCAGACAGTCAAAGTAGTGGATGAG CTAGTTAAGGTCATGGGACGTCACAAACCGGAAAAACATTGTAATC GAGATGGCACGCGAAAATCAAACGACTCAGAAGGGGCAAAAAA ACAGTCGAGAGCGGATGAAGAGAATAGAAGAGGGTATTAAAGAA CTGGGCAGCCAGATCTTAAAGGAGCATCCTGTGGAAAAATACCCA ATTGCAGAACGAGAACTTTACCTCTATTACCTACAAAATGGAAG GGACATGTATGTTGATCAGGAACTGGACATAAACCGTTTATCTGA TTACGACGTCGATCACATTGTACCCCAATCCTTTTTGAAGGACGA TTCAATCGACAATAAAGTGCTTACACGCTCGGATAAGAACCGAGG GAAAAGTGACAATGTTCCAAGCGAGGAAGTCGTAAAGAAAATGA AGAACTATTGGCGGCAGCTCCTAAATGCGAAACTGATAACGCAA AGAAAGTTCGATAACTTAACTAAAGCTGAGAGGGGTGGCTTGTCT GAACTTGACAAGGCCGGATTTATTAACGTCAGCTCGTGGAACC CGCCAAATCACAAAGCATGTTGCACAGATACTAGATTCCCGAATG AATACGAAATACGACGAGAACGATAAGCTGATTTCGGGAAGTCAA AGTAATCACTTTAAAGTCAAAATTGGTGTGCGACTTCAGAAAGGA TTTTCAATTCTATAAAGTTAGGGAGATAAATAACTACCACCATGC GCACGACGCTTATCTTAATGCCGTCGTAGGGACCGCACTCATTAA GAAATACCCGAAGCTAGAAAGTGAGTTTGTGTATGGTGATTACAA AGTTTATGACGTCCTGTAAGATGATCGCGAAAAGCGAACAGGAGA TAGGCAAGGCTACAGCCAAATACTTCTTTTATTCTAACATTATGA ATTTCTTTAAGACGGAAATCACTCTGGCAAACGGAGAGATACGCA AACGACCTTTAATTGAAACCAATGGGGAGACAGGTGAAATCGTA TGGGATAAGGGCCGGGACTTCGCGACGGTGAGAAAAGTTTTGTCC ATGCCCAAGTCAACATAGTAAAGAAAACCTGAGGTGCAGACCGG AGGGTTTTCAAAGGAATCGATTCTTCAAAAAGGAATAGTGATAA GCTCATCGCTCGTAAAAAGGACTGGGACCCGAAAAAGTACGGTG GCTTCGATAGCCCTACAGTTGCCTATTCTGTCCTAGTAGTGGCAA AAGTTGAGAAGGGAAAATCCAAGAACTGAAGTCAGTCAAAGAA	10 20 30 40

【表 9 - 5】

	TTATTGGGGATAACGATTATGGAGCGCTCGTCTTTTGAAAAGAAC CCCATCGACTTCCTTGAGGCGAAAGGTTACAAGGAAGTAAAAAA GGATCTCATAATTAACCTACCAAAGTATAGTCTGTTTGAGTTAGA AAATGGCCGAAAACGGATGTTGGCTAGCGCCGGAGAGCTTCAAA AGGGGAACGAACTCGCACTACCGTCTAAATACGTGAATTTCCCTGT ATTTAGCGTCCCATTACGAGAAGTTGAAAGGTTACCTGAAGATA ACGAACAGAAGCAACTTTTTGTTGAGCAGCACAAACATTATCTCG ACGAAATCATAGAGCAAATTTTCGGAATTCAGTAAGAGAGTCATCC TAGCTGATGCCAATCTGGACAAAGTATTAAGCGCATACAACAAGC ACAGGGATAAACCCATACGTGAGCAGGCGGAAAATATTATCCAT TTGTTTACTCTTACCAACCTCGGCGCTCCAGCCGCATTCAAGTATT TTGACACAACGATAGATCGCAAACGATACACTTCTACCAAGGAG GTGCTAGACGCGACACTGATTCACCAATCCATCACGGGATTATAT GAAACTCGGATAGATTTGTACAGCTTGGGGGTGACGGATCCCCC AAGAAGAAGAGGAAAGTCTCGAGCGACTACAAAGACCATGACGG TGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAA GGCTGCAGGA (配列番号 17)	10
SpCas9 <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> 野生型 SWBC2D7W014 のコードされた 産物	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNL IGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVD DSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPHIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKL VDSTDKADRLRIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLV QTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGL FGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGD QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYEFTVY NELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKED YFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDIL EDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGR SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQK AQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKP ENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGKELGSQILKEHPVENT QLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDD SIDNKVLTRSDKNRGKSDNPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGSELDAKAGFIKQRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKY DENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATKY FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR KVLSPQVNVKKTETVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY GGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPI DFLEAKGYKEVKKDLIHLKPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNEL ALPSKYVNFYLYASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQIS EFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSTGLYETRIDLSQLGGDGSP KKKRKVSSDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKAAG (配列番号 18)	20
SpCas9 <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i>	ATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCACAAATAG CGTCGGATGGGCGGTGATCACTGATGAATATAAGGTTCCGTCTAA AAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACAGACCGCCACAGTATCAAAA	30
		40

MIGAS野生型 NC_002737.2	AAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGACAGTGGAGAGACAGCGG AAGCGACTCGTCTCAAACGGACAGCTCGTAGAAGGTATACACGTC GGAAGAATCGTATTTGTTATCTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGA TGGCGAAAGTAGATGATAGTTTCTTTCATCGACTTGAAGAGTCTT TTTTGGTGGAAGAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCCTATTTTTG GAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATATCCAATA TCTATCATCTGCGAAAAAATTGGTAGATTCTACTGATAAAGCGG ATTTGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTAAGTTTCG TGGTCATTTTTTGGATTGAGGGAGATTTAAATCCTGATAATAGTGAT TGGGACAAACTATTTATCCAGTTGGGTACAAAACCTACAATCAATTA TTTGAAGAAAACCTATTAAACGCAAGTGGAGTAGATGCTAAAGC GATTCTTCTGCACGATTGAGTAAATCAAGACGATTAGAAAATCT CATTGCTCAGCTCCCCGGTGAGAAGAAAAATGGCTTATTTGGGAA TCTCATTGCTTTGTCTATTGGGTTTGACCCCTAATTTTAAATCAAAT TTTGATTTGGCAGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAAGATACT TACGATGATGATTTAGATAATTTATTGGCGCAAATTGGAGATCAA TATGCTGATTTGTTTTTGGCAGCTAAGAATTTATCAGATGCTATTT TACTTTCAGATATCCTAAGAGTAAATACTGAAATAACTAAGGCTC CCTATCAGCTTCAATGATTAACGCTACGATGAACATCATCAAG ACTTGACTCTTTTAAAAGCTTTAGTTTCGACAACAACCTCCAGAAA AGTATAAAGAAATCTTTTTTGATCAATCAAAAAACGGATATGCAG GTTATATTGATGGGGAGCTAGCCAAGAAGAACTTTTATAAATTTA TCAAAACCAATTTTAGAAAAAATGGATGGTACTTGGGAATTTTG TGAAACTAAATCGTGAAGATTGCTGCGCAAGCAACGGACCTTG ACAACGGCTCTATTCCCATCAAATTCACCTGGGTGAGCTGCATG CTATTTTGAGAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTTAAAGACA ATCGTGAGAAGATTGAAAAAATCTTGACTTTTCGAATTCCTTATT ATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTGTCATGGATGA CTCGGAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAATTTTGAAGAAG TTGTCGATAAAGGTGCTTCAGCTCAATCATTTATTGAACGCATGA CAAACTTTGATAAAAATCTTCCAAATGAAAAAGTACTACCAAAAC ATAGTTTGCTTTATGAGTATTTTACGGTTTATAACGAATTGACAAA GGTCAAATATGTTACTGAAGGAATGCGAAAACCAGCATTTCCTTC AGGTGAACAGAAGAAAGCCATTGTTGATTTACTCTCAAAACAAA TCGAAAAGTAACCGTTAAGCAATTAAGAAGATTATTTTCAAAA AAATAGAATGTTTTGATAGTGTTGAAATTCAGGAGTTGAAGATA GATTTAATGCTTCATTAGGTACCTACCATGATTTGCTAAAAATTAT TAAAGATAAAGATTTTTTTGGATAATGAAGAAAATGAAGATATCTT AGAGGATATTGTTTTAACATTGACCTTATTTGAAGATAGGGAGAT GATTGAGGAAAGACTTAAACATATGCTCACCTCTTGATGATAA GGTGATGAAACAGCTTAAACGTCGCCGTTATACTGGTTGGGGACG TTTGTCTCGAAAATTGATTAATGGTATTAGGGATAAGCAATCTGG CAAAACAATATTAGATTTTTTTGAAATCAGATGGTTTTTGCCAATCG CAATTTTATGCAGCTGATCCATGATGATAGTTTGACATTTAAAGA AGACATTCAAAAAGCACAAAGTGCTGGACAAGGCGATAGTTTAC ATGAACATATTGCAAATTTAGCTGGTAGCCCTGCTATTAAAAAAG GTATTTTACAGACTGTAAGAGTTGTTGATGAATTTGGTCAAAGTAA TGGGGCGGCATAAGCCAGAAAATATCGTTATTGAAATGGCACGT GAAAATCAGACAACCTCAAAAGGGCCAGAAAAATTCGCGAGAGCG TATGAAACGAATCGAAGAAGGTATCAAGAATTAGGAAGTCAGA

40

【表 9 - 7】

	TTCTTAAAGAGCATCCTGTTGAAAATACTCAATTGCAAAATGAAA AGCTCTATCTCTATTATCTCCAAAATGGAAGAGACATGTATGTGG ACCAAGAATTAGATATTAATCGTTTAAAGTGATTATGATGTCGATC ACATTGTTCCACAAAGTTTCCTTAAAGACGATTCAATAGACAATA AGGTCTTAACGCGTTCTGATAAAAATCGTGGTAAATCGGATAACG TTCCAAGTGAAGAAGTAGTCAAAAAGATGAAAACTATTGGAGA CAACTTCTAAACGCCAAGTTAATCACTCAACGTAAGTTTGATAAT TTAACGAAAGCTGAACGTGGAGGTTTGAGTGAACCTGATAAAGCT GGTTTTATCAAACGCCAATTGGTTGAACTCGCCAAATCACTAAG CATGTGGCACAATAATTTGGATAGTCGCATGAATACTAAATACGAT GAAAATGATAAACTTATTTCGAGAGGTTAAAGTGATTACCTTAAAA TCTAAATTAGTTTCTGACTTCCGAAAAGATTTCCAATTCTATAAAG TACGTGAGATTAACAATTACCATCATGCCCATGATGCGTATCTAA ATGCCGTCGTTGGAACCTGCTTTGATTAAAGAAATATCCAAAACCTTG AATCGGAGTTTGTCTATGGTGATTATAAAGTTTATGATGTTCTGTAA AATGATTGCTAAGTCTGAGCAAGAAATAGGCAAAGCAACCGCAA AATATTTCTTTTACTCTAATATCATGAACTTCTTCAAAACAGAAAT TACACTTGCAAATGGAGAGATTTCGCAAACGCCCTCTAATCGAAAC TAATGGGGAAACTGGAGAAATTGTCTGGGATAAAGGGCGAGATT TTGCCACAGTGCACAAAGTATTGTCCATGCCCCAAGTCAATATTG TCAAGAAAACAGAAGTACAGACAGGCGGATTCTCCAAGGAGTCA ATTTTACCAAAAAGAAATTCGGACAAGCTTATTGCTCGTAAAAAA GACTGGGATCCAAAAAATATGGTGGTTTTGATAGTCCAACGGTA GCTTATTCAAGTCTAGTGGTTGCTAAGGTGGAAAAAGGGAAATCG AAGAAGTTAAATCCGTAAAGAGTTACTAGGGATCACAATTATG GAAAGAAGTTCCTTTGAAAAAATCCGATTGACTTTTTAGAAAGCT AAAGGATATAAGGAAGTTAAAAAAGACTTAATCATTAAACTACC TAAATATAGTCTTTTGGAGTTAGAAAACGGTCGTAAACGGATGCT GGCTAGTGCCGGAGAATTACAAAAAGGAAATGAGCTGGCTCTGC CAAGCAAATATGTGAATTTTTATATTTAGCTAGTCATTATGAAA AGTTGAAGGTAGTCCAGAAGATAACGAACAAAAACAATTGTTT GTGAGCAGCATAAAGCATTATTTAGATGAGATTATTGAGCAAATC AGTGAATTTTCTAAGCGTGTTATTTTAGCAGATGCCAATTTAGATA AAGTTCTTAGTGATATAACAAACATAGAGACAAACCAATACGTG AACAAGCAGAAAATATTATTCATTTATTTACGTTGACGAATCTTG GAGCTCCCGCTGCTTTTAAATATTTGATACAACAATTGATCGTAA ACGATATACGTCTACAAAAGAAGTTTATAGATGCCACTCTTATCCA TCAATCCATCACTGGTCTTTATGAAACACGCATTGATTTGAGTCA GCTAGGAGGTGACTGA (配列番号 19)	10
		20
		30
SpCas9 <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> MIGAS野生型 NC_002737.2の コードされた産 物 (カノニカルな Q99ZW2野生型 と100%同 ー)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNL IGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVD DSFFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKL VDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLV QTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGL FGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGD QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDL TLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP WNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVY	40

【表 9 - 8】

	NELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKED YFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDIL EDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRL SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQK AQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAICKGILQTVKVVDELVKVMGRHKP ENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENT QLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDD SIDNKVLTRSDKNRGKSDNPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKY DENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKY FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR KVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPPKKY GGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPI DFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNEL ALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEKQQLFVEQHKHYLDEIIEQIS EFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 258)

10

20

【0211】

本明細書に記載の方法および組成物において利用される改善されたプライムエディタータンパク質は、上のSpCas9配列のいずれか、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%、または少なくとも99%の配列同一性を有するそのいずれかのバリエーションを包含してもよい。

【0212】

他の態様において、Cas9タンパク質は、*S. pyogenes*からのカノニカルなCas9とは異なる別の細菌種からの野生型Cas9オルソログであり得る。例えば、以下のCas9オルソログの改変バージョンは、野生型SpCas9のR 221 K、N 394 K、R 753 Gおよび/またはH 840 Aに対応する位置に突然変異を作製することによって、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるPEmax構築物と関連して使用することができる。加えて、下のオルソログ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%、または少なくとも99%の配列同一性を有するいずれかのバリエーションCas9オルソログもまたプライムエディターと共に使用されてもよい。

30

【表 10 - 1】

説明	配列
LfCas9 <i>Lactobacillus fermentum</i> 野生型 GenBank: SNX31424.1	MKEYHIGLDIGTSSIGWAVTDSQFKLMRIKGGKTAIGVRLFEEGKTA AERR TFRTRRRRLKRRKWRLHYLDEIFAPHLQEVDENFLRRLKQSNHPEDPTK NQAFIGKLLFPDLLKKNRGYPTLIKMRDELPVEQRAHYPMNIYKLRE AMINEDRQFDLRE VYLAVHHIVKYRGHFLNNASVDKFKVGRIDFDKSFN VLNEAYEELQNGEGSFTIEPSKVEKIGQLLLDTKMRKLD RQKAVAKLLE VKVADKEETKR NKQIATAMSKLV LGYKADFATVAMANGNEWKIDLSS ETSEDEIEKFREE LSAQNDILTEITSLFSQIMLNEIVPNGMSISESMMDRY WTHERQLAEVKEYLATQPASARKEFDQVYNKYIGQAPKERGF DLEKGL KKILSKKENWKEIDELLKAGDFLPKQRTSANGVIPHQMHQQELDR IIEKQ AKYYPWLATENPATGERDRHQAKYELDQLVSFRIPY YVGPLVTPEVQK

40

50

【表 10 - 2】

説明	配列
	ATSGAKFAWAKRKEDGEITPWNLWDKIDRAESAFAFIKRMTVKDITYLL NEDVLPANSLLYQKYNVLNELLNNVRVNGRRLSVGIKQDIYTELFKKKKT VKASDVASLVMAKTRGVNKPVSVEGLSDPKKFNSNLATYLDLKSIVGDK VDDNRYQTDLENIEWRSVFEDGEIFADKLTEVEWLTDEQRSALVKKRY KGWGRLSKKLLTGIVDENGQRIIDLMWNTDQNFKEIVDQPVFKEQIDQL NQKAITNDGMTLRERVESVLDDAYTSPQNKKAIWQVVRVVEDIVKAVG NAPKSISIEFARNEGKGEITRSRRTQLQKLFEDQAHVLKDTSLTEELEK APDLSDRYFYFTQGGKDMYTGDPINFDEISTKYDIDHILPQSFKDNL DNRVLTSRKENNKKSDQVPAKLYAAKMMPYWNQLLKQGLITQRKFEN LTKDQVQNIKYRSLGFVQRQLVETRQVIKLTANILGSMYQEAGTEIETR AGLTKQLREEFDLPKVREVNDYHHAVDAYLTTFAGQYLNRRYPKLRSF FVYGEYMKFKHGSGLKLRNFNFFHELMEGDKSQGKVVDQQTGELITR DEVAKSFDRLNMKYMLVSKEVHDRSDQLYGATIVTAKESGKLTSPIEI KKNRLVDLYGAYTNGTSAFMTIIFKFTGNPKPKYKVIPTTSAASLKRAK PGSESYNQLHRIKSNPKVKKGFEIVVPHVSYGQLIVDGDCKFTLASPTV QHPATQLVLSKKSLETISSGYKILKDKPAIANERLIRVFDEVVGQMNRYF TIFDQRSNRQKVADARDKFLSLPTESKYEGAKKVQVGKTEVITNLLMGL HANATQGDLLVGLATFGFFQSTTGLSLSEDTMIVYQSPTGLFERRICKL DI (配列番号 20)
SaCas9 <i>Staphylococcus aureus</i> 野生型 GenBank: AYD60528.1	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFH RLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKA DLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEN PINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTP NFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSD AILLSILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYK EIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFD KNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKA VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVM KQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLI HDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL VKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQ SFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVKKMKNYWRQLLNAKLI TQRKFDNLTKAERGGELSELDKAGFIKQRLVETRQITKHVAQILDSRMNT KYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYLN AVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFY SNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SM PQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPT VAYSVLVAKVEKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLY

10

20

30

40

50

【表 10 - 3】

説明	配列
	LASHYEKLKGSPEQNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANL DKVLSAYNKHRRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYT STKEVLDTATLIHQSTGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 259)
SaCas9 <i>Staphylococcus aureus</i>	MGKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRS KRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQ KLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEE KYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQ SFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELR SVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEKFQIENVFQKKKP TLKQIAKEILVNEEDIKGYRVSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENA ELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSL KAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSP VVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIEELAREKNSKDAQKMINEMQKRNR QTNERIEEIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNP FNYEVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISY ETFKKHILNLAAGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRY ATRGLMNLRLSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGK HHAEDALIIANADFIFKEWKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETE EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGN TLIVNNLNGLYDKDNDKLLKLINKSPEKLLMYHHDPTQYQKLKLIMEQ YGDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNQVPIKKIKYYGNKLNALDIT DDYPNSRNKVVKLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKENYYEV NSKCYEEAKKLKISNQAEFIASFYKNDLIKINGELRYVIGVNNDDLNR VNMIDITYREYLENMNDKRPPHIIKTASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSK KHPQIIKK (配列番号 21)
StCas9 <i>Streptococcus thermophilus</i> UniProtKB / Swiss-Prot: G3ECR1.2 野生型	MLFNKCIISINLDFSNKEKCMTPKPSIGLDIGTNSVGWAVITDNYKVPSK KMKVLGNTSKKYIKKNLLGVLLFDSGITAEGRRLKRTARRRYTRRRNR LYLQEIFSTEMATLDDAFFQRLDDSFVPDDKRDSKYPIFGNLVEEKVYH DEFPTIYHLRKYLADSTKKADRLVYLALAHMIKYRGHFLIEGEFNSKN NDIQKNFQDFLDITYNAIFESDLSLENSKQLEEIVKDKISKLEKKDRILKLF PGEKNSGIFSEFLKLIVGNQADFRKCFNLDEKASLHFSKESYDEDLETLL GYIGDDYSDVFLKAKKLYDAILLSGFLTVDNETEAPLSSAMIKRYNEH KEDLALLKEYIRNISLKYNEVFKDDTKNGYAGYIDGKTNQEDFYVYLK NLLAEFEGADYFLEKIDREDFLRKQRTFDNGSIPYQIHLQEMRAILDKQA KFYPFLAKNKERIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSDFAWSIRKRNEKITPWNF EDVIDKESSAEAFINRMTSFDLYLPEEKVLPKHSLLYETFNVYNELTKVR FIAESMRDYQFLDSKQKKDIVRLYFKDKRKVTDKDIEYLHAIYGYDGIE LKGIEKQFNSSLSTYHDLLNIINDKEFLDDSSNEAIIIEIHTLTIFEDREMIK QRLSKFENIFDKSVLKKLSRRHYTGWGKLSAKLINGIRDEKSGNTILDYLI DDGISNRNFMQLIHDDALSFKKKIQKAQIIGDEDKGNIEVVKSPLGSPAI KKGILQSIKIVDELVKVMGGRKPESIVVEMARENQYTNQGKSNSQQRLLK RLEKSLKELGSKILKENIPAKLSKIDNNALQNDRLYLYYLQNGKDMYTG DDLDIDRLSNYDIDHIIPQAFLKDNSIDNKVLVSSASNRGKSDDFPSLEV KKRKTFWYQLLKSLLISQRKFDNLTAKERGGLLPEDKAGFIQRQLVETR

10

20

30

40

【表 10 - 4】

説明	配列
	QITKHVARLLDEKFNNKKDENNRAVRTVKIITLKSTLVSQFRKDFELYK VREINDFHHAHDAYLNAVIASALLKKYPKLEPEFVYGDYPKYNSFRERK SATEKVYFYFSNIMNIFKKSISLADGRVIERPLIEVNEETGESVWNKESDLA TVRRVLSYPQVNVVKKVEEQNHGLDRGKPKGLFNANLSSKPKPNSNEN LVGAKEYLDPKKYGGYAGISNSFAVLVKGITIEGAKKKITNVLEFQGISI LDRINYRKDKLNFLEKGYKDIELIIELPKYSLFELSDGSRRLASILSTN NKRGEIHKGNQIFLSQKFVKLLYHAKRISNTINENHRKYVENHKKEFEEL FYYILEFNENYVGAKKNGKLLNSAFQSWQNHSIDELCSSFIGPTGSERKG LFELTSRGSAADFEFLGVKIPRYRDYTPSSLLKDATLIHQSVTGLYETRID LAKLGEG (配列番号 22)
LcCas9 <i>Lactobacillus</i> <i>crispatus</i> NCBI参照配 列 WP_13347804 4.1 野生型	MKIKNYNLALTPTS AVGHVEVDDDLNILEPVHHQKAIGVAKFGEGETA EARRLARSARRTTKRRANRINHVFNEIMKPEIDKVDPLMFDRIKQAGLSP LDERKEFRTVIFDRPNIASYYHNQFPTIWLHQLKYLMTDEKADIRLIYWA LHSLLKHRGHFFNTTPMSQFKPGKLNKDDMLALDDYNDLEGLSFAVA NSPEIEKVIKDRSMHKKKEKIAELKKLIVNDVDPKDLAKRNNKIITQIVNAI MGNSFHLNFIFDMDLDKLTSAWSFKLDDPELDTKFDAISGSMTDNQIGI FETLQKIYSAISLLDILNGSSNVVDAKNALYDKHKRDLNLYFKFLNTLPD EIAKTLKAGYTLYIGNRKKDLAARKLLKVNVAKNFSQDDFYKLINKEL KSIDKQGLQTRFSEKVGELVAQNNFLPVQRSSDNVFIPIYQLNAITFNKILE NQGKYDFLVKPNPAKKDRKNAPYELS QLMQFTIPYVYVGPLVTPEEQV KSGIPKTSRFAWMVRKDNGAITPWNFYDKVDIEATADKFIKRSIAKDSY LSELVLPKHSLLYEKYEVEFNELSNVSLDGKKLSGGVKQILFNEVFKKTN KVNTSRILKALAKHNIPGSKITGLSNPEEFTSSLQTYNAWKKYFPNQIDNF AYQQDLEKMIEWSTVFEDHKILAKKLDEIEWLDDDDQKKFVANTRLRGW GRLSKRLLTGLKDNYGKSIMQRLETTKANFQQIVYKPEFREQIDKISQAA AKNQSLEDILANSYTPSPNRKAIRKTMSVDEYIKL NHGKEPDKIFLMFQ RSEQEKGKQTEARSKQLNRILSQLKADKSANKLFSKQLADEFSNAIKKS KYKLNQKQYFYFQQLGRDALTGEVIDYDELYKYTVLHIIIPRSKLTDDSQ NNKVLTKYKIVDGSVALKFGNSYSDALGMPKAFWTELNRKLIPKGL LNLTTDFSTLNKYQRDGYIARQLVETQQIVKLLATIMQSRFKHTKIIIEVR NSQVANIRYQFDYFRIKLNLEYRGFDAYLA AVVGTYLYKVYPKARRL FVYGQYLKPKKTNQENQDMHLDSEKKSQGFNFWNLLY GKQDQIFVN GTDVIAFNRKDLITKMNTVYNYKSQKISLAIDYHNGAMFKATLFPNRDR DTAKTRKLIPKKKDYDTDIYGGYTSNVDGYMLLAEIIRKRDGNKQYGFY VPSRLVSELDTLKKTRYTEYEEKLKEIIPKELGVDLKKIKKIKILKNKVPF NQVIIDKGSKFITSTS YRWNYRQLILSAESQQTLMDLVDPDFSNHKAR KDARKNADERLIKVYEEILYQVKNYMPMFVELHRCYEKL VDAQKTFKS LKISDKAMVLNQILILLHSNATSPVLEKLG YHTRFTLGKKHNLISENAVL VTQSITGLKENHVS IKQML (配列番号 23)
PdCas9 <i>Pedicoccus</i> <i>damosus</i>	MTNEKYSIGLDIGTSSIGFAVVNDNNRVIRVKGKNAIGVRLFDEGKAAA DRRSFRTRRSFRTRRRRLSRRRWRLKLLREIFDAYITPVDEAFFIRLKES NLSPKDSKKQYSGDILFNDRSDKDFYEKYPTIYHLRNALMTEHRKFDVR EIYLAHHIMKFRGHFLNATPANNFKVGRNLNLEEKFEELNDIYQRVFPDE SIEFRDNLLEQIKEVLLDNKRSRADRQRTLVS DIYQSSSEDKDIEKRNKAV

10

20

30

40

50

【表 10 - 5】

説明	配列
NCBI 参照配列 WP_0629132 73.1 野生型	ATEILKASLGNKAKLNVITNVEVDKEAAKEWSITFDSESIDDDLAKIEGQ MTDDGHEIIEVLRSLYSGITLSAIVPENHTLSQSMVAKYDLHKDHLKLFK KLINGMTDTKKAKNLRAAYDGYIDGVKGKVLPEDEFYKQVQVNLDDSD AEANEIQTYIDQDIFMPKQRTKANGSIPHIQLQQQELDQIENQKAYYPWL AELNPNPDKKRQQLAKYKLDLVTFRVPYYVGPMITAKDQKNQSGAEF AWMIRKEPGNITPWNFDQKVDRMATANQFIKRMTTTTDTYLLGEDVLPA QSLLYQKFEVLNELNKRIDHKKPISIEQKQIFNDLQKQFKNVTIKHLQDY LVSQGGYQSKRPLIEGLADEKRFNSSLSTYSDLCGIFGAKLVEENDRQEDL EKIIEWSTIFEDKKIYRAKLNDLTWLTDDQKEKLATKRYQGWGRLSRKL LVGLKNSEHRNIMDILWITNENFMQIQAEPDFAKLVTDANKGMLEKTDS QDVINDLYTSPQNKKAIRQILLVVDIQNAMHGGAPAKIHVEFARGEER NPRRSVQRQRQVEAAAYEKVSNELVSAKVRQEFKEAINNKRDFKDRFLF YFMQGGIDIYTGKQLNIDQLSSYQIDHILPQAFVKDDSLTNRVLTNENQV KADSVPIDIFGKKMLSVWGRMKDQGLISKGYRNLTMPENISAHTENG FINRQLVETRQVIKLAVNILADEYGDSTQIISVKADLSHQMRDEFELLKN RDVNDYHHAFFDAYLAAFIGNYLLKRYPKLESYFVYGDFFKFTQKETKM RRFNFIYDLKHCDQVVKETGEILWTKDEDIKYIRHLFAYKKILVSHEVR EKRGAALYNQTIYKAKDDKGGSGQESKKLIRIKDDKETKIYGGYSGKSLAY MTIVQITKKNKVSYSRVIGIPTLALARNKLENDSTENNGELYKIIKPQFTH YKVDKKNGEIJETDDFKIVVSKVRFQQLIDDAGQFFMLASDTYKNNAQ QLVISNNALKAINNTNITDCPRDDLRLDLRLDSAFDEIVKKMDKYFSA YDANNFREKIRNSNLIFYQLPVEDQWENNKITELGKRTVLTRILQGLHAN ATTTDMSIFIKITPFGQLRQRSGISLENAQLIYQSPTGLFERRVQLNKKIK (配列番号 24)
FnCas9 <i>Fusobacterium nucleatum</i> NCBI 参照配列 WP_0607989 84.1	MKKQKFSDYYLGFDIGTNSVGWCVTDLVDYNVLRFNKKDMWGSRLFEE AKTAAERRVQRNSRRRLKRRKWRLNLLIEIFSNEILKIDSNFFRRLKESSL WLEDKSSKEKFTLFNDDNYKDYDFYKQYPTIFHLRNELIKNPEKKDIRLV YLAHSIFKSRGHFLFEGQNLKEIKNFETLYNNLIAFLEDNGINKIIDKNNI EKLEKIVCDSSKGLKDKEKEFEFNSDKQLVAIFKLSVGSSVSLNDFD TDEYKKGEVEKEKISFREQIYEDDKPIYYISILGEKIELLDIAKTFYDFMVL NNILADSQYISEAKVKLYEEHKKDLKNLKYIIRKYNKGNYDKLFDKDKNE NNYSAYIGLNKEKSKKEVIEKSRLKIDDLIKNIKGYLPKVEEIEEKDKAIF NKILNKIELKTILPKQRISDNGTLPYQIHEAELEKILENQSKYYDFLNYEE NGIITKDKLLMTFKFRIPYYVGPLNSYHKDKGGNSWIVRKEEGKILPWNF EQKVDIEKSAEEFIKRMNTNKCTYLNGEDVIPKDTFLYSEYVILNELNKVQ VNDEFLNEENKRKIIDELFKENKKVSEKKFKEYLLVKQIVDGTIELKGVK DSFNSNYISYIRFKDIFGEKLNLDIYKEISEKSILWKCLYGDDKKIFEKKIK NEYGDILTKDEIKKINTFKFNNWGRLSEKLLTGIEFINLETGECYSSVMDA LRRTNYNLMELLSSKFTLQESINNENKEMNEASYRDLIEESYVSPSLKRAI FQTLKIYEEIRKITGRVPPKVFIEMARGGDESMKNKKIPARQEQLKKLYD SCGNDIANFSIDIKEMKNSLISYDNNSLRQKKLYLYYLQFGKCMYTGREI DLDRLLQNNDTYDIDHIYPRSKVIKDDSDNLVLVLKNENAEKSNEYPV KKEIQEKMKSFWRFLKEKNFISDEKYKRLTGKDDFELRGFMARQLVNV RQTTKEVGKILQQIEPEIKIVYSKAEIASSFREMFDIKVRELNDTHAKD

10

20

30

40

50

【表 10 - 6】

説明	配列
	AYLNIVAGNVYNTKFTEKPYRYLQEIKENYDVKKIYNYDIKNAWDKEN SLEIVKKNMEKNTVNITRFIKEKKGQLFDLNPICKGETSNEIISIKPKVYN GKDDKLNEKYGYYSKSLNPAYFLYVEHKEKNKRIKSFERVNLVDVNNIK DEKSLVKYLIENKKLVEPRVIKKVYKRQVILINDYPYSIVTLDSNKLMDF ENLKPLFLENKYEKILKNVIKFLEDNQGKSEENYKFIYLLKKKDRYEKNET LESVKDRYNLEFNEMYDKFLEKLDSDYKNYMNNKKYQELLDVKEKFI KLNLFDKAFTLKSFLDLFNRKTMADFSKVGLTKYLGGIKQISSNVLSKNE LYLLEESVTGLFVKKIKL (配列番号 25)
EcCas9 <i>Enterococcus cecorum</i> NCBI 参照配列 WP_04733850 1.1 野生型	RRKQRIQILQELLGEEVLKTDPGFFHRMKESRYVVEDKRTLKGKQVELP YALFVDKDYTDKEYYKQFPTINHLIVYLMTSDTPDIRLVYLAHYMK NRGNFLHSGDINNVDINDILEQLDNVLETFLDGNLKLKSYVEDIKNIY NRDLGRGERKKAFVNTLGAKTKAEKAFCSLISGGSTNLAELFDDSSLKEI ETPKIEFASSLEDKIDGIEALEDRFAVIEAAKRLYDWKTLTDILGDSSS LAEARVNSYQMHHEQLLELKSLSVKEYLDRKVFQEVFVSLNVANNYPAY IGHTKINGKKKELEVKRTKRNDFYSYVKKQVIEPIKKKVSDEAVLTKLSE IESLIEVDKYLPLQVNSDNGVIPYQVKLNELTRIFDNLENRIPVLRENDRK IITKFKFRIPYYVGSNLGVVKNKGCTNWMVRKEEGKIYPWNFEDKVDLE ASAEQFIRMTNKTCTYLVNEDVLPKYSLLYSKYLVSELNNLRIDGRPLD VKIKQDIYENVFKKNRKVTLKKIKYLLKEGIITDDDELGLADDVKSLL TAYRDFKEKLGHLDLSEAQMENIILNITLFGDDKLLKKRLAALYPFIDD KSLNRIATLNYRDWGRLSERFLSGITSVDQETGELRTIQCMEYETQANLM QLLAEPYHFVEAIEKENPKVDLESISYRIVNDLYVSPAVKRQIWQTLVLIK DIKQVMKHDPERIFIEMAREKQESKKTCSRQVLSEVYKKAKEYEHLFE KLNSLTEEQLRSKKIYLYFTQLGKCMYSGEPIDFENLVSANSNYDIDHIYP QSKTIDDSFNIVLVKKSLSNAYKSNHYPIDKNIRDNEKVKTLWNTLVSK GLITKEKYERLIRSTPFSDDELAGFIARQLVETRQSTKAVAEILSNWFPSE IVYSKAKNVSNFRQDFEILKVRELNDCHHAHDAYLNIVVGNAHYHTKFTN SPYRFIKNKANQEYNLRKLLQKVNKIESNGVVAWVGQSENNPGTIATVK KVIRRTVLISRMVKEVDGQLFDLTLMKKGKGVPIKSSDERLTDISKY GGYNKATGAYFTFVKSCKRGKVVRSEFYVPLHLSKQFENNNELLKEYIE KDRGLTDVEILIPKVLINSLFRYNGSLVRITGRGDTRLLLVEHQPLYVSNS FVQQLKSVSSYKLKKSSENDNAKLTATEKLSNIDELYDGLLRKLDLPIY SYWFSSIEKEYLVESRTKYIKLSIEEKALVIFEILHLFQSDAQVPLKILGLS TKPSRIRIQKNLKDTDKMSIIHQSPSGIFEHEIELTSL (配列番号 26)
AhCas9 <i>Anaerostipes hadrus</i> NCBI 参照配列 WP_04492427 8.1 野生型	MQNGFLGITVSSEQVGWAVTNPKYELERASRKDLWGVRLFDKAETAED RRMFRTNRRNLNQRKKNRHILYLRDIFHEEVNQKDPNFFQQLDESNEFCEDD RTVEFNFDTNLYKNQFPTVYHLRKYLMETKDKPDRLVYLAFSKFMKN RGHFLYKGNLGEVMDFENSMDGFCESLEKFNIDFPTLSDEQVKEVRDIL CDHKIAKTVKKKNITITKVKSKTAKAWIGLFCGCSVPVKVLFQDIDEEIV TDPEKISFEDASYDDYIANIEKGVGIYYEAIVSAMKMLFDWSILNEILGDHQ LLSDAMIAEYNKHDDDLKRLQKIIKGTGSRELYQDIFINDVSGNYVCYV GHAKTMSSADQKQFYTFKLNRLKNVNGISSEDAEWIDTEIKNGTLLPKQ TKRDNSVIPHLQLREFELILDNMQEMYPLKENREKLLKIFNFVIPYYV GPLKGVVRKGESTNWMVPKKGDIHPWNFDEMVDKEASAECFISRMT

10

20

30

40

【表 10 - 7】

説明	配列
	GNCSYLFNEKVLPKNSLLYETFEVLNELNPLKINGEPISVELKQRIYEQLF LTGKKVTKKSLTKYLIKNGYDKDIELSGIDNEFHSNLKSHIDFEDYDNLS DEEVEQIILRITVFEDKQLLKDYLNREFVKLSEDERKQICSLSYKGWGNL SEMLLNGITVTDNGVEVSVMDMLWNTNLNLMQILSKKYGYKAEIEHY NKEHEKTIYNREDLMDYLNIPPAQRRKVNQLITIVKSLKKTYGVPNKIFF KISREHQDDPKRTSSRKEQLKYLYKSLKSEDEKHLMKELDELNDHELSEN DKVYLYFLQKGRCIYSGKKLNLRLRKSNYQNDIDYIYPLSAVNDRSMN NKVLTGIQENRADKYTYFPVDSEIQKKMKGFWMELVLQGFMTKEKYFR LSRENDFSKSELVSFIEREISDNQQSGRMIAVLQYYFPESKIVFVKEKLIS SFKRDFHLISSYGHNLQAADAYITIVVGNVYHTKFTMDPAIYFKNHK RKDYDLNRLFLENISRDGQIAWESGPYGSIQTVRKEYAQNHIAVTKRVV EVKGGFLFKQMPLKKGHGEYPLKTNDPRFGNIAQYGGYTNVTGSYFVLV ESMEKGKKRISLEYVPVYLHERLEDDPGHKLLKEYLVDHRKLNHPKILL AKVRKNSLLKIDGFYYRLNGRSGNALILTNAVELIMDDWQTKTANKISG YMKRRADKKARVYQNEFHIQEQLYDFYLDKLNKGVYKNRKNNQA ELIHNEKEQFMELKTEDQCVELLTEIKKLFVCSMPQADLTLIGGSKHTGMI AMSSNVTKADFVIAEDPLGLRNKVIYSHKGEK (配列番号 27)
KvCas9 <i>Kandleria vitulina</i> NCBI 参照配列 WP_03158996 9.1 野生型	MSQNNNKIYNIGLDIGDASVGWAVVDEHYNLLKRHGHKHMWGSRLFTQ ANTAVERRSSRSTRRRYNKRERRIRLLREIMEDMVLVDVPTFFIRLANVS FLDQEDKKDYLKENYHSNYNLFIDKDFNDKTYYDKYPTIYHLRKHLCS KEKEDPRLIYLALHHIVKYRGNFLYEGQKFSMDVSNIEDKMIDVLRQFN EINLFEYVEDRKKIDEVLNVLKEPLSKKHKA EKAFALFDTTKDNKAAYK ELCAALAGNKFNVTKMLKEAELHDEDEKDISFKFSDATFDDAFVEKQPL LGDCVEFIDLLHDIYSWVELQNILGSAHTSEPSISAAMIQRYEDHKNDLK LLKDVIRKYLPKKYFEVFRDEKSKKNNYCNYINHPSKTPVDEFYKYIKK LIEKIDDPDVKTILNKIELESFMLKQNSRTNGAVPYQMQLDELN KILENQ SVYYSDLKDNE DKIRSILTFRIPYYFGPLNITKDRQFDWI KKEGKENERIL PWNANEIVDVDKTADDEFIKMRNFCTYFPDEPVMAKNSLTVSKYEVLN EINKLRINDHLIKRDMKDKMLHTLFMDHKSISANAMKKWL VKNQYFSN TDDIKIEGFQKENACSTSLTPWIDFTKIFGKINESNYDFIEKIIYDVTVFED KKILRRRLKKEYDLDEEKIKKILKLKYSWWSRLSKKLLSGIKTKYKDSTR TPETVLEV MERTNMNLMQVINDEKLGFKKTIDDANSTSVSGKFSYAEVQ ELAGSPAIKRGIWQALLIVDEIKKIMKHEPAHVYIEFARNEDEKERKDSF VNQMLKLYKDYDFEDETEKEANKHLKGEDAKSKIRSERLKLYYTQMG KCMYTGKSLDIDRLDYQVDHIVPOSLLKDDSIDNKVLVLSENQRKLD DLVIPSSIRNKMYGFWELFNNKIISPCKFYSLIKTEFNEKDQERFINRQIV ETRQITKHVAQIIDNHYENTKVVTVRADLSHQFRERYHIYKNRDINDFH AHDAYIATILGTYIGHRFESLDAKYIYGEYKRIFRNQKNKGKEMKKNNND GFILNSMRNIYADKDTGEIVWDPNYIDRIKKCFYKDCFVTKKLEENNG TFFNVTVLPNDTNSDKDNTLATVPVNKYRSNVNKYGGFSGVNSFIVA IKGKKKGKKVIEVNKLGTIPLMYKNADEEIKINYLKQAEDLEEVQIGKEIL KNQLIEKDGGLYYIVAPTEIINAKQLILNESQTKLVCEIYKAMKYKNYDN LDSEKIIDL YRLLINKMELYYPEYRKQLVKKFEDRYEQLKVISIEEKCNI

10

20

30

40

【表 10 - 8】

説明	配列
	KQILATLHCNSSIGKIMYSDFKISTTIGRLNGRTISLDDISFIAESPTGMYSK KYKL (配列番号 28)
EfCas9 <i>Enterococcus faecalis</i> NCBI 参照配列 WP_01663104 4.1 野生型	MRLFEEGHTAEDRRLKRTARRRISRRRNRLRYLQAFEEAMTDLDENFF ARLQESFLVPEDKKWHRHPIFAKLEDEVAYHETYPTIYHLRKKLADSSE QADRLRIYLALAHIVKYRGHFLIEGKLSTENTS VKDQFQQFMVIYNQTFV NGESRLVSAPLPESVLIIEEELTEKASRTKKSEKVLQQFPQEKANGLFGQF LKLMVGNKADFKKVFGLEEEAKITYASESYEEDLEGILAKVGDEYSDFV LAAKNVYDAVELSTILADSDKKSHAKLSSSMIVRFTEHQEDLKKFKRFIR ENCPDEYDNLFKNEQKDG YAGYIAHAGKVSQKLFYQYVKKIIDIAGAE YFLEKIAQENFLRKQRTFDNGVIPHQIHLAELQAIHRQAAYYPFLKENQE KIEQLVTFRIPIYYVGPLSKGDASTFAWLKRQSEPIRPWNLQETVDLDQS ATAFIERMTNFDTYLPSEKVLPHKSLLEYKFMVFNELTKISYTD DRGIKA NFSGKEKEKIFDYLFKTRRKVKKKDIIQFYRNEYNTEIVTSLGLEEDQFN ASFSTYQDLLKCGLTRAE LDPNAEKLEDIIKILTI FEDRQRIRTQLSTFK GQFSAEVLKKLERKH YTGWRLSKKLINGIYDKESGKTILDYLVKDDGV SKHYNRNFMQLINDSQLSFKNAIQKASSEHEETLSETVNELAGSPA IKK GIYQSLKIVDELVAIMGYAPKRIVVEMARENQTTSTGKRRSIQRLKIVEK AMAEIGSNLLKEQPTTNEQLRDTRLFLYMQNGKDMYTGDELSLHRLS HYDIDHIIPQSFMKDDSLDNLVLVGSTENRGKSDDVPSKEVVKDMKAY WEKLYAAGLISQRKFQRLTKGEQGGTL EDKAHFIRQQLVETRQITKNV AGILDQRYNAKSKEKKVQIITLKASLTSQFRSIFGLYKVREVDYHHGQD AYLCNCVVATLLKVYPNLAPEFVYGEYPKFQTFKENKATAKAIYTNLL RFFTEDEPRFTKDGEILWSNSYLKTIKKELNYHQMNI VKKVEVQKGGFS KESIKPKGPSNKLIPVKNGLDPQKYGGFDS PVVAYTVLFTHEKGKKPLIK QEILGITIMEKTRFEQNPILFLEEKGFLRPRVLMKLPKYTL YEFPEGRRRL LASAKEAQKGNQMVLP EHLTL LYHAKQCLLPNQSESLAYVEQH QPEF QEILERVVDFAEVHTLAKSKVQQIVKLFEANQTADVKEIAASFIQLMQFN AMGAPSTFKFFQKDIERARYTSIKEJFDATIIYQSPTGLYETRRKVVD (配列番号 29)
<i>Staphylococ- cus aureus</i> Cas9	KRNYILGLDIGITSVGYGII DYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKR GARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKL SEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKY VAEQLERLKKDGEVRGSINRFKTS DYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFI DTYIDLLETRRTYYEGPGE GSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSV KYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEYEFQI IENVFKQKKKPTL KQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEI IENAEL LDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNS ELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKA I NLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLV PKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVK RSFIQSIKVINAIKKYGLPNDI IELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTN ERIEII RTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFY EVDHII PRSVSFDNSFNKVLVKQEENS KKGNRTPFQYLSSSDSKISYETF KKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLDVTRYATR GLMNLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHA EDALIANADFIFKEWKLDKAKKVMENQMFE EKQAESMPEIETE QEYK

10

20

30

40

50

【表 10 - 9】

説明	配列
	EIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIV NNLNGLYDKDNDKLLKLINKSPEKLLMYHHDPOQTYQKLKLIMEQYGDE KNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNALHDITDDYP NSRNKVVKLSLKPYPFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKC YEEAKKLKKISNQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMI DITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQ IHKKG (配列番号 30)
<i>Geobacillus thermodenitri- ficans</i> Cas9	MKYKIGLDIGITSIGWAVINLDIPRIEDLGVRIFDRAENPKTGESLALPRRL ARSARRRLRRRKHRLERIRRLFVREGILTKEELNKLFEKKHEIDVWQLRV EALDRKLNNDELARILLHLAKRRGFRSNRKSERTNKENSTMLKHIEENQ SILSSYRTVAEMVVKDPKFSHLHKRNKEDNYTNTVARDDLEREIKLIFAKQ REYGNIVCTEAFEHEYISIWASQRPFASKDDIEKKVGCTFEPKEKRAPK ATYTFQSFTVWEHINKLRLVSPGGIRALTDDERRLIYKQAFHKNKITFHD VRTLLNLPDDTRFKGLLYDRNTTLKENEKVRFLELGAYHKIRKAIDS VY GKGAAKSRFPIDFDTFGYALTMFKDDTDIRSYLRNEYEQNGKRMENLA DKVYDEELIEELLNLSFSKFGHLSLKALRNILPYMEQGEVYSTACERAGY TFTGPKKKQKTVLLPNIPPIANPVVMRALTQARKVVNAIHKKYGSPVSIHI ELARELSQSFDERRKMQKEQEGNRKKNETAIRQLVEYGLTLNPTGLDIV KFKLWSEQNGKCAYSLQPIEIERLLEPGYTEVDHVIPYSRSLDDSYTNKV LVLTKENREKGNRTPAEYLGLGSRWQQFETFVLTNKQFSKKKRDRLLR LHYDENEENEFKNRNLNDTRYISRFLANFIREHLKFADSDDKQKVYTVN GRITAHLSRWNFNKNREESNLHHAVDAAIVACTTPSDIARVTAIFYQRR EQNKELSKKTDPPQFPQWPHFADELQARLSKNPKESIKALNLGNYDNEK LESLQPVFVSRMPKRSITGAHQETLRRYIGIDERSGKIQTVVKKKLSEIQ LDKTGHFPMYKESDPRTYEAIRQRLLEHNNDPKKAFQEPLYKPKKNGE LGPIIRTIKIIDTTNQVIPLNDGKTVAYNSNIVRVDFEKGDKYYCVPIYTI DMMKGILPNKAIEPNKPYSWKEMTEDYTFRFSLYPNDLIRIEFPREKTIK TAVGEEIKIKDLFAYYQTIDSSNGGLSLVSHDNFSLRSIGSRTLKRFEKY QVDVLGNIYKVRGEKRVGVASSSHSKAGETIRPL (配列番号 31)
ScCas9 <i>S. canis</i> 1375 AA 159.2 kDa	MEKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSSKKFKVLGNTNRKSIKKNLM GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRIRYLQEIFANEMAKLDDSF FQRLSEESFLVEEDKKNERHPIFGNLADEVAYHRNYPTIYHLRKKLADSP KADLRILIYALAHIIKFRGHFLIEGKLNAENSDVAKLFYQLIQTYNQLFEE SPLDEIEVDAKGILSARLSKSKRLEKLIIVFPNEKKNGLFGNIIALALGLTP NFKSNFDLTEDAKLQLSKDITYDDDLDELLGQIGDQYADLFSAAKNLSDA ILLSDILRSNSEVTKAPLSASMVKRYDEHHQDLALLKTLVRQQFPEKYAE IFKDDTKNGYAGYVGIGIKHRKRTTKLATQEEFYKFIKPILEKMDGAEEL LAKLNRDDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLKELHAILRRQEEFYFPLKENREKI EKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWLTRKSEEAITPWNFEVVDKGASAQS FIERMTNFDEQLPNKKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTERMKPEF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEIIGVEDRFNA SLGTYHDLKKIHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRHYTGWGRLSRKMINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF SNRNFMLIHDDSLTFKEEIEKAQVSGQGDSLHEQIADLAGSPAIIKKGIL

10

20

30

40

50

【表 10-10】

説明	配列
	QTVKIVDELVKVMGHKPENIVIAMARENQTTTKGLQQSRERKKRIEEGIK ELESQILKENPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV DHIVPQSFIDKDDSIDNKVLTRSVENRGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLL NAKLITQRKFDNLTKAERGGGLSEADKAGFIKRQLVETRQITKHVARILDS RMNTKRDKNDKPIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQLYKVRDINNYHHAH DAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKAT AKRFFYSNIMNFFKTEVKLANGERKRPLIETNGETGEVVWNKEKDFAT VRKVLAMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILSKRESAKLIPRKKGWDTRKY GGFGSPTVAYSILVVAKEKGKAKKLKSVKVLVGITIMEKGSYEKDPIGF LEAKGYKDIKKELIFKLPKYSLEFENGRRRMLASATELQKANELVLPQ HLVRLLYYTQNISATTGSNNLGIEQHREEFKEIFEKIIDFSEKYILKNKV NSNLKSSFDEQFAVSDSILLSNSFVSLKYTSFGASGGFTFLDLVDVKQGR RYQTVTEVLDAITLIYQSITGLYETRTDLSQLGGD (配列番号 32)

10

【0213】

本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターは、上のCas9オルソログ配列のいずれか、またはそれと少なくとも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%の配列同一性を有するそのいずれかのバリエーションを含んでもよい。

20

【0214】

本明細書に記載のPEmax構築物で利用されるnapDNABpは、Cas9などのいずれかの好適なホモログおよび/またはオルソログまたは天然に存在する酵素を含んでもよい。Cas9ホモログおよび/またはオルソログは*S. pyogenes*および*S. thermophilus*を含む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。Cas部分はニッカーゼとして構成されてもよく(例として、突然変異誘発されるか、組換え操作されるか、または別様に天然から得られる)、すなわち、標的二本鎖DNAの一本鎖のみを切断することが可能である。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とって明らかであり、このようなCas9ヌクレアーゼおよび配列は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Chylinski, Rhun, and Charpentier, “The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems” (2013) *RNA Biology* 10:5, 726-737に開示された生物および遺伝子座からのCas9配列を含む。一部の態様において、Cas9ヌクレアーゼは不活性な(例として、不活性化された)DNA切断ドメインを有する;すなわち、Cas9はニッカーゼである。一部の態様において、Cas9タンパク質は、上の表のCas9オルソログのいずれか1つによって提供されるCas9タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

40

【0215】

本開示はまた、本明細書において提供されるプライムエディターに以下の追加のnapDNABpを含むことを企図する。いずれかの好適なnapDNABpは、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターで使用されてもよい。様々な態様において、napDNABpは、いずれかのII型、V型、またはVI型CRISPR-Cas酵素を含む、いずれかのクラス2 CRISPR-Casシステムであってもよい。ゲノム編集のためのツールとしてのCRISPR-Casの急速な発展を考えると、Cas9およびCas9オルソログなどのCRISPR-Cas酵素を記載および/または同定するために使用される命名法が絶えず開発されてきた。本出願は、古いおよび/または新しくてもよい命名法を有するCRISPR-

50

Cas酵素を参照する。当業者は、使用されている命名法に基づいて、それが古い(すなわち、「レガシー」)命名法であるか新しい命名法であるかにかかわらず、本出願で言及されている特定のCRISPR-Cas酵素を同定することができる。CRISPR-Cas命名法は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Makarova et al., “Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here?”, *The CRISPR Journal*, Vol. 1, No. 5, 2018において広く議論されている。本出願のいずれかの所与の事例で使用される特定のCRISPR-Cas命名法は、決して限定的ではなく、当業者は、どのCRISPR-Cas酵素が参照されているかを識別することができる。

【0216】

例えば、以下のII型、V型およびVI型のクラス2 CRISPR-Cas酵素は、当技術分野で認識されている以下の古い(すなわち、レガシー)および新しい名称を有する。これらの酵素および/またはそのバリエーションのそれぞれは、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターと共に使用されてもよい。

【表11】

レガシー命名法	現行の命名法*
II型CRISPR-Cas酵素	
Cas9	ii
V型CRISPR-Cas酵素	
Cpf1	Cas12a
CasX	Cas12e
C2c1	Cas12b1
Cas12b2	ii
C2c3	Cas12c
CasY	Cas12d
C2c4	ii
C2c8	ii
C2c5	ii
C2c10	ii
C2c9	ii
VI型CRISPR-Cas酵素	
C2c2	Cas13a
Cas13d	ii
C2c7	Cas13c
C2c6	Cas13b

*Makarova et al., *The CRISPR Journal*, Vol. 1, No. 5, 2018を参照されたい

【0217】

本開示の方法および組成物において利用されるプライムエディターに関連して使用される様々なnapDNABpの以下の説明は、決して限定することを意味するものではない。プライムエディターは、公知であるかまたは指向性進化もしくはそれ以外に変異誘発プロセスによって作製もしくは進化することができるカノニカルなSpCas9またはいずれかのオルソログCas9タンパク質またはいずれかのバリエーションCas9タンパク質を含んでもよく、Cas9のいずれかの天然に存在するバリエーション、突然変異体、またはそうでなければ操作されたバージョンを包含する。様々な態様において、Cas9またはCas9バリエーションはニッカーゼ活性を有し、すなわち標的DNA配列の一方の鎖のみを切断する。他の態様において、Cas9またはCas9バリエーションは不活性なヌクレアーゼを有し、すなわち「不活性型」Cas9タンパク質である。使用されてもよい他のバリエーションCas9タンパク質は、カノニカルなSpCas9よりも小さい分子量を有する(例として、より容易な送達のために)かまたは改変もしくは再配置された一次アミノ酸構造(例として、環状置換体フォーマット)を有するものである。

【0218】

本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターはまた、収束進化の結果であるCas12a(Cpf1)およびCas12b1タンパク質を包含するCas9等価物

を含んでもよい。本明細書において使用されるnapDNAbp(例として、SpCas9、Cas9バリエーション、またはCas9等価物)は、それらのPAM特異性を変更/増強する種々の改変を含有してもよい。最後に、本出願は、参照Cas9配列、例えば参照SpCas9のカノニカルな配列または参照Cas9等価物(例として、Cas12a(Cpf1))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等価物を企図する。

【0219】

一部の態様において、napDNAbpは、標的配列内および/または標的配列の補体内などの標的配列の位置において一方または両方の鎖の切断を導く。一部の態様において、napDNAbpは、標的配列の最初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、またはそれより多くの塩基対内で、一方または両方の鎖の切断を導く。一部の態様において、ベクターは、突然変異したnapDNAbpが標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を切断する能力を欠くように、対応する野生型酵素に関して突然変異したnapDNAbpをコードする。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への置換(D10A)は、両鎖を切断するヌクレアーゼからニッカーゼ(一本鎖を切断する)へとCas9を変換する。Cas9をニッカーゼにする突然変異の他の例は、限定されないが、カノニカルなSpCas9配列を、または他のCas9バリエーションもしくはCas9等価物の同等のアミノ酸の場所を参照して、H840A、N854A、およびN863Aを包含する。

【0220】

本明細書において使用される場合、「Casタンパク質」という用語は、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、または本開示の方法に必要とされるすべしもしくは有意な量の不可欠の基本機能、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ム型結合の所有および(ii)1つの鎖上で標的DNA配列がニックを有する能力をそれでもなお保持するCasタンパク質のいずれかの断片を指す。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、およびCas9等価物、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型Cas9(dCas9))ホモログ、オルソログ、またはパラログを、天然に存在するかまたは天然に存在しないか(例として、操作されたかまたは組み換えか)にかかわらず包含し、いずれかのクラス2 CRISPRシステム(例としてII、V、VI型)からのCas9等価物を包含してもよく、Cas12a(Cpf1)、Cas12e(CasX)、Cas12b1(C2c1)、Cas12b2、Cas12c(C2c3)、C2c4、C2c8、C2c5、C2c10、C2c9、Cas13a(C2c2)、Cas13d、Cas13c(C2c7)、Cas13b(C2c6)、およびCas13bを包含する。さらなるCas等価物は、その内容が参照により本明細書に組み込まれる、Makarova et al., “C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector,” Science 2016;353(6299)およびMakarova et al., “Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here?,” The CRISPR Journal, Vol.1.No.5, 2018、に記載されている。

【0221】

「Cas9」または「Cas9ヌクレアーゼ」または「Cas9部分」または「Cas9ドメイン」という用語は、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等価物またはその機能的断片、いずれかの生物からのいずれかのCas9ホモログ、オルソログ、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のいずれかの突然変異体またはバリエーションを包含する。Cas9という用語は特に限定することを意味せず、「Cas9または等価物」と呼ばれてもよい。例示的Cas9タンパク質は本明細書にさらに記載され、および/または当技術分野において記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。本開示は、本明細書に記載の方法および組成物におい

10

20

30

40

50

て利用されるプライムエディターにおいて採用される特定のCas9に関して制限されない。

【0222】

本明細書において述べるように、Cas9ヌクレアーゼ配列および構造は当業者に周知である(例として、それらの各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、“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)を参照されたい)。

10

【0223】

Cas9およびCas9等価物の例が以下の通り提供される;しかしながら、これらの特定の例は限定的であることを意味しない。本開示の方法および組成物において利用されるプライムエディターは、いずれかの好適なCas9またはCas9等価物を包含するいずれかの好適なnapDNABpを使用してよい。

20

【0224】

A. 野生型のカノニカルなSpCas9

一態様において、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディター構築物は、*S. pyogenes*由来の「カノニカルなSpCas9」ヌクレアーゼを含んでもよく、これは、ゲノム操作のためのツールとして広く使用されており、クラス2 CRISPR-Casシステムの酵素のII型サブグループとして類別される。このCas9タンパク質は、2つの別個のヌクレアーゼドメインを含有する大きいマルチドメインタンパク質である。1つのまたは両方のヌクレアーゼ活性を廃止するための点突然変異がCas9上に導入され得、それぞれニックアーゼCas9(ncas9)または不活性型Cas9(dCas9)をもたらし、これは、sgRNAによってプログラムされる様式でDNAに結合するその能力をなお保持する。原理的には、別のタンパク質またはドメインに融合される場合に、Cas9またはそのバリエーション(例としてncas9)は、単純に適当なsgRNAとの共発現によって、そのタンパク質を実質的にいずれかのDNA配列へと標的化し得る。本明細書において使用される場合、カノニカルなSpCas9タンパク質は、以下のアミノ酸配列を有する*Streptococcus pyogenes*からの野生型タンパク質を指す:

30

40

50

【表 1 2 - 1】

説明	配列	配列番号
SwissProt 受託番号-Q99ZW2 <i>Streptococcus pyogenes</i> (♂) SpCas9 逆転写	ATGGATAAAAAATATAGCAATTGGCCTGGATAATTGGCACCAACAGCGTGGGC TGGGCGGTGATTACCGATGAATATAAAGTGCCGAGCAAAAAATTTAAAGTG CTGGGCAACACCGATCGCCATAGCATTAAAAAAAACCTGATTGGCGCGCTG CTGTTTGATAGCGGCGAAACCGCGGAAGCGACCCGCTGAAACGCACCGCG CGCCGCCGCTATACCCGCCGCAAAAACCGCATTTGCTATCTGCAGGAAATTT TTAGCAACGAAATGGCGAAAGTGGATGATAGCTTTTTTCATCGCCTGGAAGA AAGCTTTCTGGTGGGAAGAAGATAAAAAACATGAACGCCATCCGATTTTGG CAACATTGTGGATGAAGTGGCGTATCATGAAAAATATCCGACCATTATCAT CTGCGCAAAAAACTGGTGGATAGCACCGATAAAGCGGATCTGCGCCTGATT TATCTGGCGCTGGCGCATATGATTAAATTTTCGCGGCCATTTTCTGATTGAAG GCGATCTGAACCCGGATAACAGCGATGTGGATAAACTGTTTATTCAGCTGGT GCAGACCTATAACCAGCTGTTTGAAGAAAACCCGATTAACGCGAGCGGCGT GGATGCGAAAGCGATTCTGAGCGCGCGCCTGAGCAAAAGCCGCCGCTGGA AAACCTGATTGCGCAGCTGCCGGGCGAAAAAAAACGGCCTGTTTGGCAA CCTGATTGCGCTGAGCCTGGGCCTGACCCGAACTTTAAAAGCAACTTTGAT CTGGCGGAAGATGCGAAACTGCAGCTGAGCAAAGATACCTATGATGATGAT CTGGATAAACCIGCTGGCGCAGATTGGCGATCAGTATGCGGATCTGTTTCTGG CGGCGAAAAACCTGAGCGATGCGATTCTGCTGAGCGATATTCTGCGCGTGA ACACCGAAATTACCAAAGCGCCGCTGAGCGCGAGCATGATTAAACGCTATG ATGAACATCATCAGGATCTGACCCTGCTGAAAGCGCTGGTGCGCCAGCAGC TGCCGGA AAAAATATAAAGAAATTTTTTTTGATCAGAGCAAAAACGGCTATG CGGGCTATATTGATGGCGGCGCGAGCCAGGAAGAATTTTATAAATTTATTAA ACCGATTCTGGAAAAAATGGATGGCACCGAAGAAGTCTGGTGAAACTGAA CCCGGAAGATCTGCTGCGCAACAGCGCACCTTTGATAACGGCAGCATTC GCATCAGATTTCATCTGGGCGAACTGCATGCGATTCTGCGCCGCCAGGAAGAT TTTTATCCGTTTCTGAAAGATAACCGCGAAAAAATTGAAAAAATTCTGACCT TTCGCAATCCGTATTATGTGGGCCCCGCTGGCGCGCGGCAACAGCCGCTTTGC	8

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

【表 1 3】

SpCas9変異(カノニカルなSpCas9配列のアミノ酸配列、配列番号9に対して)	機能/特徴(報告済)(UniProtKB-Q99ZW2 (CAS9 STRPTI)エントリーを参照されたい- 参照により本明細書に組み込まれる)
D10A	プロトスパーサー鎖を切断するニックアーゼ変異(非プロトスパーサー鎖の切断はしない)
S15A	DNA切断活性の低下
R66A	DNA切断活性の低下
R70A	DNA切断なし
R74A	DNA切断の減少
R78A	DNA切断の減少
97-150 欠失	ヌクレアーゼ活性なし
R165A	DNA切断の減少
175-307 欠失	DNA切断の約50%の減少
312-409 欠失	ヌクレアーゼ活性なし
E762A	ニックアーゼ
H840A	非プロトスパーサー鎖を切断するが、プロトスパーサー鎖を切断しないニックアーゼ変異
N854A	ニックアーゼ
N863A	ニックアーゼ
H982A	DNA切断の減少
D986A	ニックアーゼ
1099-1368 欠失	ヌクレアーゼ活性なし
R1333A	DNA結合の低減

10

20

【0 2 2 6】

B. 野生型Cas9オルソログ

他の態様において、Cas9タンパク質は、*S. pyogenes*からのカノニカルなCas9とは異なる別の細菌種からの野生型Cas9オルソログであり得る。例えば、以下のCas9オルソログは、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディター構築物に関連して使用され得る。加えて、下のオルソログ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%、または少なくとも99%の配列同一性を有するいずれかのバリエーションCas9オルソログもまたプライムエディターと共に使用されてもよい。

30

【表 1 4 - 1】

説明	配列
LiCas9 <i>Lactobacillus fermentum</i> 野生型 GenBank: SNX31424.1 1	MKEYHIGLDIGTSSIGWAVTDSQFKLMRIKGGKTAIGVRLFEEGKTAERRTFRTRRRRLKR RKWRLHYLDEIFAPHLQEVDENI ¹ LRRLKQSNHPEDPTKNQAFIGKLLFPDLLKKNERGY TLIKMRDELPVEQRAHYPMNTYKLREAMINEDRQF ² DLREVYLAVHHIVKYRGHFLNNA SVDKFKVGRIDFDKSFNVLNEAYEELQNGEGSF ³ TI ⁴ EP ⁵ SKVEKIGQLLLDTKMRKLD ⁶ RQKA VAKLLEV ⁷ KVADKEET ⁸ KRN ⁹ KQIATAMSKLV ¹⁰ LG ¹¹ YKAD ¹² FATVAMANGNEWKIDLSSETSED EIEK ¹³ FREELSDAQNDILTEITSLFSQIMLNEIVPNGMSISESMMDRYW ¹⁴ THERQLAEVKEYLA TQPASARKEFDQVYNKYIGQAPKERGF ¹⁵ DL ¹⁶ EKGLKKILSKKENWKEIDELLKAGDFLPKQR TSANGVIPHQMHQ ¹⁷ QELDRIIEKQAKYYPWLATENPATGERDRHQAKYELDQLVSFRIPYY VGPLVTPEVQKATSGAKFAWAKRKEDGEITPWNLWDKIDRAESAEAFIKRMTVK ¹⁸ DTYLL NEDVLPANSLLYQKYNVNLNELNNVRVNGRRLSVGIKQDIYTELFKKKKTVKASDVASLV MAKTRGVNKPSVEGLSDPKKFNSNLATYLDLKSIVGDKVDDNRYQT ¹⁹ DLENII ²⁰ EWRSVFED GEIFADKLTEVEWLTDEQRSALVKKRYKGWGRLSKKLLTGIVDENGQRIIDL ²¹ MWNTDQN FKEIVDQPVIFKEQIDQLNQKAITNDGMTLRERVESVLDDAYTSPQNKKAIWQVVRVVEDI VKA ²² VGNAPK ²³ SISIEFARNEG ²⁴ NKGEITRSRRTQLQKLFEDQAHEL ²⁵ VKDTSLTEELEKAPDLS DRYYFYFTQGGKDMYTGD ²⁶ PI ²⁷ NFDEISTKYDIDHILPQSFVKD ²⁸ NSLDNRVLT ²⁹ SRKEN ³⁰ NKKS DQVPAKLYAAKMKPYWNQLLKQGLITQRKFENLTKDVDQNIKYRSLG ³¹ IVKRQLVETRQ VIKLTANILGSMYQEAGTEI ³² ET ³³ RA ³⁴ GLTKQLREEFDLPK ³⁵ VREVNDYHHA ³⁶ VDAYLTTFAGQ

40

50

【表 1 4 - 2】

説明	配列
	YLNRRYPKLSFFVYGEYMKFKHGSDDLKLRNFNFHHELMGDKSQGKVVDQQTGELITTRDEVAKSFDRLLNMKYMLVSKEVHDRSDQLYGATIVTAKESGKLTSPIEIKKNRLVDLYGAYTNGTSAI-MTIKIFTGNPKYKVGIPITSAASLKRAGKPGSESYNQELHRIKSNPKVKGFEIVVPHVSYGQLIVDGDCKITLASPTVQHPATQLVLSKKSLETISSGYKILKDKPAIANERLIRVFDEVVGMNRYFTIFDQRSNRQKVADARDKFLSLPTESKYEGAKKVQVGKTEVITNLLMGLHANATQGDLLKVLGLATFGFFQSTTGLSLEDTMIVYQSPTGLFERRICLKDI (配列番号 20)
SaCas9 <i>Staphylococcus aureus</i> 野生型 GenBank: AYD60528.1	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRNKRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSESLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDDTDKADLRILYLALAHMIKIRGHI-FLIEGDLNPDNSDVIDKLFIQLVQTYNQLEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDQTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAANKLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIIFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFKPILEKMDGTRELLVKNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPIFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAVDILLKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECTDSVEISGVEDRI-NASLGTYHDLKIKKDKDFLDNEEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIDKQSGKITLDFLKSDFANRNFQILHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGSNDNPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSLLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNTVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFNPIDFLEAGYKEVKDILIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLASHYEKLKGSPEEDNEQKQLFVLEQHKHYLDEIIQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKR YTSTKEVLDATLIHQSTIGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 259)
SaCas9 <i>Staphylococcus aureus</i>	MGRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRLRRRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRITYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEKEFQIENVIKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEITNLKVYHDIKDITARKEIENAEELDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLSELTEQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIEELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVKEEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKEGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSLRRKWKFKKERNKGYKHAEDALIANADFIKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNLTIVNNLGLYDKDNDKLLKLINKSPEKLLMYHHDPTQYQKLKLIMEQYGDENPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNBPVKKIKIYYGNKLNALHDITDDYPNSRNKVVKLKLPYRFDVYLDNGVYKFTVTKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKLKKISNQAEIFASIFYKNDLIKINGELYRVIGVXNDLLNRIEVENMIDITYREYLENMNDKRPPIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKK (配列番号 21)
StCas9 <i>Streptococcus thermophilus</i> UniProtK-B/Swiss-Prot: G3ECR1.2野生型	MLFNKCHISNLDISNKEKCMTPYSIGLDIGTNSVGWAVITDNYKVPSSKMKVLGNTSKKYIKKNLLGVLLFDSGITAEGRRLKRTARRRYTRRNRLYLQEIFSTEMATLDDAFTQRLDDSLVLPDDKRDSPYPIFGNLVEEKVYHDEIPTIYHLRKYLAADSTKADLRVLVYLAALAHMIKIRGHI-FLIEGEFNSKNNDIQNI-QDFLDITYNAIFESDLSLENSKQLEEVKDKISKLEKKDRILKLPGEKNSGHI-SEFLKLIVGNQADIRKCFNLDEKASLHFSKESYDEDELETLGIGIDDYSDVFLKAKKLYDAILLSGFLTVTDNETEAPLSSAMIKRYNEHKEDLALLKEYIRNLSLKTYNFVFKDDTKNGYAGYIDGKTNQEDFYVYLKNLLAEIFEGADYFLEKIDREDILRKQRTFDNGSPIYQIHLQEMRAILDQAKFYPLAKNKERIEKILTFRIPYYVGPLARGNSDFAWSIRKNEKITPWNFEDVIDKESSAEAFINRMTSFDLYLPEEKVLPKHSLLYETTFNVYNELTKVRFIAESMRDYQFLDSKQKKDIVRLYFKDKRKVTDKDIIEYLHAIYGYDGIELKGIEKQFNSSL

10

20

30

40

【表 1 4 - 3】

説明	配列
	STYHDLNINNDKEFLDDSSNEAHEEIHHTLTIFEDREMIKQRLSKFENIFDKSVLKKLSRRH YTGWGKLSAKLINGIRDEKSGNTILDYLIDDGISNRNFMQLIHDDALSHKKIKQAQIIGDE DKGNIKEVVKSLPGSPAIIKKGILQSIKIVDELVKVMGGRKPESIVVEMARENQYTNQGKSN SQQLRKRLKSLKELGSKILKENIPAKLSKIDNNALQNDRLYLYYLQNGKDMYTGDLDLI DRLSNYDIDHIIPQAFKDNISIDNKVLVSSASNRGKSDDFPSLEVVKRRKTFWYQLLKSKL ISQRKFDNLTKAERGGLLPEDKAGFIQRQLVETRQITKHVARLLDEKFNKKDENNRVR TVKIITLKSTLVSQFRKDFELYKVRINDFHHAHDAYLNAVIASALLKKYPKLEPEFVYGD YPKYNSFRERKSATEKVYFYSNIMNIFKKSISLADGRVIERPLIEVNEETGESVWNKESDLA TVRRVLSYPQVNVVKKVVEEQNHGLDRGKPKGLFNANLSSKPKPNSNENLVGAKEYLDPK KYGGYAGISNSFAVLVKGTEKGAKKKITNVLEFQGISILDRIYRKDKLNFLLKGYKDIE LHIELPKYSLFELSDGSRRLMASILSTNNKRGEIHKGNQIFLSQKFVKLLYHAKRISNTINEN HRKYVENHKKFEELFYILEFNENYVGAKKNGKLLNSAFQSWQNHSDIELCSSFSGPTGS ERKGLFELTSRGSAADEFELGVKIPRYRDYTPSSLLKDATLIHQSVTGLYETRIDLAKLGE (配列番号: 22)
LcCas9 <i>Lactobacillus</i> <i>crispatus</i> NCBI参照配列 WP_133478044.1 野生型	MKIKNYNLALTPTS AVGHVEVDDDLNILEPVHHQKAIGVAKI'GEGETAEARRLARSARR TTKRRANRINHYNEMKPEIDKVDPLMFDRKQAGLSPLDERKEFRTVIFDRPNTASYHN QFPTIWHLQKYLMTTDEKADIRLIYWALHSLKHRGHFTNTTPMSQFKPGKLNKDDMLA LDDYNDLEGLSFAVANSPEIEKVIKDRSMHKKKIAELKKLIVNDVPDKDLAKRNNKIITQ IVNAIMGNSFHLNHFDMDLDKLTSKAWSFKLDDPELDTKFDASISGSMTDNQIGHFETLQKI YSAISLLDILNGSSNVDAKNALYDKHKRDLNLYFKFLNLTLPDEIAKTLKAGYTYLIGNRK KDLLAARKLLKVNVAKNISQDDIYKLINKELKSIDKQGLQTRISEKVGELVAQNNILPV QRSSDNVFIPIQLNAITFNKILENQGKYDFLVKPNPAKKDRKNAPYELSQLMQFTIPYYV GPLVITPEEQVSGIPKTSRFAWMVRKDN'GAITPWNIYDKVDIEATADKIFIKRSIAKDSYLL SELVLPKHSLLYEKYEVEFNELSNVSLDGKKLSGGVKQILFNEVPKKTNKVNTSRILKALA KHNPGSKITGLSNPEEFTSSLQTYNAWKKYFPNQIDNFA'YQQDLEKMIEWSTVFEDHKIL AKKLEDEIWLDDDQKKI'VANTRLRGWGRLSKRLLTGLKDNYGKSIMQRLETTKANIFQOI VYKPEFREQIDKISQAAKNQSLDILANSYTPSNRKAIRKTMVVDYIKLNHGKEPDK IFLMFQRSEQEKKGQTEARSKQLNRILSQLKADKSANKLFSKQLADEFSNAIKKSKYKLN DKQYFYFQQLGRDALTEVIDYDELYKYTVLHIIPRSKLTDDSQNNKVLTKYKIVDGSVA LKFGNSYSDALGMPIKAFWTELNRKLIPKGLNLNLTDFSLNKYQRDGYIARQLVETQ QIVKLLATIMQSRFKHTKIIEVRNSQVANIRYQF'DYFRIKLNLEYYRGFDAYLA'AVVGTYL YKLYPKARRLFVYGGYQLPKKTNQENQDMHLDSEKKSQGFN'FLWNLLYGKQDQIFVNG TDVIAFNKDLITKMTNVYNYKSQKISLAIDYHNGAMFKATLFPNRNDRDTAKTRKLIPKK KDYDTDIYGGYTSNV'DGYMLLAEIIRKDGNGKQYGFYGVPSRLVSELDLTKTRYTEYEEK LKEIHKPELGVDLKKIKKIKILKNKVPFNQVIIDKGSKFFITSTS'YRWNYRQLLSAESQQT MDLVVDPDFSNHKKARKDARKNADERLIKVYEILYQVKNYMPMFV'ELHRCYEKLVD'AQ KTFKSLKISDKAMVLNQILILLHSNATSPVLEKLG'YHTRFTLGGKHNLISENAV'LV'TQSI'G LKENHVSIIKQML (配列番号: 23)
PdCas9 <i>Pedicoccus</i> <i>damnosus</i> NCBI参照配列 WP_062913273.1 野生型	MTNEKYSIGLDIGTSSIGFAVNVNDNNR'VIRVKGN'AIGVRLFDEGKAAADRRSFR'ITRRSF RTTTRRLSRRRWRLKLLREIFDAYITPVDEAF'IRLKE'NLSPKDSKKQYSGDILFNDRSDK DFYEKYPTIYHLRNALMTEHRKIFDVREIYLA'HHIMKFRGH'FLNATPANNIFKVGRLNLEE KFEELNDIYQRFVPEDESIEFRTDNLEQI'KEVLLDNKRSRADRQRTLVS'DIYQSS'EDKDIEKR NKAVATEILKASLG'NKA'KLNVITNVEVDKEAAKEWSTTFDESIDDDLAKIEGQMTDDGH EIIIEVLRSLYSGITLSAIVPENHTLSQSMVAKYDLHKDHLKLF'KKLINGMTDT'KKA'KNLRA AYDGYIDGVKGKVL'PQEDFYKQVQVNLDDSAEANEIQT'YIDQDIFMPKQRTKANGSIPHQ LQQQELDQIENQKAYYPWLAELNPNPDKKRQQLAKYKLDELVT'RVPPYVVGPMITAKD QKNQSGAEFAWMIRKEPGNITPWNIDQKVDRMATANQIF'KRM'TTDTYLLGEDVLP'QAS LLYQKFEVLN'ELNKIRIDHKPISIEQKQIFNDL'FKQFKNV'IKHLQDYLVSQGGYSKRPLI EGLADEKRI'NSSLSTYS'DL'CGIIFGAKLVEENDRQEDLEKII'EWSTIFEDKKIYRAKLN'DLT WLTDQKEKLAT'KRYQGWGRLSRKL'LVGLKNSEHRNIMDILWITNENFMQI'QAE'PDFAK LVT'DANKGMEKTDSQDVINDLYTSPQNKKAIRQILLV'VHDIQNAMHGQAPAKIHVEFAR GEERNPRRSVQRQ'VEAA'YEKVSNELVSAKVRQEF'KEAINNKRDI'KDRLLFY'FMQGGI DIYT'GKQNLIDQLSSYQIDHILPQAFVKDDSLTN'RVLTNENQVKADSVPIDIFGKKMLSVW GRMKDQGLISKGYRNLTMN'PENISAHTENGFINRQLVETRQVIKLA'VNILADEYGDSTQI ISVKADLSHQMREDFEL'KNRDVNDYHHA'FDAYLA'AFIGNYLLKRYPKLESY'FVYGDIFK KFTQKETKMRRFNFIYDLKHCDQV'VNKETGEILWTKDEDIKYIRHLFAYKKILVSHEVRE KRGALYNQTIYKAKDDKSGSQESKKLIRIKDDKETKIYGGYSGKSLAYMTIVQITKKNKV SYRVIGIPTLALARLNKLENDSTENNGELYKIKPQI'HYKVDKKNGEI'ETDDFKIVVSK VRFQQLIDDAGQF'MLASDTYKNNAAQQLVISN'NALKAINNTNITDCPRDDLERLDNLRLD

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 4】

説明	配列
	SAFDEIVKKMDKYFSAYDANNFREKIRNSNLIFYQLPVEDQWENNKITELGKRTVLTRILQ GLHANATTIDMSIIFKIKTPIFQQLRQRSGISLSENAQLIYQSPITGLIERRVQLNKIK (配列番 号 24)
FnCas9 <i>Fusobacterium nucleatum</i> NCBI参照配列 WP_060798984.1	MKKQKFSDDYLLGFDIGTNSVGVWCVTDLDYNVLRFNKKDMWGSRLFEEAKTAAERRVQ RNSRRRLKRRKWRLNLLLEHFSNEILKIDSNIFRRLKESSLWLEDKSSKEKIFLFDNDNYK DYDFYKQYPTIFHLRNELIKNPEKKDIRLVYLAHSIFKSRGHFLFEGQNLKEIKNFETLYN NLIAFLEDNGINKIIDKNNEIEKLEKIVCDSKKGLKDKEKEFEIFNSDKQLVAIFKLSVGSSV SLNDLFDTDEYKKGEVEKEKISIREQIYEDDKPIYYSILGEKIELLDIAKTFYDFMVLNNILA DSQYISEAKVKLYEEHKKDLKNLYIIRKYNKGNYDKLFDKDNENYSAYIGLNKEKSK KEVIEKSRLKIDDLIKNIKGYLPKVEEIEEKDAIIFNKILNKIELKTILPKQRISDNGTLPIYQI HEAELEKILENQSKYYDFLNYEENGITTKDKLLMTIFKFRIPYYVGPLNSYHKDKGGNSWIV RKEEGKILPWNFEQKVVDIEKSAEEFIKRMNTNKCTYLNAGEDVIPKDTFLYSEYVILNELNKV QVNDDEFNLNEENKRKHIDELFKENKKVSEKKFKKEYLLVKQIVDGTIELKGVKDSFNSNYISYI RPFKDIFGEKLNLDIYKEISEKSILWKCLYGDDKKIIEKKIKNEYGDLTKDEIKKINTIFKFN WGRLEKELLTGIEFNLLETGECYSSVMDALRRNTNYNLMELLSSKFTLQESINNENKEMNEA SYRDLIEESYVSPSLKRAIFQTLKIYEEIRKITGRVPKKVFIEMARGGDESMKNKKIPARQE QLKKLYDSCGNDIANFSIDIKEMKNSLISYDNNSLRQKKLYLYLQFGKCMYTGREIDLD RLLQNNDTYDIDHIYPRSKVIKDDSFNLLVLKNENAIEKSNEYPVKKEIQEKMKSFWRP LKEKLFISDEKVIKKRLTGKDDIFELRGFIMARQLVNVVRQTTEKVGKILQQIEPEIKIVYSKAI ASSFREMFDFIKVRELNDTHAKDAYLNIVAGNVYNTKFTKPYRYLQEIKENYDVKKIY NYDIKNAWDKENSLEIVKKNMEKNTVNITRFIEKEKQGLFDLNPICKGETSNEIISIKPKVY NGKDDKLEKYGYYKSLNPAFYLYVEHKEKNRIKSFERNLVVDVNNIKDEKSLVKYLI ENKKKELEPVKRTKRNDIFYVKKQVIEPIKKKVSDAVALTKLSEIESLIEVDKYLPLQVNS LEDNQKSEENYKFIYLKKKDRYEKNETLESVKDRYNLEFNEMYDKFLEKLDISKDYKNY MNNKKYQELLDVKEKFIKLNLFDAFTLKSFLDLFNRTMADFSKVGTLTKYLGKIQKISS NVLSKNELYLLEESVTGLFVKKIKL (配列番号 25)
EeCas9 <i>Enterococcus cecorum</i> NCBI参照配列 WP_047338501.1 野生型	RRKQRIQILQELLGEEVLKTDPGFTHRMKESRYVVEDKRTLDGKQVELPYALFVDKDYTD KEYYKQPTINHLIVYLMTTSDTPDIRLVYLAHYYMKNRGNFLHSGDINNPKDINDILEQ LDNVLETFLDGWNLLKLSYVEDIKNIYNRDLGRGERKKAFFVNTLGAKTAKAKAICSLISG GSTNLAEFLDSSSLKEIETPKIEFASSLEDKIDGIEALEDRFAVIEAAKRLYDWKTTLTDIL GDSSSLAEARVNSYQMHHEQLLELKSIVKEYLDRKVFQEVFVSLNVANNYPAYIGHTKI NGKKKELEVKRTKRNDIFYVKKQVIEPIKKKVSDAVALTKLSEIESLIEVDKYLPLQVNS DNGVIPYQVKLNELTRIFDNLNRIPLVRENDRDKIITFKFRIPYYVGSNGVVKNGKCTN WMVKEEGKIYPWNFEDKVDLEASAEQFIRRMNTNKCTYLVNEDVLPKYSLLYSKYLVLS ELNNLRIDGRPLDVKIKQDIYENVFKKNRKYTLKKIKKYLLKEGHTDDDELSGLADDVKS SLTAYRDFKEKHLDLSEAQMENIILNITLFGDDKLLKKRLAALYPHDDKSLNRIATLN YRDWGRLSERFLSGITVSDQETGELRTIIQCMYETQANLMQLLAEPYHIVEAIEKENPKVD LESISYRIVNDLYVSPAVKRQIWQTLVVIKDIKQVMKHDPERIFEMAREKQESKKTSSRK QVLSEVYKKAKEYEHLFEKLSLSTEEQLRSKKIYLYFTQLGKCMYSGEPIDFENLVANS NYDIDHIYPSKTTIDDSFNIVLVKKSLSNAYKSNHYPIDKNIRDNEKVKTLWNTLVSKGLI TKEKYERLIRSTPFSDEELAGFIARQLVETRQSTKAVAEILSNWFPSEIIVYSKAKNVSNFR QDFEILKVRELNDCHHAHDAYLNIVVGNAHYHTKFTNSPYRFIKNKANQEYNLRKLLQKV NKIESNGVVAWVGQSENNPGTIAITVKKVIRRNITVLISRMVKEVDGQLFDLTLMKKGKGO VPIKSSDERLTDISKYGGYNKATGAYFTFVKSKKRKGKVVRSFEYVPLHLSKQFENNEL KEYIEKDRGLTDVEILPKVLINSLFRYNGSLVRITGRGDTRLLLVHEQPLYVSNFVQQLK SVSSYKLKKSSENDAKLTKTATEKLSNIDELYDGLLRKLDLPIYSYWFSSKEYLVESTRK YIKLSIEEKALVIFELHLFQSDAQVPNLKILGLSTKPSRIRIQKNLKDIDKMSIHHQSPSGIIE HEIELTSL (配列番号 26)
AhCas9 <i>Anaerostipes hadrus</i> NCBI参照配列 WP_044924278.1 野生型	MQNGFLGITVSSEQVGWAVTNPKYELERASRKDLWGVRLFDKAETAEDRRMFRTRRL NQRKKNRHILYLRDIFHEEVNQKDPNTFQQLDESNFCEDDRTVEFNFDNLNLYKNQFPTVYH LRKYLMEKDKPDIRLVYLAFSKFMKNRGHFLYKGNLGEVMDFENSMMKGFCESELEKFN DFPTLSDEQVKEVRDILCDHKIAKTVKKKNITITKVKSKTAKAWIGLFCGCSVPVKVLFQ DIDEIIVTDEKISFEDASYDDYIANIEKGVGIYYEAIVSAMFLDWSILNEILGDHQLLSDA MIAEYNKHHDLLKRLQKIIKGTGSRELYQDIFINDVSGNYVCYVGHAKTMSSADQKQFY TIFLKNRLKNVNGISSEDAEWIDTEIKNGTLLPKQTKRDNVIPHLQLLREFELILDNMQEM YPFLKENREKLLKIFNFVIPYYVGPLKGVVRKGESTNWMVPKKDGVIIHPWNFDEMVDKE ASAECFISRMGTGNSYLFNEKVLKNSLLYETFEVLNELNPLKINGEPISVELKQRIYEQLF LTGKKVTKKSLTKYLIKNGYDKDIELSGIDNEFHSNLKSHIDFEDYDNLSDREEVEQIILRITV FEDKQLLKDYLNREIVKLSSEDERKQICSLSYKGWGNLSEMLLNGITVTDSNGVEVSMD

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 5】

説明	配列
	MLWNTNLNLMQILSKKYGYKAEIEHYNKEHEKTIYNREDLMDYLNIPPAQRRKVNQLITI VKSLKKTYGVPNKIFFKISREHQDDPKRTSSRKEQLKYLYKSLKSEDEKHLMKELDELND HELSDNKVYLYFLQKGRCIYSGKKLNLRLRKSNNYQNDIDYIYPLSAVNDRSMNNKVLTG IQENRADKYTYFPVDSEIQKKMKGFWMELVLQGFMTKEKYFRLSRENDFSKSELVSFIER EISDNQQSGRMIA SVLQYYFPESKIVFVKEKLISFKRDFHLISSYGHNLQA AKDAYITIV VGNVYHTKFTMDPAIYFKNHKKRDYDLNRLFLENISR DGQIAWESGPYGSIQTVRKEYAQ NHIAVTKRVVEVKGGLFKQMP LKKGHGEYPLKTN DPFNGNIAQYGGYTNTVTSYFVLVE SMEKGKKRISLEYVPVYLHERLEDDPGHKLLKEYLV DHRKLNHPKILLAKVRKNSLLKID GFYYRLNGRSGNALITNAVELIMDDWQTKTANKISGYMKRRADKKARVYQNEFHIE LEQLYDFYLDKLNKVYKNRKNNQAEIHNKEKEQFMELKTEDQC VLLTEIKKLFVCSPM QADLT LIGGSKHTGMIAMSSNVTKADFAVIAEDPLGLRNKVIYSHKGEK (配列番号 27)
KvCas9 <i>Kandleria vitulina</i> NCBI参照配列 WP_031589969.1 野生型	MSQNNNKIYNIGLDIGDASVGWAVVDEHYNLLKRHGKHMWGSRLFTQANTAVERRSSR STRRRYNKRREIRILLREIMEDMVLVDVPTFFIRLANVSLDQEDKKDYLKENYHSNYNL FIDKDFNDKTYDYDKYPTIYHLRKLHLCESKEKEDPRLIYLALHHIVKYRGNFLYEGQKFSM DVSNIEDKMIDVLRQFNEINLFEYVEDRKKIDEVLNVLKEPLSKKHKA EKAFALFDTTKD NKAAYKELCAALAGNKFNVTKMLKEAELHDEDEKDISFKFSDATFDDAFVEKQPLLGDC VEFIDLLHDIYSWVELQNLGSAHTSEPSISAAMIQRYEDHKNDLKLLKDVIRKYLPKKYF EVFRDEKSKNNYCNYNHPSKTPVDEFYKYIKKIEKIDDPDVKITLKNIELESFMLKQNS RTNGAVPYQMQLDELNKILENQSVYSDLKDNEDKIRSILTRIPYYI'GPLNITKDRQIFDW IHKKEGKENERILPWNANEIVDVDKTADEFIKRMRNCTYFPDEPVMMAKNSLTVSKYEVL NEINKLRINDHLIKRDMKDKMLHTLFMDHKSISANAMKKWLVKNQYFSNTDDIKIEGFQ KENACSTSLTPWIDFTKIFGKINESNYDFIEKIIDVTVFEDKKILRRRLKKEYDLDEEKIK ILKLYSGWSRLSKLLSGIKTKYKDSIRTPETVLEV MERTNMNLMQVINDEKLGFKKTI DDANSTSVSGKIFSYAEVQELAGSPAIRGIWQALLIVDEIKKIMKHEPAHVYIEFARNEDE KERKDSFVNQMLKLYKDYDFEDETEKEANKHLKGEDAKSKIRSERLKLYYTQMGCMMY TGKSLDIDRLDTYQVDHIVPQSLLKDDSIDNKVLVLSSENQRKLDDLVIPSSIRNKMYYGI'F EKLFNKIIISPKKFYSLIKTEFNKEDQERFINRQIVETRQITKHVAQIIDNHYENTKVVTVRA DLSHQFRERYHIYKNRDINDFHHAHDAYIATILGTIYIGHRFESLDAKYIYGEYKRIFRNQK NKGKEMKKNNDGFILNSMRNIYADKDTGEIVWDPNYIDRIKKCFYKDCFVTKKLEEN GTHFNVTVLPNDTNSDKDN'TLATVPVKNYRSNVNKG YGGFSGVNSI'VAIKGKKKKKKV IEVNLKTGIPLMYKNADEEIKINYLKQAEDELEVQIGKEILKNQLEKDGGLYYIVAPTEIN AKQLILNESQTKLVCEIYKAMKYKNYDNLSEKIIDLYRLINKMELYYPEYRKQLVKKF EDRYEQLKVISIEEKCNIHQILATLHCNSSIGKIMYSDFKISTTIGRLNGRTISLDDISIAESP TGMYSKKYKL (配列番号 28)
EfCas9 <i>Enterococcus faecalis</i> NCBI参照配列 WP_016631044.1 野生型	MRLFEEGHTAEDRRLKRTARRRISRRRNRLRYLQAIFEEAMTDLDENFFARLQESFLVPE DKKWHRHPIFAKLEDEVAYHETYPTIYHLRKKLADSSEQADLRILIYALAHIVKYRGHFLI EGKLSTENTSVDQDQFQFMVIYNQTFVNGESRLVSAPLPESVLIEEELTEKASRTKKSEKV LQFPQEKANGFLQGFLKLMVGNKADFKKVFGLEEEAKITYASESYEEDLEGILAKVGDE YSDVFLAAKNVYDAVELSTILADSDKKSHAKLSSSMIVRFTEHQEDLKKIKRIFIRENCPE YDNLFKNEQKDG YAGYIAHAGKVSQLKTYQYVKKI IQDIAGAEYFLEKIAQENFLRKQRT FDNGVIPHQIHLAELQAIHRQAAYYPFLKENQE KIEQLVTFRIPYYVGPLSKGDASTFAWL KRQSELPWRPNLQETVDLDQSATAHERMTNIDTYLPSEKVLPKHSLLEYEKIMVFNELTK ISYTD DRGIKANFSGKEKEKIFDYLFKTRRKVKKKKDIIQFYRNEYNTTEIVTSLGLEEDQFNA SFSTYQDLLKCGLTRAELDHPD'NAEKLEDIIKILTIFEDRQRIQTQLSTFKGQFSAEVLKKLE RKHYTGWGRLSKKLINGIYDKESGKTILDYLVKDDGVSKHYNNR'FMQLINDSQLSIFKNAI QKAQSSEHEETLSETVNELAGSPAIKKGIYQSLKIVDELVAIMGYAPKRIVVEMARENQTT STGKRRSIQRLKIVEKAMAEIGSNLLKEQPTTNEQLRDRTRFLYYMQNGKDMYTGDLSL HRLSHYDIDHIIPQSFMKDDSLDNLVLVGSTENRGKSDDVPSKEVVKDMKAYWEKLYAA GLISQRKFQRLTKGEQGGTLLEDKAHFIQRQLVETRQITKNVAGILDQRYNAKSKEKKVQI ITLKASLTSQFRSIFGLYKVRVNDYHHGQDAYLNCVVATTLLKVYPNLAPEFVYGEYPK FQTFKENKATAKAIYTNLLRFFTEDEPRFTKDGEILWSNSYLKTIKKELNYHQMNIKKV EVQKGGF'SKESIKPKGPSNKLIPVKNGLDPQKYGGF'DSPVVAYTVLITHEKGGKPLIKQEI LGITIMEKTRIFEQNPIFLLEKGI'LRPRVLMKLPKYTLYE'PEGRRRLLASAKEAQKGNQM VLPEHLLTLLYHAKQCLLPNQSESLAYVEQHQPETQEILERVVDFAEVHTLAKSKVQQIV KLFEANQTADVKEIAASFIQLMQFNAMGAPSTFKFFQKDIERARYTSIKEIFDATHIYQSPTG LYETRKKVVD (配列番号 29)
<i>Staphylococcus aureus</i> Cas9	KRNYILGLDIGTSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRH RIQRVKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEFSAALLHLAKRRGVHNVN EVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFTSDYVKEAKQ

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 6】

説明	配列
	LLKVKQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTTYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFP EELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEKFQIENVFKQKKPTLKQIAK EILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAEELLDQIAKILTIYQSSEDIQ EELTNLNSSELQEEIEQISNLKGYTGTNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKK VDLSQQKEIPTTLVDDIFLSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIHIELAREKNSKDAQKMI NEMQKRNRQTNERIEEIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPFN YEVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVQKEENSCKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKG KGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLRSYFRVNNLDVVKV SINGGIFTSLRRKWKIKKERNKGYKHAEDALIIANADIFIKEWKKLDKAKKVMENQMF EEKQAESMPETEIEQEYKEIFTTPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDD KGN'TLIVNNLNGLYDKDNDKLLKLINKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYGDENPL YKYEEETGNLYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNALHDITDDYPNSRNKVVKLSPKPYR FDVYLDNGVYKIFTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKKKISNQAEFIASFYNNDLIK INGELRYVIGVNNDLNRIEVNMDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILG NLYEVKSKKHPQIIKKG (配列番号 30)
<i>Geobacillus thermodenitrifi- cans</i> Cas9	MKYKIGLDIGTISIGWAVINLDIPRIEDLGVRIFDRAENPKTGESLALPRRLARSARRRLRRR KHLRERIRRLFVREGILTKEELNKLFEKKHEIDVWQLRVEALDRKLNDELARILLHLAKR RGFRSNRKSERT'NKENSTMLKHIEENQSILSSYRTVAEMVVKDPKFSLHKNKEDNYTNT VARDDLLEREIKLIFAKQREYGNIVCTEAFIEHEYISIWASQRPFASKDDIEKKVGI'CTTIEPKE KRAPKATYTFQSFTVWEHINKLRLVSPGGIRALTDDEIRLIYKQAFHKNKITFDHVRTLLN LPDDTRFKGLLYDRNTTLKENEKVRFLELGAYHKIRKAIDSVYGGKAASFRPIDFDFTFG YALTMFKDDDIRSYLRNEYEQNGKRMENLADKVYDEELIEELLNLSFSKFGHLSLKALR NILPYMEQGEVYSTACERAGYIT'IGPKKKQKT'VLLPNIPPIANPVVMRALTQARKVNNAI KKYGSVPVSIHIELARELSQSIFDERRKMQKEQEGNRKKNETAIRQLVEYGLTLNPTGLDIVK FKLWSEQNGKCAYSLOPIEIERLLEPGYTEVDHVIPYSRSLDDSYTNKVLVLTENREKGN RTPAEYLGGLSERWQQFET'FVLTN'KQFSKKKRDRLLRLHYDENEENEFKNRNLNDTRYIS RFLANFIREHLKFADSDDKQKVYTVNGRIT'AHLSRWNFNKNREESNLHHAVIDAAIVAC TTPSDIARVTA'FYQRREQNKELSKKTDPOFPQPWPHFADELQARLSKNPKESIKALNLGN YDNEKLESQPVFVSRMPKRSITGAHQETLRRYIGIDERSGKIQT'VVKKKLSEIQLDKTG HFPMYGKESDPRTYE'AIRQRLLEHNNDPKAFQEPLYKPKKNGELGPIIRTIKIIDTTNQVIP LNDGKTVA'YNSNIVRVDFEKDGKYCVPIYTIDMMKGILPNKAIEPNKPYSEWKEMTE DYTI'RFSLYPNDLIRIE'PREKTIKTAVGEEIKIKDL'FAYYTIDSSNGGLSLVSHDNN'FLR SIGSTR'LRKRFKYQVDV'LGNYTKVRGEKRVGVASSSHSKAGETIRPL (配列番号 31)
ScCas9 <i>S. canis</i> 1375 AA 159.2 kDa	MEKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSSKFKVLGNTNRKSIKKNLMGALLFDSGETAE ATRLKRTARRRYTRRKNRIRYLQEIFANEMAKLDDSFQRLEESFLVEEDKKNERHPIFGN LADEVAYHRNYPTIYHLRKKLADSPEKADRLRIYLALAHIKFRGHFLIEGKLNAENS'DVA KLI'YQLIQTYNQ'LFESPLDEIEVDKAGILSARLSKSKRLEKLI'AVI'PNEKKNGLI'GNIALA LGLTPNFKSNF'DLTEDAKLQLSKD'TYDDDLDELLGQIGDQYADL'FAAKNLSDAILLSDIL RSNSEVTKAPLSASMKRYDEHHQDLALLKTLVRQQFPEKYAEIFKDDTKNGYAGYVGI GIKHKRRTTKLATQEEFYKFIKPILEKMDGAEELLAKLN'RDDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL KELHAILRRQEEFYFPLKENREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF'AWLTRKSEEAITPWNF EEVVDKGASAQSFIERMTNF'DEQLPNKKVLPKHSLLY'EYFTVYNELTKVKYVTERMRKP EFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVT'VKQLKEDYFKKIECFDSVEIHGVEDR'FNASLGT'YHDL KIKDKDFLDNEENEDILEDIVL'TLTFEDREMIERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRHYTG WGRLSRKMINGIRDKQSGKTILDFLKSDFSNRNF'QMLIHDDSLTFKEEIEKAQVSGQGDS LHEQIADLAGSPAIKKGILQTVKIVDELVKVMGHKPENIVIE'MARENQTT'KGLQQSRERK KRIEEGIKELESQILKENPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV'DHI VPQSFIKDDSIDNKVLTRSVENRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLN'AKLITQ'RKFDNLT KAERGGLEADKAGFIKRQLVETRQITKHVARILDSRMNTKRDKNDKPIREVKVITLKS VSDFRKDFQLYKVRDINNYHHAHDAYLNAVVG'TALIKKYPKLESEFVYGDYKVV'DVRK MIKSEQEIGKATAKRIFYSNIMNF'KTEVKLANGEIRKRPLIETNGETGEV'VWNKEKD'FA TVRKVLAMPQVNIVKKTEVQTGGF'SKESILSKRESAKLIPRKKGWDTRKYGGI'GSPTVAY SILVVAKEVGKAKKLSVKVLVGITIMEKGSYEKDPIGFLEAKGYKDIKKELI'FKLPKYS LFELENGRRRMLASATELQKANELVLPQHLVRLLYTQ'NISATTGS'NLGYIEQHREEFK EIFEKIHFSEKYILKNKVN'SNLKSSFDEQFAVSDSILLSNSFVLLKYTSFGASGGFTFLDL VKQGRRLRYQTVTEVLDA'TLIYQSITGLYETRTDLSQLGGD (配列番号 32)

10

20

30

40

【0227】

本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターは、上のCas9オルソログ配列のいずれか、またはそれと少なくとも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%の配列同一性を有するそのいずれかのバリエーションを包含してもよい。

【0228】

napDNAbpは、Cas9などのいずれかの好適なホモログおよび/またはオルソログまたは天然に存在する酵素を包含してもよい。Cas9ホモログおよび/またはオルソログはS.p.yogenes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

50

記載されている。好ましくは、Cas部分はニッカーゼとして構成され(例として、変異誘発されるか、組換え操作されるか、またはそうでなければ天然から得られる)、すなわち、標的二本鎖DNAの一本鎖のみを切断することが可能である。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とって明らかであり、このようなCas9ヌクレアーゼおよび配列は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Chylinski, Rhun, and Charpentier, “The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems” (2013) RNA Biology 10:5,726-737に開示された生物および遺伝子座からのCas9配列を包含する。一部の態様において、Cas9ヌクレアーゼは不活性な(例として、不活性化された)DNA切断ドメインを有し、すなわち、Cas9はニッカーゼである。一部の態様において、Cas9タンパク質は、表3のバリエーションのいずれか1つによって提供されるCas9タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様において、Cas9タンパク質は、上の表のCas9オルソログのいずれか1つによって提供されるCas9タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。

10

【0229】

C. 不活性型Cas9バリエーション

ある特定の態様において、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターは、不活性型Cas9、例として、不活性型SpCas9を包含してもよく、これは、Cas9の両方のヌクレアーゼドメイン、すなわちRuvCドメイン(これは、非プロトスペーサー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ーDNA鎖を切断する)を不活性化する1つ以上の突然変異を原因として、ヌクレアーゼ活性を有さない。ヌクレアーゼ不活性化は、コードされるタンパク質、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そのいずれかのバリエーションのアミノ酸配列に1以上の置換および/または欠失をもたらす1以上の突然変異を原因とし得る。

20

【0230】

本明細書において使用される場合、「dCas9」という用語は、ヌクレアーゼ不活性Cas9もしくはヌクレアーゼ不活性型Cas9、またはその機能的断片を指し、いずれかの生物由来のいずれかの天然に存在するdCas9、いずれかの天然に存在するdCas9の等価物もしくは機能的断片、いずれかの操作されたdCas9バリエーションもしくはその機能的断片、いずれかの生物由来のいずれかのdCas9ホモログ、オルソログもしくはパラログ、および天然に存在するかもしくは操作されたdCas9のいずれかの突然変異体もしくはバリエーションを包含する。dCas9という用語は特に限定的であることを意味せず、「dCas9または等価物」と呼ばれてもよい。例示的なdCas9タンパク質とdCas9タンパク質を作製するための方法とは、さらに本明細書に記載および/または当技術分野において記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0231】

他の態様において、dCas9は、部分的にまたは全体として、Cas9ヌクレアーゼ活性を不活性化する1つ以上の突然変異を有するCas9アミノ酸配列に対応するかまたはそれを含む。他の態様において、D10AおよびH840A以外の突然変異を有するCas9バリエーションが提供され、これらは内在性Cas9ヌクレアーゼ活性の完全なまたは部分的な不活性化をもたらしてもよい(例として、それぞれnCas9またはdCas9)。このような突然変異は、例として、D10およびH840における他のアミノ酸置換、またはCas9のヌクレアーゼドメイン内の他の置換(例として、HNHヌクレアーゼサブドメインおよび/またはRuvC1サブドメインにおける置換)を、Streptococcus pyogenesからのCas9(NCBI参照配列:NC_017053.1)などの野生型配列を参照して包含する。一部の態様において、Cas9のバリエーションまたはホモログ(例として、Streptococcus pyogenesからのCas9(NCBI参照配列:NC_017053.1(配列番号16))のバリエーション)が提供され、これらは、NCBI

40

50

参照配列:NC_017053.1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。一部の態様において、dCas9のバリエーション(例として、NCBI参照配列:NC_017053.1(配列番号16)のバリエーション)が提供され、NC_017053.1(配列番号16)よりも約5アミノ酸、約10アミノ酸、約15アミノ酸、約20アミノ酸、約25アミノ酸、約30アミノ酸、約40アミノ酸、約50アミノ酸、約75アミノ酸、約100アミノ酸、またはそれより多くだけ短いまたは長いアミノ酸配列を有する。

【0232】

一態様において、不活性型Cas9はQ99ZW2のカノニカルなSpCas9配列に基づいてもよく、D10XおよびH810X置換(下線付きかつ太字)を含む以下の配列を有してもよく、ここで、Xはいずれかのアミノ酸であってもよく、またはバリエーション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配列番号260のバリエーションであってもよい。

【0233】

一態様において、不活性型Cas9はQ99ZW2のカノニカルなSpCas9配列に基づいてもよく、D10AおよびH810A置換(下線付きかつ太字)を含む以下の配列を有してもよく、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配列番号261のバリエーションであってもよい。

10

20

30

40

50

【表 15】

説明	配列	配列 番号
デッドCas9またはdCas9 <i>Streptococcus pyogenes</i> Q997.W2 Cas9(D10XおよびH1810Xを含む、「X」はいずれかのアミノ酸である)	MDKKYSIGLXIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGN'TDRHSIKKNLIGALLFD SGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEI'FNEMAKVDDSF'HRLEESF'LVE EDKKHERHPH'GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDS'TDKADLRILIYALAHMI K'IRGHF'LIEGDLNPDNSDVVKLI'QLVQTYNQLF'EENPINASGVDAKAILSARLS KSRRLENLIAQLPGEKKNGLI'GNLIALSLGLTPN'KSN'DLAEDAKLQLSKDTY DDDLNLLAQIGDQYADLI'FLAAKNLSDAILLSDILRVN'TEITKAPLSASMIKRYD EHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI'FDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYK'IKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKD NREKIEKILTI'RIPIYYVGPLARGNSRF'AWMTRKSEETITTPWN'FEVVVDKGASAQ SFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRF'NASLGTYHDL LKIIKDKD'LDN'EENEDILEDIVLT'LT'LFEDREMIERLKTYAHL'FDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILD'FLKSDGFANRNF'MQLIHDDSLTFKE DIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE'EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD'VDXIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK'FDNLT'KAERGGLSEL'DKAGH'IKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS'KLVSDFRKDFQFY KVREINNYHHAHDAYLNAVVG'TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKS EQEIGKATAKYIF'YSNIMNFF'KTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF ATVRKVL'SMPQVNVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD'PKKYGG FDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERS'SFEKNPID'FLAAGY KEVKKDLI'KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF'LYLASH YEKLKGSPE'DNEQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKR'VILADANLDKVL'SAYN KHRDKPIREQAENIHL'FTLT'NLGAPAAI'KYI'FDTTIDRKRYTST'KEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD	260
デッドCas9またはdCas9 <i>Streptococcus pyogenes</i> Q997.W2 Cas9(D10AおよびH1810Aを含む)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGN'TDRHSIKKNLIGALLFD SGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEI'FNEMAKVDDSF'HRLEESF'LVE EDKKHERHPH'GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDS'TDKADLRILIYALAHMI K'IRGHF'LIEGDLNPDNSDVVKLI'QLVQTYNQLF'EENPINASGVDAKAILSARLS KSRRLENLIAQLPGEKKNGLI'GNLIALSLGLTPN'KSN'DLAEDAKLQLSKDTY DDDLNLLAQIGDQYADLI'FLAAKNLSDAILLSDILRVN'TEITKAPLSASMIKRYD EHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI'FDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYK'IKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTI'FDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDI'YPI'FLKD NREKIEKILTI'RIPIYYVGPLARGNSRF'AWMTRKSEETITTPWN'FEVVVDKGASAQ SFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRF'NASLGTYHDL LKIIKDKD'LDN'EENEDILEDIVLT'LT'LFEDREMIERLKTYAHL'FDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILD'FLKSDGFANRNF'MQLIHDDSLTFKE DIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE'EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD'VDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK'FDNLT'KAERGGLSEL'DKAGH'IKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS'KLVSDFRKDFQFY KVREINNYHHAHDAYLNAVVG'TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKS EQEIGKATAKYIF'YSNIMNFF'KTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF ATVRKVL'SMPQVNVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD'PKKYGG FDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERS'SFEKNPID'FLAAGY KEVKKDLI'KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF'LYLASH YEKLKGSPE'DNEQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKR'VILADANLDKVL'SAYN KHRDKPIREQAENIHL'FTLT'NLGAPAAI'KYI'FDTTIDRKRYTST'KEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD	261

10

20

30

40

【0234】

D.Cas9ニッカーゼバリエント

一態様において、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターは、Cas9ニッカーゼを含む。「Cas9ニッカーゼ」または「nCas9」という用語は、二本鎖DNA分子標的上に一本鎖切断を導入することが可能なCas9のバリエントを指す。一部の態様において、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、カノニカルなSpCas9)は、2つの別々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ー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ーDNA鎖を切断する)を含む。一態様において、Ca

50

s9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の突然変異は、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ニッカーゼの作成として報告されている(例として、参照により本明細書に組み込まれる、Nishimasu et al., “Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA,” Cell 156(5), 935-949)。ゆえに、RuvCドメインのニッカーゼ突然変異はD10X、H983X、D986X、またはE762Xを包含し得、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、D986A、もしくはE762A、またはこれらの組合せであり得る。

10

【0235】

様々な態様において、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。

【表16-1】

説明	配列	配列番号
Cas9ニッカーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99ZW2 Cas9 (D10Xを含む、Xは、いずれかの代替アミノ酸である)	MDKKYSIGLXIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRNKRICYLQEIFSNEMAKVDDSIFFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADRLRIYLALAHMIKIRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQIFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLF-LAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPIFLKDNREKIEKILTFRIPIYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNIFEVVVDKGASAQSIHERMTNIFDKNLPNEKVLPHSLLEYIFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDIFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGIFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDIFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR	262

20

30

40

50

【表 16 - 2】

説明	配列	配列 番号
	KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGF ¹ SKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF ² DSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSE ³ EKNPID ⁴ LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLE ⁵ LENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNF ⁶ LYLASHYEKLKGPEDNEQKQLFVEQHKHYLD EIEQISEFSKRVILADANLDKVL ⁷ SAYNKH ⁸ RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA ⁹ TLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	
Cas9ニッカーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q997W2 Cas9 (E762Xを含 み、Xはいず れかの代替ア ミノ酸である)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP ¹⁰ SKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDD ¹¹ SFFHRL ¹² EESFL VEEDKKHERHP ¹³ IFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV ¹⁴ STDKADLR ¹⁵ LIYLALA HMIKFRGH ¹⁶ FLIEGDLNPDNSDV ¹⁷ DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRL ¹⁸ ENLIAQLPGEKKNG ¹⁹ LF ²⁰ GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI ²¹ FDQSKNGYAGYIDGGASQE ²² EF YKFIKPILEKMDGTEELLV ²³ KL ²⁴ NREDLLRKQRT ²⁵ FDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF ²⁶ AWMTRKSEETITPWN ²⁷ FEE VVDKGASAQSFIERMTN ²⁸ FDKNLPNEKVL ²⁹ PKHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN ³⁰ RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV ³¹ ED RFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLT ³² TLFEDREMIERLKY AHLFD ³³ DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILD ³⁴ FLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQD ³⁵ SLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIXMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE ³⁶ EGIKELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV ³⁷ DHIVPQSI ³⁸ FLK DSDID ³⁹ DKVLT ⁴⁰ RS ⁴¹ DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLN ⁴² AKLITQRKFDN LTKAERGGLSEL ⁴³ DKAGFIK ⁴⁴ RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIRE VKVITL ⁴⁵ SKSLVSDFRKDFQFYK ⁴⁶ REINNYHHAHDAYLNAVVG ⁴⁷ TALIKKYPKL ESEFVYGDYK ⁴⁸ YVDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RRKPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGF ⁴⁹ SKESI LPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF ⁵⁰ DSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSE ⁵¹ EKNPID ⁵² LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLE ⁵³ LENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNF ⁵⁴ LYLASHYEKLKGPEDNEQKQLFVEQHKHYLD EIEQISEFSKRVILADANLDKVL ⁵⁵ SAYNKH ⁵⁶ RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA ⁵⁷ TLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	263
Cas9ニッカーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q997W2 Cas9(H983Xを 含み、Xはいず れかの代替ア ミノ酸である)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP ⁵⁸ SKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDD ⁵⁹ SFFHRL ⁶⁰ EESFL VEEDKKHERHP ⁶¹ IFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV ⁶² STDKADLR ⁶³ LIYLALA HMIKFRGH ⁶⁴ FLIEGDLNPDNSDV ⁶⁵ DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRL ⁶⁶ ENLIAQLPGEKKNG ⁶⁷ LF ⁶⁸ GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI ⁶⁹ FDQSKNGYAGYIDGGASQE ⁷⁰ EF YKFIKPILEKMDGTEELLV ⁷¹ KL ⁷² NREDLLRKQRT ⁷³ FDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF ⁷⁴ AWMTRKSEETITPWN ⁷⁵ FEE VVDKGASAQSFIERMTN ⁷⁶ FDKNLPNEKVL ⁷⁷ PKHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN ⁷⁸ RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV ⁷⁹ ED RFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLT ⁸⁰ TLFEDREMIERLKY AHLFD ⁸¹ DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILD ⁸² FLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQD ⁸³ SLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIE ⁸⁴ MARENQTTQKGQKNSRERMKRIE ⁸⁵ EGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV ⁸⁶ DHIVPQSI ⁸⁷ FLKD DSIDN ⁸⁸ KVLT ⁸⁹ RS ⁹⁰ DKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLN ⁹¹ AKLITQRKFDN LTKAERGGLSEL ⁹² DKAGFIK ⁹³ RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREV KVITL ⁹⁴ SKSLVSDFRKDFQFYK ⁹⁵ REINNYH ⁹⁶ AHDAYLNAVVG ⁹⁷ TALIKKYPKLE SEFVYGDYK ⁹⁸ YVDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGF ⁹⁹ SKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF ¹⁰⁰ DSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSE ¹⁰¹ EKNPID ¹⁰² LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLE ¹⁰³ LENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNF ¹⁰⁴ LYLASHYEKLKGPEDNEQKQLFVEQHKHYLD EIEQISEFSKRVILADANLDKVL ¹⁰⁵ SAYNKH ¹⁰⁶ RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA ¹⁰⁷ TLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	264

10

20

30

40

50

【表 16 - 3】

説明	配列	配列番号
Cas9ニッカーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99/W2 Cas9(D986Xを含み、Xはいずれかの代替アミノ酸である)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLSEESFL VEEDKKHERHPIFGNTVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSITDKADLRILIYALALA HMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF'DLAEDAKLQLS KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLF'LAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPIFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF'AWMTRKSEETITPWNTE VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVVDHIVPQSFLKD DSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPEEVEVKKMKNYWRQLLN'AKLITQRKFDNL TKAERGGLSELDKAGFIKQQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREV KVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHAHAYLNAVVGTAIIKKYPKLE SEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFTKTEITLANGEIR KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKDLHKLPKYSLELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFYLAHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLD EIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD	265
Cas9ニッカーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99Z/W2 Cas9(D10A含む)	MDKKYSIGLΔIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLSEESFL VEEDKKHERHPIFGNTVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSITDKADLRILIYALALA HMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF'DLAEDAKLQLS KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLF'LAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPIFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRF'AWMTRKSEETITPWNTE VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVVDHIVPQSFLKD DSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPEEVEVKKMKNYWRQLLN'AKLITQRKFDNL TKAERGGLSELDKAGFIKQQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREV KVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHAHAYLNAVVGTAIIKKYPKLE SEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFTKTEITLANGEIR KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKDLHKLPKYSLELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFYLAHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLD EIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD	266
Cas9ニッカーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99/W2	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLSEESFL VEEDKKHERHPIFGNTVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSITDKADLRILIYALALA HMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF'DLAEDAKLQLS KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLF'LAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS	267

10

20

30

40

50

【表 16 - 4】

説明	配列	配列番号
Cas9(E762Aを含む)	MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEE VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYYHDLKKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIA ^A MARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGKELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSI ^L K DDSIDNKVLT ^R SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKI ^D N LTKAERGGLSEL ^D KAGIFIKRQLVET ^R QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIRE VKVITLKS ^K LVSD ^F FRKDI ^F QFYK ^V REINNYHHAHDAYLNAVVG ^T ALIKKY ^P KL ESEFVYGDYK ^V YDVRK ^M IAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRLPIETNGETGEIVWDKGRDI ^F ATVRK ^V LSMPQVNIVKKTEVQTGGI ^F SKESI LPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGI ^F DSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERS ^S FEKNPID ^F LEAKGYKEVKKDLI ^L KPKYSL ^F ELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK ^G SPEDNEQKQLFVEQHKHYLD EIEQISEFSKR ^V ILADANLDK ^V LSAYNKH ^R DKPIREQAENTIHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDR ^K RYTSTKEVLDATLIHQ ^S ITGLYETRIDL ^S QLGGD	10
Cas9ニックアーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99/W2 Cas9(I1983Aを含む)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS ^N EMAKVDD ^S FFHRL ^E ESFL VEEDKKHERHPI ^F GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV ^D STDKADLR ^L IYLALA HMIKFRGH ^F LIEGDLNPDNSDV ^D KLI ^F QLVQTYNQL ^F EENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRL ^E NLIAQLPGEKKNG ^L F ^G NLIALSLGLTPN ^F KSN ^F DLAEDAKLQLS KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSA ^I LLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEE VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYYHDLKKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIE ^M MARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSI ^L KD DSIDNKVLT ^R SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKI ^D NL TKAERGGLSEL ^D KAGIFIKRQLVET ^R QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREV KVITLKS ^K LVSD ^F FRKDI ^F QFYK ^V REINNYH ^A AHDAYLNAVVG ^T ALIKKY ^P KL SEFVYGDYK ^V YDVRK ^M IAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR KRRLPIETNGETGEIVWDKGRDI ^F ATVRK ^V LSMPQVNIVKKTEVQTGGI ^F SKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGI ^F DSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERS ^S FEKNPID ^F LEAKGYKEVKKDLI ^L KPKYSL ^F ELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK ^G SPEDNEQKQLFVEQHKHYLD EIEQISEFSKR ^V ILADANLDK ^V LSAYNKH ^R DKPIREQAENTIHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDR ^K RYTSTKEVLDATLIHQ ^S ITGLYETRIDL ^S QLGGD	268 20 30
Cas9ニックアーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99/W2 Cas9(I1986Aを含む)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS ^N EMAKVDD ^S FFHRL ^E ESFL VEEDKKHERHPI ^F GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV ^D STDKADLR ^L IYLALA HMIKFRGH ^F LIEGDLNPDNSDV ^D KLI ^F QLVQTYNQL ^F EENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRL ^E NLIAQLPGEKKNG ^L F ^G NLIALSLGLTPN ^F KSN ^F DLAEDAKLQLS KDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSA ^I LLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEE VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYYHDLKKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKY	269 40

10

20

30

40

【表 1 6 - 5】

説明	配列	配列 番号
	AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKD DSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL TKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREV KVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHAHAAYLNAVVGTAIIKKYPKLE SEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKKGSKKLKSVKE LLGITIMERSSI'EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNI'LYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLD EHEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIHHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSTGLYETRIDLSQLGGD	

10

【0 2 3 6】

別の態様において、Cas9ニッカーゼは、HNHヌクレアーゼ活性を不活性化するHNHドメインの突然変異を含む。例えば、ヒスチジン(H)840またはアスパラギン(R)863の突然変異は、HNH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ニッカーゼの作成として報告されている(例として、参照により本明細書に組み込まれる、Nishimasu et al., "Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA," Cell 156(5), 935-949)。ゆえに、HNHドメインのニッカーゼ突然変異はH840XおよびR863X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H840AもしくはR863Aまたはこれらの組合せであり得る。

20

【0 2 3 7】

様々な態様において、Cas9ニッカーゼはHNHヌクレアーゼドメインの突然変異を有し得、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%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するそのバリエーションを有し得る。

30

【表 1 7 - 1】

説明	配列	配列 番号
Cas9ニッカーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q997W2 Cas9(H840Xを含 み、Xはいずれ かのアミノ酸であ る)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKIFKVLGN'TDRHSIKKNLIGALLFD SGETAEATRLKRTARRRYTRRRKNRICYLQEI'FSNEMAKVDDSF'HRLEESFLVE EDKKHERHPHIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMI KI'RGHIFLIEGDLNPDNSDVKLFQILVQTYNQLFEENPINASGVDKAIL SARLS KSRRLENLIAQLPGEKKNGLF'GNLIALSLGLTPN'FKSNFDLAEDAKLQLSKDTY DDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYD EHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIIF'DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKIFKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPI'FKD NREKIEKILTI'RIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNI'EEVVDKGASAQ SFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKE DIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDXIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFY KVRINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKS	270

40

50

【表 17-2】

説明	配列	配列番号
	EQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF ATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGG FDSPTVAYSVLVVAKEVEKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGY KEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLLASH YEKLKGSPEDEKQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ ITGLYETRIDLSQLGGD	
Cas9ニッカーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99/W2 Cas9(H1840Aを含む)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD SGETAETRLKRTARRRYTRRNRRICYLQEII'SNEMAKVDDSF'FHRLEESFLVE EDKKHERHPHIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYALAHMI KFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFQQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLS KSRRLENLIAQLPGEKKNGFLGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYD EHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIIFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPF LKD NREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDK GASAQ SFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFXASLGT YHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFD DKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS DGFANRNF'MQLIHDDSLTFKE DIQKAQVSGQD SLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDIVPQSF'LKDDSIDNKVLRSDKNRGKS DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITL KSKLVSDFRKDFQFY KVINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAS EQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF ATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGG FDSPTVAYSVLVVAKEVEKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGY KEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLLASH YEKLKGSPEDEKQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ ITGLYETRIDLSQLGGD	12
Cas9ニッカーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99/W2 Cas9(R863Xを含み、Xはいずれかのアミノ酸である)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD SGETAETRLKRTARRRYTRRNRRICYLQEII'SNEMAKVDDSF'FHRLEESFLVE EDKKHERHPHIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYALAHMI KFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFQQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLS KSRRLENLIAQLPGEKKNGFLGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYD EHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIIFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPF LKD NREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDK GASAQ SFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFXASLGT YHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFD DKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS DGFANRNF'MQLIHDDSLTFKE DIQKAQVSGQD SLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSF'LKDDSIDNKVLRSDKNXGKS DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITL KSKLVSDFRKDFQFY KVINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAS EQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF ATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGG FDSPTVAYSVLVVAKEVEKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGY KEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLLASH YEKLKGSPEDEKQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYN	271

10

20

30

40

【表 17-3】

説明	配列	配列番号
	KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI ITGLYETRIDLSQLGGD	
Cas9ニッカーゼ <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99/W2 Cas9(R863Aを含む)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLID SGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSHRLELSFLVE EDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSIDKADLRILIYLAHAM KFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLS KSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTY DDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYD EHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKD NREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQ SHIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKE DIQKAQVSGQDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGELGSQLKEHPVENTQLQNEKLYLY YLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNAGKS DNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFY KVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAS EQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF ATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGG FDSPTVAYSVLVVAKEKGSKKLKSVELLGITIMERSSEKPNPIDFLEAKGY KEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYASH YEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI ITGLYETRIDLSQLGGD	272

10

20

30

40

50

【0238】

一部の態様において、N末端メチオニンが、Cas9ニッカーゼから、または本明細書において開示もしくは企図されるいずれかのCas9バリエーション、オルソログ、もしくは等価物から除去される。例えば、メチオニンマイナスCas9ニッカーゼは、以下の配列、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れらのバリエーションを包含する。

【表 18-1】

説明	配列
Cas9ニッカーゼ (Metマイナス)	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLVESFLVEEDKKHERHPI F'GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDS'TDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNP DNSDVVDKLFQVLVQTYNQLEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKN GLFGNLIALSLGLTPNFKSN'DLAEDAKLQLSKD'TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAA KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIF' DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSI PHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS EETITPWNFEVVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKV KYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLKKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFD DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDS LTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDXIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE VVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDA YLNNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMN FFKTETTLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQT

10

20

30

40

50

【表 18-2】

	GGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKSKSKLKS VKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAG ELQKGNELALPSKYVNFYLAASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVLADANLKDVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLNLGAPAAFKYFDTTIDRKR YTSTKEVLDAFLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 273)
Cas9ニッカーゼ (Metマイナス) <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99Z/W2 Cas9(H840A)を 含む)	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA EATRLKRTARRRYTRRNKRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLESFLVEEDKKHERHPI FGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSIDKADLRILIYALAHMIKFRGHFLIEGDLNP DNDSDVDKLFQQLVQTYNQFLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKK GLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAA KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFF DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSI PHQIHLGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS EETTPWNFEVVDKGSASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKV KYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFINASLGTYHDLKIKKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKYAHLFD DKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMILHDDS LTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKQKNSRERMKRIEKGELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELDEKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDA YLNNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMN FFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQT GGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKSKSKLKS VKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAG ELQKGNELALPSKYVNFYLAASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVLADANLKDVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLNLGAPAAFKYFDTTIDRKR YTSTKEVLDAFLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 10)
Cas9ニッカーゼ (Metマイナス) <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99Z/W2 Cas9(R863X)を含 み、Xはいずれ かのアミノ酸で ある)	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA EATRLKRTARRRYTRRNKRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLESFLVEEDKKHERHPI FGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSIDKADLRILIYALAHMIKFRGHFLIEGDLNP DNDSDVDKLFQQLVQTYNQFLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKK GLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAA KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFF DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSI PHQIHLGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS EETTPWNFEVVDKGSASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKV KYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFINASLGTYHDLKIKKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKYAHLFD DKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMILHDDS LTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKQKNSRERMKRIEKGELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE VVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELDEKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDA YLNNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMN FFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQT GGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKSKSKLKS VKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAG ELQKGNELALPSKYVNFYLAASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVLADANLKDVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLNLGAPAAFKYFDTTIDRKR YTSTKEVLDAFLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 274)
Cas9ニッカーゼ (Metマイナス) <i>Streptococcus pyogenes</i> Q99Z/W2 Cas9(R863A)を含む)	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA EATRLKRTARRRYTRRNKRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLESFLVEEDKKHERHPI FGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSIDKADLRILIYALAHMIKFRGHFLIEGDLNP DNDSDVDKLFQQLVQTYNQFLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKK GLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAA KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFF DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSI

10

20

30

40

50

【表 18-3】

PHQIHLGELHAILRRQEDFYPIFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKS EETITPWNFEVVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKV KYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFD DKVMMQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQSGKTILDPLKSDGFANRNFMLIHDDS LTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHTANLAGSPAIIKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNAGKSDNPSEE VVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDA YLNNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFYFYSNIMN FFKTETTLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQT GGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIHLKPKYSLFELENGRKRMLASAG ELQKGNELALPSKYVNFYLYASHYEKLKSGPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKR YTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 275)

10

【0239】

E. 他のCas9バリエーション

不活性型Cas9およびCas9ニッカーゼバリエーションの他に、本明細書において使用されるCas9タンパク質は、本明細書に開示のまたは当技術分野において公知のいずれかの野生型Cas9または突然変異体Cas9(例として、不活性型Cas9またはCas9ニッカーゼ)、または断片Cas9、または環状置換体Cas9、またはCas9の他のバリエーションを包含するいずれかの参照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%同一である他の「Cas9バリエーション」をもまた包含してもよい。一部の態様において、Cas9バリエーションは、参照Cas9と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、またはそれより多くのアミノ酸変化を有してもよい。一部の態様において、Cas9バリエーションは参照Cas9の断片(例として、gRNA結合ドメインまたはDNA切断ドメイン)を含み、その結果、断片は、野生型Cas9の対応する断片と少なくとも約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。一部の態様において、断片は、対応する野生型Cas9(例として配列番号9)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。

20

30

40

【0240】

一部の態様において、本開示は、本明細書において開示されたいずれかのCas9タンパク質の断片であるそれらの機能性を保持するCas9断片を利用してもよい。一部の態様において、Cas9断片は少なくとも100アミノ酸長である。一部の態様において、断片は少なくとも100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、または少なくとも1300アミノ酸長である。

【0241】

様々な態様において、本明細書において開示される方法および組成物において利用され

50

るプライムエディターは、以下の通り記載されるCas9バリエーションの1つ、またはいずれかの参照Cas9バリエーションと少なくとも約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、もしくは少なくとも約99.9%同一であるそのCas9バリエーションを含んでもよい。

【0242】

F. 小型Cas9バリエーション

一部の態様において、本明細書において企図される方法および組成物において利用されるプライムエディターは、カノニカルな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。一部の態様において、より小さいサイズのCas9バリエーションは、例として、発現ベクター、ナノ粒子、または送達の手段による細胞への送達を容易にし得る。ある特定の態様において、より小さいサイズのCas9バリエーションは、クラス2 CRISPR-CasシステムのII型酵素として類別される酵素を包含し得る。一部の態様において、より小さいサイズのCas9バリエーションは、クラス2 CRISPR-CasシステムのV型酵素として類別される酵素を包含し得る。他の態様において、より小さいサイズのCas9バリエーションは、クラス2 CRISPR-CasシステムのVI型酵素として類別される酵素を包含し得る。

【0243】

カノニカルなSpCas9タンパク質は、1368アミノ酸長であり、158キロダルトンの予測分子量を有する。「小型Cas9バリエーション」という用語は、本明細書において使用される場合、少なくとも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アミノ酸未満であるが、少なくとも400アミノ酸超であり、Cas9タンパク質の必要な機能を保持する、天然に存在する、操作された、またはその他のいずれかのCas9バリエーションを指す。Cas9バリエーションは、クラス2 CRISPR-CasシステムのII型、V型またはVI型酵素として類別されるものを包含し得る。

【0244】

様々な態様において、本明細書において開示される方法および組成物において利用されるプライムエディターは、以下のように記載される小型Cas9バリエーション、またはいずれかの参照小型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%同一であるそのCas9バリエーションの1つを含んでもよい。

10

20

30

40

50

【表 19 - 1】

説明	配列	配列 番号
SaCas9 <i>Staphylococcus aureus</i> 1053 AA 123 kDa	MGKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTS DYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEG PGEGPSIFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLV ITRDENEKLEYEKTQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVSTGKPE FTNLKVYHDIKDITARKEIIEAELLDDQIAKILTIIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEI EQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIIFNRLKLVKKVDLSQQKE IPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQMINE MQKRNQRQTNERIEEIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLN NPIFYEVVDHIIPRSVSIFDNSIFNNKVLVKQEENSKKGNRTPIFYLSSSDSKISYET FKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLM NLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGITSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAE DALIAN ADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETE QEYKEIIFTPHQIKHIK DFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKL KKLINKSPEKLLMYHHDPTTYQKLKLIMEQYGYDEKNPLYKYEEETGNYLTKYS KKDNGPVIKKIKYYGNKLNALHDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGV YKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKISNQAEFASFYKNDLIKING ELYRVIGVNNDDLNRIEVNMDITYREYLENMNDKRPPHIKTIASKTQSIKKYST DILGNLYEVKSKKHPQIIKK	21
NmeCas9 <i>N. meningitidis</i> 1083 AA 124.5 kDa	MAAIFKPNISNYILGLDIGIASVGWAMVLEIDEEENPIRLIDLGVRFIERAEVPKGTG DSLAMARRLARSVRRLTRRRRAHRLLRTRRLKREGVLQAANIFDENGLIKSLPN TPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKG VAGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEEKESGHIRNQRSDYSHTFSRKDLQAEILL FEKQKEIFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAA KNTYTAERFIWLTCLNNLRILEQGSRPLTDTERRATLMDEPYRKSCLTYAQARK LLGLEDTAIFKGLRYGKDNAAEASTLMEKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLS PELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRCLKDRIQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIV PLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRLALSQARK VINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKIFREY FPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLGRLEKGYVEIDAALPFSRT WDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRS KKQRILLQKFDEDGIFKERNLNDTRYVNRFLCQIFVADRMRLTGKGGKRVFASN GQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMN AFDGKTIDKETGEVLHQKTHIFQPWEIFFAQEVMIRVIFGKPDGKPEIFEEADTLEK LRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARKLDEGVS VLRVPLTQLKLKDLEK MVNREREPKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAPFYKY DKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYY LVPIYSWQVAKGILPDRAVVQGKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKA RMFGYFASCHRG TGNNIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQIDELGKEI RPCRLKKRPPVR	276

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

説明	配列	配列番号
CjCas9 <i>C. jejuni</i> 984 AA 114.9 kDa	MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIITKVENPKTGESLALPRRLARSAR KRLARRKARLNHLKHLIANEFKLNIEDYQSFDES LAKAYKGLISPYELRFRAL NELLSKQDFARVILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLAN YQSVG EYLYKEYFQKFENSKFTNVRNKKESYERCI AQSF LKDELKLIFFKKQREFGFSF SKKFEFEEVLSVAFYKRALKDFSHLVGNCSTFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRIIN LLNNLKNTEGILYTKDDL NALLNEVLKNGTLYTKQT KKLGLSDDYEFKGEKG TYFIEFKKYKEFKALGEHNSQDDLNEIAKDTLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQ IDLSKLEFKDHLNISFKALKLVTPLMLEGKKYDEACNELNLKVAINEDKKDFL PAFNETYYKDEVTPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYGVHVKINIELAREVGNH SQRAKIEKEQNENYKAKKDALECEKLGKINSKNILKLR LFKQKEFCAYSGE KIKISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSDSYMNKVLVFTKQNGEKL NQTPFEAFGN DSAKWQKIEVLAKNLPTKKQKRILDKNYKDKQKNFKDRNLNDTRYIARLV NYTKDYLDFPLSDDENTKLN DTQKGSKVHVVEAKSGMLTSALRHTWGFSAKD RNNHLHHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELDYKNNRK TFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEFYQSYGGKEGVL KALELGKIRKVNKGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKIFYAVPIYTMDFALKVLPNK AVARSKGEIKDWMENYEFCSLYKDSLILIQTKDMQEPFVYYNAITSSIT VSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVFEKYIVSALGEVT KAEIRQREDIFKK	277
GeoCas9 <i>G. stearother- mophilus</i> 1087 AA 127 kDa	MRYKIGLDIGITSVGWAVMNLDPRIEDLGVRIFDRAENPQTGESLALPRRLARS ARRRLRRRKHRLERIRRLVIREGILTKEELDKLFEKHEIDVWQLRVEALDRKL NNDELARVLLHLAKRRGFKSNRKSERSNKENSTMLKHIEENRAILSSYRTVGE MIVKDPKFALHKNKNGENYTN TIARDDLEREIRLIFSKQREFGNMSCTEEFENEY ITWASQRPVASKDDIEKKVGICTFEPEKRAPKATYTIQSFIAWEHINKRLRISP SGARGLTDEERRLLYEQAQKKNKITYHDIRTLHLHPDDTYFKGIVYDRGESRKQ NENIRFLELDAYHQIRKAVDKVYGKGKSSSFLPIDFDTFGYALT LFKDDADIHSY LRNEYEQNGKRMPNLANKVYDNELIEELLNLSFTKIFGHL SLKALRSILPYMEQG EYVSSACERAGYTFTGPKKKQKTMLLPNTPIIANPVVMRALTQARKVVNAIHK YGSPVSIHIELARDLSQTI DERRKTKEQEENRKKNETAIRQLMEYGLTLNPTG HDIVKFKLWSEQNGRCAYSLQPIEIERLLEPGYVEVDHVIPYSRSLDSDSYTNKVL VLTRENREKGNRIPAEYLGVGTERWQQFETFLTNKQFSKKKRDRLLRLHYDE NEETEFKNRNLNDTRYISRFXNFIREHLKFAESDDKQKVYTVNGRVT AHLRSR WEFNKNREESDLHHAIDAVIVACTTPSDIAKVTAIFYQRREQNKELAKKTEPHI PQPWPHFADELARLSKHPKESIKALNLGNYDDQKLESLQPVIVSRMPKRSVT GAAHQETLRRYVGIDERSGKIQT VVVKTLSEIKLDASGHFPMYGKESDPRTYEA IRQRLEHNNDPKKAIQEPLYKPKKNGEPGPVIRTVKIIDTKNQVIPLNDGKTVA YNSNIVRVDFVEKDGKYYCVPVYTM DIMKGILPNKAIEPNKPYSEWKEMTEDY TFRFSLYPNDLIRIELPREKTVKTAAGEEINVKDVFVYYKTIDSANGGLELISHDH RISLRGVGSRITLKRFEKYQVDVLGNIYKVRGEKRVGLASSAHSKPGKTIRPLQS TRD	278
LbaCas12a <i>L. bacterium</i> 1228 AA 143.9 kDa	MSKLEKFTNCYSLSKTLRFKAIPVGKTQENIDNKRLLVEDEKRAEDYKGVKKL LDRYYLSFINDLVLSIKLKNLNNYISLFRKKTRTEKENKELENLEINLRKEIAKA KGNEGYKSLFKKDIIEITLPEIFLDDKDEIALVNSINGITTAITGIFTDNRENMISEE AKSTSIARFCINENLTRYISNMDIIEKVDAIIFDKHEVQEIKEKILNSDYDVEDIFE GEFNFVLTQEGIDVYNAIIGGIVTESGEKIKGLNEYINLYNQKTKQKLPKIKPL YKQVLS DRESLSFYGEGYTSDEEVLEVFRNTLNKNSEIFSSIKKLEKLFKNFDEY SSAGIFVKNPGAISTISKDIFGEWNVIRDKWNAEYDDIHLKKKAVVTEKYEDDR RKSFKKIGSISLEQLQEYADADLSVVEKLKEIMQKVDEIYKVYGSSEKLFDA VLEKSLKKNDAVVAIMKDLLDSVKSEFENYKAIFFGEGKETNRDESIYGDIFVLA YDILLKVDHIYDAIRNYVTQKPYSKDKIKLYFQNPQIMGGWDKDKETDYRATI LRYGSKYYLAIMDKKYAKCLQKIDKDDVNGNYEKINYKLLPGPNKMLPKVFFS KKWMAYYNPSEDIQKIYKNGTFFKGD MFNLNDCHKLIDFFKDSISRYPKWSNA YDFNFSETEKYKDIAGFYREVVEEQYKVSFESASKKEVDKLVEEGKLYMFQIY NKDIFSDKSHGTPNLHTMYFKLLIDENNHGQIRLSGGAEIIMRRASLKKLELVV HPANSPIANKNPDNPKTTTLYSYDVYKDKRFSEDQYELHIPIAINKCPKNIFKINT EVRVLLKHDDNPYVIGIDRGERNLLYIVVVDGKGNIVEQYSLNEIINNINIRIK TDYHSLLDKKEKERFEARQNWTSIENIKELKAGYISQVVHKICELVEKYDAVIA	279

10

20

30

40

【表 19-3】

説明	配列	配列番号
	LEDLNSGFKNSRVKVEKQVYQKFEKMLIDKLN YMVDKKSNPCATGGALKGYQITNKFESFKSMSTQNGFIYIPAWLTSKIDPSTGFVNLLKTKYTSIADSKKFISSFD RIMYVPEEDLIEFALDYKNFSRTDADYIKKWKLYSYGNRIRIIRNPKKNVFD WEEVCLTSAYKELFNKYGINYQQGDIRALLCEQSDKAFYSSIFMALMSLMLQM RNSITGRTDVDIFLISPVKNSDGIYDSRNYEAQENAILPKNADANGAYNIARKV LWAIGQFKKAEDEKLDKVKIAISNKEWLEYAQTSVKH	
BhCas12b <i>B. hisashii</i> 1108 AA 130.4 kDa	MATRSFILKIEPNEEVKKGLWKTHEVLNHGIAYYMNLKLIRQEAIYEHHEQDP KNPKKVSKAEIQAELWDFVLKMQKCNSTHEVDKDEVFNILRELYEELVPSSVE KKGEANQLSNKFLYPLVDPNSQSGKGTASSGRKPRWYNLKIAGDPSWEEKKK WEEDKKKDKPLAKILGKLAEYGLIPLFIPTDSNEPIVKEIKWMEKSRNQSVRRLD KDMFIQALERFLSWESWNLKVKEEYKVEKEYKTLEERIKEDIQALKALEQYE KERQEQLLRDTLNTNEYRLSKRGLRGWREIHKWLKMDENEPSEKYLEVFKDY QRKHPREAGDYSVYEIFLSKKENHFIWRNHPEYPYLYATFCEIDKKKKDAKQQA TIFTLADPINHPLWVRFEERSGSLNKNYRILTEQLHTEKLKKKLTVQLDRLIYPT ESGGWEEKGKVDIVLLPSRQFYNQIFLDIEEKGKHAFTYKDESIKFLPKGTILGAR VQFDRDHLRRYPHKVESGNVGRIFYNMTVNIEPTESPVSKSLKIHRDDFPKVVN FPKKELTEWIKDSKGKLLKSGIESLEIGLRVMSIDLGQRQAAAASIEVVDQKPD IEGKLFIPIKGTELYAVHRASINIKLPGETLVKSREVLKAREDNLKL MNQKLN FLRNVLHIQQIFEDITEREKRVTKWISRQENS DVPLVYQDELIQIRELMYKPYKD WVAFLKQLHKKRLEVEIGKEVKHWRKSLSDGRKGLYGISLKNIDEIDRTRKFLLR WSLRPTEPGEVRRLEPGQRFADQLNHLNALKEDRLKKMANTIMHALGYCYD VRKKKWQAKNPACQIILFEDLSNYPYEERSRFENSKLMKWSRREIPRQVALQ GEIYGLQVGEVGAQFSSRFHAKTGSPGIRCSVVTKEKLQDNRIFFKNLQREGRLT LDKIAVLKEGDLYPDKGGEKFISSLKDRKCVTTHADINAAQNQLQKRFWTRTHG FYKVYCKAYQVDGQTVYIPESKDQKQKIIEEFGEYFILKDGVEYEWVNAGKLK IKKGSSKQSSSELVSDILKDSFDLASELKGEKLMLYRDPSGNVFSPDKWMAAG VFFGKLERILISKLTNQYSISTIEDDSSKQSM	280

10

20

【0245】

G.Cas9等価物

一部の態様において、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターは、いずれかのCas9等価物を包含し得る。本明細書において使用される場合、「Cas9等価物」という用語は、幅広い用語であり、これは、そのアミノ酸一次配列および/またはその三次元構造が異なってもよくおよび/または進化的立場からは無関係であってもよいにもかかわらず、プライムエディターにおいてCas9と同じ機能を供するいずれかのnapDNABpタンパク質を包摂する。ゆえに、Cas9等価物は進化的に関係する本明細書に記載または包括されるいずれかのCas9オルソログ、ホモログ、突然変異体、またはバリエントを包含するが、Cas9等価物は、Cas9と同じかまたは類似の機能を有するように収斂進化プロセスによって進化してもよいが、アミノ酸配列および/または三次元構造についていずれかの類似性を必ずしも有さないタンパク質も包含する。Cas9等価物が収斂進化によって生じたタンパク質に基づいてもよいにもかかわらず、ここで記載される方法および組成物において利用されるプライムエディターは、Cas9と同じかまたは類似の機能を提供するであろういずれかのCas9等価物を包含する。例えば、Cas9がCRISPR-CasシステムのII型酵素を指す場合には、Cas9等価物はCRISPR-CasシステムのV型またはVI型酵素を指し得る。

30

40

【0246】

例えば、Cas12e(CasX)は、報告によるとCas9と同じ機能を有するが、収斂進化によって進化したCas9等価物である。したがって、Liu et al., “CasX enzymes comprises a distinct family of RNA-guided genome editors,” Nature, 2019, Vol.566:218-223に記載されているCas12e(CasX)タンパク質は、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターと共に使用されることが企図される。加えて、Cas12e(CasX)のいずれかのバリエントまたは改変が想像され、本開示の範囲

50

内にある。

【0247】

Cas9は、多種多様な種において進化した細菌酵素である。しかしながら、本明細書において企図されるCas9等価物は古細菌からも得ることができ、これらは細菌とは異なる単細胞原核微生物のドメインおよび界を構成する。一部の態様において、Cas9等価物は、例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Burststein et al., “New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes,” Cell Res. 2017 Feb 21, doi:10.1038/cr.2017.21に記載されている、Cas12e(CasX)またはCas12d(CasY)を指し得る。ゲノム分解能メタゲノミクスを使用して、生命の古細菌ドメインにおける最初に報告されたCas9を包含するいくつかのCRISPR-Casシステムが特定された。この多様なCas9タンパク質は、わずかにしか研究されていないナノ古細菌から活性なCRISPR-Casシステムの一部として見出された。細菌では、2つの以前に知られていないシステム、CRISPR-Cas12eおよびCRISPR-Cas12dが発見され、これらはこれまでに発見された最もコンパクトなシステムのものである。一部の態様において、Cas9は、Cas12eまたはCas12eのバリエーションを指す。一部の態様において、Cas9は、Cas12dまたはCas12dのバリエーションを指す。他のRNAによってガイドされるDNA結合タンパク質が核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNABp)として使用されてもよく、本開示の範囲内にあるということが認識されるべきである。Liu et al., “CasX enzymes comprises a distinct family of RNA-guided genome editors,” Nature, 2019, Vol. 566:218-223も参照されたい。これらのCas9等価物のいずれかが企図される。

10

20

【0248】

一部の態様において、Cas9等価物は、天然に存在するCas12e(CasX)またはCas12d(CasY)タンパク質と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様において、napDNABpは、天然に存在するCas12e(CasX)またはCas12d(CasY)タンパク質である。一部の態様において、napDNABpは、本明細書において提供される野生型Cas部分またはいずれかのCas部分と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【0249】

様々な態様において、核酸プログラム型DNA結合タンパク質は、限定されないが、Cas9(例として、dCas9およびnCas9)、Cas12e(CasX)、Cas12d(CasY)、Cas12a(Cpf1)、Cas12b1(C2c1)、Cas13a(C2c2)、Cas12c(C2c3)、アルゴノート、およびCas12b1を包含する。Cas9とは異なるPAM特異性を有する核酸プログラム型DNA結合タンパク質の1つの例は、PrevotellaおよびFrancisellaからのクラスター化された規則的な配置の短い回文配列リピート1である(すなわち、Cas12a(Cpf1))。Cas9と同様に、Cas12a(Cpf1)もまたクラス2 CRISPRエフェクターであるが、それはII型サブグループよりもむしろ酵素のV型サブグループである。Cas12a(Cpf1)はCas9とは別個の特徴を有する強固なDNA干渉を媒介することが示されている。Cas12a(Cpf1)は、tracrRNAを欠く単一のRNAによってガイドされるエンドヌクレアーゼであり、トリッチなプロトスペーサー隣接モチーフ(TTN、TTTN、またはYTN)を利用する。その上、Cpf1は互い違いのDNA二本鎖切断によってDNAを切断する。16のCpf1ファミリータンパク質のうち、AcidaminococcusおよびLachnospiraceaeからの2つの酵素は、ヒト細胞における効率的なゲノム編集活性を有することが示される。Cpf1タンパク質は当技術分野で公知であり、先に、例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Yamano et al., “Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA,” Cell(165)2016, p.949-962記載されている。

40

【0250】

50

さらに他の態様において、Casタンパク質はいずれかのCRISPR関連タンパク質を包含してもよく、Cas12a、Cas12b1、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(Csn1およびCsx12としてもまた公知)、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を含む(例として、配列番号9の野生型Cas9ポリペプチドのD10A突然変異に対応する突然変異)。

【0251】

様々な他の態様において、napDNABpは以下のタンパク質のいずれかであり得る:Cas9、Cas12a(Cpf1)、Cas12e(CasX)、Cas12d(CasY)、Cas12b1(C2c1)、Cas13a(C2c2)、Cas12c(C2c3)、GeoCas9、CjCas9、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13b、Cas13c、Cas13d、Cas14、Csn2、xCas9、SpCas9-NG、環状に置換されたCas9、もしくはアルゴノート(Ago)ドメイン、またはそのバリエーション。

【0252】

例示的なCas9等価物タンパク質配列は以下を包含し得る:

【表20-1】

説明	配列
AsCas12a (以前はCpf1として公知) (<i>Acidaminococcus</i> sp. (BV3L6株))UniProtKB U2UMQ6	MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDDHYKELKPIIDRIYKTY ADQCLQLVQLDWENLSAIDSRYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDIYFIGRTDNLTD INKRHAIEYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNV FSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIIEVFSF PFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPHRFIPL FKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISH KKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGK ELSEAFKQKTSEILSHAHAAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSSLGLYLHLLDWFAVDES

10

20

30

40

50

【表 20-2】

	NEVDPEFSARLTGKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVN KEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTTEKTSSEGFDMYYDYFPAAKMI PKCSTQLKAVTAHFQTHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQ KGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIA EKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAE LFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIDTLYQELDYDVNHRSLSHDLSEAR ALLPNVITKEVSHEIHKDRRFTSDKFFFHVPTLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPII GIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQIFDYQKKLDNREKERVAAARQAWSVVGTIK DLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVLENLNFQFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLN CLVLKDYPAEKVGGVLPYQLTDQFTSFAKMGTSQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPF VWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRLPGFMPAWDIVFE KNETQFDAKGTPIFAGKRIVPIENHRTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPK LLENDSSHADITMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPFWPM DADANGAYHIALKGQQLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN (配列番号 281)	10
AsCas12a ニッカーゼ(例 えば、 RI226A)	MTQFEGIFTNLYQVSKTLRFELIPQGGKTLKHIEQGGFIEEDKARNNDHYKELKPIIDRIYKTY ADQCLQLVQLDWNLSAAIDSRYKEKTELETRNALIEEQATYRNAIHDIYFGRDNLTD INKRHAIEYKGLFKAELFNGKVLKQLGIVTTTEHENALLRSFDFKFTTYFSGFYENRKNV FSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIIFRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTIEEVSF PFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPHRIFPL FKQILSDRNTLSFIELEIFKSDEEVIQSFCKYKTLRNENVLETAEALFNELSIDLTHIFISH KKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGK ELSEAFKQKTSEILSHAHAAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQDLSLLGLYHLLDWFVDES NEVDPEFSARLTGKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVN KEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTTEKTSSEGFDMYYDYFPAAKMI PKCSTQLKAVTAHFQTHTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQ KGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIA EKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAE LFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIDTLYQELDYDVNHRSLSHDLSEAR ALLPNVITKEVSHEIHKDRRFTSDKFFFHVPTLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPII GIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQIFDYQKKLDNREKERVAAARQAWSVVGTIK DLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVLENLNFQFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLN CLVLKDYPAEKVGGVLPYQLTDQFTSFAKMGTSQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPF VWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRLPGFMPAWDIVFE KNETQFDAKGTPIFAGKRIVPIENHRTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPK LLENDSSHADITMVALIRSVLQMANNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPFWPM DADANGAYHIALKGQQLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN (配列番号 282)	20
LbCas12a (以 前はCpfIとし て公知) <i>Lachnospira-</i> <i>ceae bacterium</i> <i>GAM79</i> 参照 配列 WP_11962338 2.1	MNYKTGLEDFIGKESLSKTLRNALIPTESTKIHMEEMGVIRDDELRAEKQELKEIMDD YYRTFIEEKLGGIQQIQWNSLFQKMEETMEDISVRKDLDKIQNEKRKEICCYFTSDKRFK DLINAKLITDILPNFIKDNKEYTEEEKAKEQTRVLFQRIFATAFTNYFNQRRNNFSEDNIS TAISFRIVNENSEIHLQNMRAFQRIEQQYPEEVCGMEEYKDMLEQWQMKHIYSVDFYD RELTPQIEYYNGICGKINEHMQFCQKNRINKNDFRMKKLHKQILCKKSSYYEIPRFE SDQEVYDALNEFIKTMKKKEIRRCVHLGQECDDYDLGKIYISSNKEYEQISNALYGSWD TIRKCIKEEYMDALPGKGEKKEEKAEEAAKKEEYRSIADIDKIISLYGSEMDRTISAKKCI TEICDMAGQISIDPLVCNSDIKLLQNKEKTTEIKTILDSFLHVVYQWGQTHFVSDIIEKDSYF YSELEDVLEDFEGITTLNHNVRSYVTQKPYSTVKFKLHFGSPTLANGWSQSKEYDNNAI LLMRDQKIFYLGIHFNVRNKPDKQIIGHEKEEKGDYKKMIYNLLPGPSKMLPKVIFTSRS GQETYKPSKHILDGYNEKRHIKSSPKFDLGYCWDLDIDYKCEIHKHPDWKNYDFHFSDT KDYEDISGFYREVEMQGYQIKWTYISADEIQKLEDEKQIIFLFQIYNKDFSVHSTGKDNLH TMYLKNLFSEENLKDIVLKLNGEAELEFFRKASIKTPIVHKKGSVLVNRSYTQTVGNKEIR VSIPEEYYTEIYNLHNHIGKGKLSSEAQRYLDEGKIKSFTATKDIVKNYRYCCDHYFLHL PITINFKAISDVAVNERTLAYIAKKEDIHIGIDRGERNLLYISVVDVHGNIREQRSFNIVN GYDYQQKLKDRKSRDAARKNWEEIEKIKELKEGYLSMVIHYIAQLVVKYNNAVVAE DLNYGFKTGRFKVERQVYQKFETMLIEKLHYLVFKDREVCEEGLRGYQLTYIPESLK KVGKQCGFIFYVPAGYTSKIDPTTGFVNLSFKNLTNRESRQDFVGKFDIERYDRDKM FEFSFDYNNYIKKGITLASTKWKVYTNGTRLKRIVVNGKYTSQSMEVELTDAMEKMLQ RAGIEYHDGKDLKGQIVKEGIEAEIIDIIRLTVQMRNSRSESEDREYDRLISPVLDNKGELF FDTATADKTLPGDADANGAYCIALKGLYEVKQIKENWKENEQIPRNKLVDQDNKTWFD FMQKKRYL (配列番号 47)	30
		40

【表 20 - 3】

PeC as12a – 以前は Cpl1 <i>Prevotella</i> <i>copri</i> の参照配 列 WP_11922772 6.1として公知	MAKNFEDFKRLYSLSKTLRFLEAKPIGATLDNIVKSGLLDEDEHRAASYVVKVKKLIDEYH KVFIDRVLDDGCLPLENKGNNNSLAEYYESYVSRAQDEDAKKKIKEIQQNLRSVIAKKL TEDKAYANLFGNKLIESYKDKEDKKKIISDLIQFINTAESTQLDSMSQDEAKELVKEFW GFVTYFYGFDDNRKNMYTAEEKSTGIA YRLVNENLPKFIDNIEAFNRAITRPEIQENMGV LYSDFSEYLNVESIQEMFQLDYYNMLLTQKQIDVYNAIIGGKTDDHEDVVKIKGINEYINL YNQHKDDKLPKALKLFKQILSDRNAISWLPPEEFNSDQEVNLNAIKDCYERLAENVLGDK VLKSLGLSLADYSLDGIFIRNDLQLTDSQKMFNGWGVQNAIMQNIKRVPARKKHES EEDYEKRIAGIFKKADSFISISYINDCLNEADPNXAYFVENYFATHGAVNTPTMQRENLFA LVQNAYTEVAALLHSDYPTVKHLAQDKANVSKIKALLDAIKSLQHVFVPLLGGKGDSD KDERFYGELASLWAEELDTVTPLYNMIRNYMTRKPYSSQKKIKLNFENPQLGGWDANKE KDYATILRRNGLYYLAIMDKDSRKLKGAMPDGECEYKVMYKFFKDVTTMIPKCS TQLKDVQAYFKVNTDDYVLNSKAFNKPLTTTKEVIFDLNNVLYGKYKKFKQGYLTATGD NVGYTHAVNVWIKFCMDFLNSYDSTCIYDFSSLKPESYLSLDAFYQDANLLLYKLSFAR ASVSYINQLVEEGKMYLFIQYXKDFSEYSGKTPNMHTLYWKALFDERNLADVVYKLN GQAEIMYRKKSIENHTPHPANHPILNKNKDNKKKESLIDYDLIKDRRYTVDKIFMIFV PITMNFKSVGSEINQDVKAYLRHADDMHIGIDRGERHLLYLVVIDLQGNIEQYSLNE IVNEYNGNTYHTNYHDLVDVEERLKAQSWQTIENIKELKEGYLSQVIHKITQLMVR YHAIVLEDLKSGFMRSRQKVEKQVYQKFEKMLIDKLNLYLVDKKTVDVSTPGGLLNAY QLTCKSDSSQKLGKSGFLFYIPAWNTSKIDPVTGFVNLLDTHSLNSKEKIAFFSKFDAI RYNKDKKWHEIFNLDYDKFGKKAEDTRTKWTLCTRGMRIDTIRNKEKNSQWDNQEVD LTTEMKSLLEHYIIDHGNLKAISAQTDKAFITGLLHILKLTQMRNSITGTETDYLVS PADENGIFDYDSRSCGNQLPENADANGAYNIARKGLMLIEQIKNAEDLNNVKFDISNKA WLNFAQQKPYKNG (配列番号 283)	10
ErCas12a – 以前は Cpl1 <i>Eubacteri-</i> <i>um rectale</i> の 参照配列 WP_11922364 2.1として公知	MFSAKLISDILPEFVIHNNYSASEKEEKTQVIKLFSRIFATSFKDYFKNRANCE SANDISS SCHRIVNDNAEIFFSNALVYRRIVKNLSNDINKISGDMKDSLKEMSLEEIYSYKEYGEFI TQEGISFYNDICGKVNLFMNLVCQKNKENKNLYKLRKLHKQILCIADTSYEVYPYKFESD EEVYQSVNGFLDNISSKHIVERLRKIGENYNGYNLDKIYIVSKFYESVSQKTYRDWETIN TALEIHYNNILPGNGKSKADKVKKAVKNDLQKSI TEINELVSNYKLCPPDNKAETIYIHE ISHILNNEFAQELKYNPEIHLVESELKASELKNVLDVIMNAIFHWCSVFMTEELVDKDN FYAELEEIYDEIYPVISLYNLVRNYVTQKPYSTKKIKLNFGIPTLADGWSKSKEYSNNAI LMRDNLYYLGFNAKNKPKDKKIEGNTSENKGDYKMKMIYNLLPGPNKMIPKVFSSKTG VETYKPSAYILEGYKQKHLKSSKDFDITFCHDLIDYFKNCIAHPEWKNFGFDFSDTST YEDISGFYREVELQGYKIDWTYISEKDIDLLQEKQGLYLFQIYNKDFSKKSSGNDNLHT MYLKNLFSEENLKDIVLKLNGEAEIFFRKSSIKNPIHKKGSILVNRTYEAEEKDQFGNIQI VRKTIPIENIYQELYKYFNDKSDKELSDEAAKLKNVVGHHAAATNIVKDYRYTYDKYFL HMPITINFKANKTSFINDRILQYIAKEKDLHVIGIDRGERNLIYVSVIDTCGNIVEQKSFNI VNGYDYQIKLKQLEGARQIARKEWKEIGKIKEIKEGYLSLVIHEISKMVIKYNNAIAMED LSYGFKKGRIFKVERQVYQKIFETMLINKLNLYLVFKDISITENGGLLKGYQLTYIPDKLKN VGHQCGCIYVPAAYTSKIDPTTGFVNIFKFKDLTVDAKREFKKFDSIRYDSDKNLFCIT FDYNNFTITQNTVMSKSSWSVYTYGVRIKRRFVNGRFSNESDITIDTKDMEKTLEM TDIN WRDGHDLRQDIDYEVQHIFEIFKLTVMQMRNSLSELED RDYDRLISPVLNENNIFYDSAK AGDALPKDADANGAYCIALKGLYEIKQITENWKEDGKFSRDKLKISNKDWDFDIQNK YL (配列番号 284)	20
CsCas12a – 以前は Cpl1 <i>Clostridi-</i> <i>um sp.</i> <i>AF34-10B11</i> の 参照配列 WP_11853841 8.1として公知	MNYKTGLEDFIGKESLSKTLRNALIPTESTKIHMEEMGVIRDDELRAEKQQLKEIMDD YYRAFIEEKLGGIQGIQWNSLFQKMEETMEDISVRKDLDKIQNEKRKEICCYFTSDKRFK DLFNAKLITDILPNFIKDNKEYTEEEKAKEQTRVLFRQFATAFTNYFNQRRNNFSEDNIS TAISIRIVNENSEIHLQNMRAIFQRIEQQYPEEVCGMEEEYKDMLQEWQMKHIYLVDFYD RVLTPQGIIEYNGICGKINEHMQFCQKNRINKNDIFRMKKLHKQILCKKSSYYEIPRIE SDQEVYDALNEFIKTMKEKEIHCRCVHLGQKCDYDLGKIYISSNKYEQISNALYGSWD TIRKCIKEEYMDALPGKGEKKEEKAEEAAKKEEYRSIADIDKISLYGSEMDRTISAKKCI TEICDMAGQISTDPLVCNSDIKLLQNKETTEIKTILDSFLHVVYQWGTFTIVSDIEKDSYF YSELEDVLEDIEGITTLYNHVRSYVTQKPYSTVKFKLHFGSPTLANGWSQSKEYDNNAI LLMRDQKFFYLGHFVNRNPKDKQIHKGEKEEGDYKMKMIYNLLPGPSKMLPKVFTSRS GQETYKPSKHLDGYNEKRHIKSSPKFDLGYCWDLDIYYKECIHKHPDWKNYDFHFSDT KDYEDISGFYREVEMQGYQIKWTYISADEIQKLEKQIFLFIQYNKDFSVHSTGKDNLH TMYLKNLFSEENLKDIVLKLNGEAEIFFRKASIKTPVVHKKGSVLVNRSYTQTVGDKEI RVSIPEEYTYEINYLNHIGRGKLSLEAQRYLEERKIKSITATKDIVKNYRYCCDHYFLH LPITINFKAKSDIAVNERTLAYIAKKEDIHIGIDRGERNLLYISVVDVHGNIREQRSFNIVN GYDYQQLKLDREKSRDAARKNWEEIEKIKELKEGYLSMVIHYIAQLVVKYNAVVA DLNNGFKTGRIFKVERQVYQKIFETMLIEKLHLYLVFKDREVCCEGGVLRGYQLTYIPESLK	30

40

【表 20 - 4】

	KVGKQCGFIFYVPAGYTSKIDPTTGfVNLfSfKNLTNRESRQDFVGKfDEIRYDRDKKM FEFSFDYNNYIKKGTMLASTKWVYTNGTRLKRIVVNGKYTSQSMEVELTDAMEKML QRAGIEYHDGKDLKGQIVEKGIEAEIIDIFRLTVQMRNSRSESEDREYDRLISPVLNDKGE FFDTATADKTLPQDADANGAYCIALKGLYEVVKIKENWKENEQFPRNKLVDQNKTF DFMQKKRYL (配列番号 50)
BhCas12b <i>Bacillus hisashii</i> 参照 配列 WP_09514251 5.1	MATRSFILKIEPNEEVKKGLWKTHEVLNHGIAYYMNILKLIRQEAIYEHHEQDPKNPKK VSKAEIAELWDFVLKMQKCNSTHEVDKDEVFNILRELYEELVPSSVEKKGEANQLSN KELYPLVDPNSQSGKGTASSGRKPRWYNLKIAGDPSWEEKKKWEEDKKKDLAKILG KLAIEYGLIPLFIPYTDSEPIVKEIKWMEKSRNQSVRRDKDMFIQALERFLSWESWNLK VKEIEYKVEKEYKTLEERIKEDIQALKALEQYEKERQEQLLRDTLNTNEYRLSKRGLRG WREIIQKWLKMDENEPSEKYLEVFQDYQRKHPREAGDYSVYIEFLSKKENHFIWRNHPE YPYLYATIFCEIDKKKKDAKQQAIFTLADPINHPLWVRFEERSGSNLNKYRILTEQLHTE KLKKKLTVQLDRLIYPTESGGWEEKGKVDIVLLPSRQFYNQIFLDIEEKGKHAFYTKDES IKFPLKGTLLGARVQIFDRDHLRRYPHKVESGNVGRIYFNMTVNIEPTESPVSLSKLIHRD DIPKVVNFQPKELTEWIKDSKGKKLKSGLIESLEIGLRVMSIDLQORQAAAAASIEVVDQK PDIEGKLFFPIKGTELYAVHRAFNKLPGETLVKSREVLRLKAREDNLKL MNQKLNFLRN VLHFQQFEDITEREKRVTKWISRQENS DVPLVYQDELIQIRELMYKPYKDWVAFLLKQLH KRLEVEIGKEVKHWRKSLSDGRKGLYGISLKNIDEIDRTRKFLRLWSLRPTEPGEVRRLE PGQRFADQLNLHLNALKEDRLKKMANTIMHALGYCYDVRKKKWQAKNPACQIILFED LSNYPYERSRFENSKLMKWSRREIPRQVALQGEIYGLQVGEVGAQIFSSRIHAKTGSP GIRCSVVTKEKLQDNRIFFKNLQREGRLTLDKIAVLKEGDLYPDKGGEKFISSLKDRKCV TTHADINAAQNLQKRFWTRTHGFYKVYCKAYQVVDGQTVYIPESKDKQKQKIEEFGEY FILDKGVYEWVYAGKLKIKKGSSKQSSSELVSDILKDSFDLASELKGEKLMLYRDPG NVFSPDKWMAAGVFFGKLERILISKLTNQYSISTIEDDSSKQSM (配列番号 280)
ThCas12b <i>Thermomonas hydrothermalis</i> 参照配列 WP_07275483 8	MSEKTTQRAYTLRLNRASGCAVCQNNSCDCWHDALWATHKAVNRGAKAIFGDWLLT LRGGLCHTLVMEVPAKGNPPORPTDQERRDRRVLLALSWSVEDEHGAPKEITVAT GRDSADDRAKKVEEKLREILEKRDIFQEHEIDAWLQDCGPSLKAHIREDAVWVNRALF DAEVERIKTLTWEEAWDFLEPIFGTQYFAGIGDGKDKDDAEGPARQGEKAKDLVQKA GQWLSARIFGIGTGADFMSMAEAYEKIAK WASQAQNGDNGKATIEKLACALRPSEPPTL DVLKCSISGPGHKSATREYLKTLDDKSTVTQEDLNQLRKLADEDARNCRKKVGGKKGK KPWADEVLKDVENSCELTYLQDNSPARHREIFSVMLDHAARRVSMASHWIKKAEQRRR QIESDAQKLKLNQERAPSAVEWLDRI CESRSMITGANTGSGYRIRKRAIEGWSYVVQA WAEASCDTEDIKRIAARKVQADPEIEKFGDIQLFEALA ADEAICVWRDQEGTQNP SILID YVTGKTAEHNQKRFKVPAYRHPDEL RHPVFCDFGNSRWSIQFAIHKIEIRDRDKGAKQD TRQLQNRHGLKMRLWNGRSM TDVNLHWSSKRLTADLALDQNP NPNPTEVTRADRLG RAASSAFDHVKKNVFNEKEWNGRLQAPRAELDRIAKLEEQKGTEQAEKLRKRLRWYV SFSPLSPSGPFIVYAGQHNIQPKRSGQYAPHAQANKGRARLAQLILSRLPDLRLSVDLG HRFAAACAVWETLSSDAFRREIQGLNVLAGSGEGDLFLHVEMTGDDGKRRTVYRRI GPDQLLDNTPHPAPWARLDROFLIKLQGEDEGVREASNEELWTVHKLEVEVGRTVPLID RMVRSFGFKTEKQKERLKKLRELGWISAMPNEPSAETDEKEGEIRSISRSVDEL MSSAL GTLRLALKRHGNRARIAMTADYKPMPPGGQKYIFHEAKEASKNDDETKRRDNQIEFL QDALSLWHDLFSSPDWEDNEAKKLWQNHIATLPNYQTPEEISAEKLRVERNKKRKENR DKLRTAAKALAENDQLRQHLHDTWKERWESDDQWKERLRLSKDWIFPRGKAEDNPS IRHVGGLSITRINTISGLYQILKAFKMRPEPDDL RKNIPQKGDDELENFNRRLLEARDRLR EQRVKQLASRIIEAALGVGRIKIPKNGKLPKRPRITVDT PCHAVVIESLKT YRPDDLRT RENRLMQWSSAKVRKYLKEGCELYGLHFLVHPANYTSRQCSRTGLPGIRCD DVPTGD FLKAPWWRRRAINTAREKNGGDAKDRFLVDLYDHLNQLSKGEALPATVRVPRQGGNL FIAGAQLDDTNKERRAIQADLNAAANIGLRALLDPDWGRWWYVPCPDGTSEPALDRI EGSTAFNDVRSPLTGDNSSRRAPREIENLWRDPSGDSLES GTWSPTRAYWDTVQSRVIE LLRRHAGLPTS (配列番号 285)
LsCas12b <i>Laceyella sacchari</i> WP_13222189 4.1	MSIRSFKLKLT KSGVNAEQLRRLWRTHQLINDGIAYYMNWLVLRLQEDLFIRNKET NEIEKRSKEEIAVLLERVHKQQQRNQWSGEVDEQTLQALRQLYEEIVPSVIGKSGNA SLKARFFLGPLVDPNKTTKDVSKSGPTPKWKKMKDAGDPNVVQYEEKYMAERQTL VRLEEMGLIPLFPMYTDEVGDIHWLPQASGYTRTWDRDMFQQAIERLLSWESWNRVR ERRAQFEKTHDIFASRFSSESDVQVMNKLREYEAQGEKSLEENAFAPNEPYALT K KALR GWERVYHSWMRLDSAASEEAYWQEVATCQTAMRGEFGDPAIYQFLAQKENHDIWRG YPERVIDFAELNHLQRELRRAKEDATITL PDSVDHPLWVRYEAPGGTNIHG YDLVQDT KRNLTLILDKFIPLDENGSWHEVKKVPISLAKSKQIFHRQVWLQEEQKQKKREVVFYDY STNLPHLGTLAGAKLQWDRNIFLNKRTQQQIEETGEIGKVIFFNISVDVRPAVEVKNGRLQ NGLGKALT VLTHPDGT KIVTGWKAEQLEKWWGESGRVSSLG LDSLSEGLRVMSIDLQG

10

20

30

40

50

【表 20-5】

	RTSATVSVFEITKEAPDNPYKFFYQLEGTEMFVHQRSLFLLALPGENPPQKIKQMREIRW KERNRIKQQVDQLSAILRLHKKVNEDERIQAIKLLQKVASWQLNEEIIATAWNQALSQ YSKAKENDLQWNQAIKNAHHQLEPVVGKQISLWRKDLSTGRQGIAGLSLWSIEELEAT KKLLTRWSKRSREPGVVKRIERFETFAKIQHHINQVKENRLKQLANLIVMTALGYKYD QEQKKWIEVYPACQVVLFFENLSYRISFERSRRENKKLMEWSHRSPKLVQMGGELIFG LQVADVYAAAYSSRYHGRTGAPGIRCHALTEADLRNETNIIHELIEAGFIKEEHRPYLQQG DLVPWSSGGEFATLQKPYDNPRILTLHADINAAQNIQKRFWHPSMWFRVNCESVMEGE IVTYVPKNKTVHKKQGKTFRFVKVEGSDVYEWAKWSKNRNKNTFSSITERKPPSSMILF RDPSGTFKEQEWVEQKTFWGWKVQSMIQAAYMKKTIVQRMEE (配列番号 286)
DtCas12b <i>Dsulfonatobium thiodis-</i> <i>mutans</i> WP 03138643 7	MVLGRKDDTAELRRALWTTHEHVNLAVAEVERVLLRCRGRSYWTLDRRGDPVHVPES QVAEDALAMAREAQRRNGWPVVGEDDEILLALRYLYEQIVPSCLLDDLGLKPLKGDAQK IGTNYAGPLFDSDTCCRDEGKDVACCGPFHEVAGKYLALPEWATPISKQEFDFGKDAS HLRFKATGGDDAFFRVSEKANAWYEDPANQDALKNKAYNKDDWKKEKDKGISSWA VKYIQKQLQLGQDPRTEVRRKLWLELGLLPLIFIPVIFDKTMVGNLWNRLAVRLALAHLL SWESWNHRAVQDQALARAARDELALFLGMEDGFAGLREYELRRNESIKQHAIFEPVD RPYVVSGRALRSWTRVREEWLRHGDTQESRKNICNRLQDRLRGKIFGDPDVFHWLAED GQELWKERDCVTSFSLNDADGLLEKRGYALMTFADARLHPRWAMYAPGGSNLR TYQIRKTENGLWADVLLSPRNESAABVEEKTFFNRLAPSGQLSNVSDQIQKGSKMVG RCRYQSANQQIFGLLGGAELIFDRKRIANEQHGATDLASKPGHVWFKLTLDDVRPQAPQ GWLDDGKGRPALPPEAKHIFKTALSNSKSFADQVRPGLRVLSVDLGVRSAACSVIFELVR GGPDQGTIFYPAADGRTVDDPEKLWAKHERSFKITLPGENPSRKEEIAARRAAMEELRSLN GDIRRLKAILRLSVLQEDDPRTEHLRLFMEAIVDDPAKSALNAELFKGFGDDRFRSTPDL WKQHCHFFHDKAEKVVAERFSRWRTEPRKSSSWQDWRERRGYAGGKSYWAVTYLE AVRGLILRWNMGRITYGEVNRQDKKQFGTVASALLHHINQLKEDRIKTGADMIIQAAR GFVPRKNGAGWVQVHEPCRLILFEDLARYRIFRTDRSRRENSRLMRWSHREIVNEVGMQ GELYGLHVDITTEAGFSSRYLASSGAPGVRCHLVEEDIFHDGLPGMHLVGEILDWLLPKD KDRTANEARRLLGGMVRPGLVPWDGGGEFATLNAASQLHVIHADINAAQNLQRRFW GRCGEAIRIVCNQLSVDGSTRYEMAKAPKARLLGALQQLKNGDAPFHLTSIPNSQKPEN SYVMTPTNAGKKYRAGPGGEKSSGEDELALDIVEQAEELAQGRKTFIRDPSGVIFAPDR WLPSEIYWSRIRRIWQVTLEARNSSGRQERAEMDEMPY (配列番号 287)

10

20

【0253】

【0254】

本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターは、ガイドヌクレオチド配列によってプログラム型DNA結合タンパク質ドメインとして用いられてもよいCas12a(Cpf1)(dCpf1)バリエーションをもまた含んでもよい。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は有さず、Cas12a(Cpf1)のN末端はCas9のアルファヘリックスシステムの認識ローブを有さない。Zetsche et al., Cell, 163、759-771, 2015(これは参照により本明細書に組み込まれる)においては、Cas12a(Cpf1)のRuvC様ドメインは両方のDNA鎖を切断することを担い、RuvC様ドメインの不活性化がCas12a(Cpf1)ヌクレアーゼ活性を不活性化するということが示された。一部の態様において、napDNAbpは微生物CRISPR-Casシステムの単一のエフェクターである。微生物CRISPR-Casシステムの単一のエフェクターは、限定されないが、Cas9、Cas12a(Cpf1)、Cas12b1(C2c1)、Cas13a(C2c2)、およびCas12c(C2c3)を包含する。典型的には、微生物CRISPR-Casシステムはクラス1およびクラス2システムに分けられる。クラス1システムはマルチサブユニットエフェクター複合体を有するが、クラス2システムは単一のタンパク質エフェクターを有する。例えば、Cas9およびCas12a(Cpf1)はクラス2エフェクターである。Cas9およびCas12a(Cpf1)に加えて、3つの別個のクラス2 CRISPR-Casシステム(Cas12b1、Cas13a、およびCas12c)が、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Shmakov et al., “Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR Cas Systems”, Mol. Cell, 2015 Nov 5; 60(3):385-397によって記載されている。

30

40

【0255】

システムの2つCas12b1およびCas12cのエフェクターは、Cas12aに関係するRuvC

50

様エンドヌクレアーゼドメインを含有する。第3のシステムのCas13aは、2つの予測される(predicted)HEPN RNaseドメインを有するエフェクターを含有する。Cas12b1によるCRISPR RNAの生産とは違って、成熟CRISPR RNAの生産はtracrRNA非依存的である。Cas12b1はDNA切断についてはCRISPR RNAおよびtracrRNA両方に依存する。細菌Cas13aは、そのRNAによって活性化される一本鎖RNA分解活性とは別個のCRISPR RNA成熟のための固有のRNase活性を所有することが示されている。これらのRNase機能は、互いとは、およびCas12aのCRISPR RNAプロセッシング挙動とは異なる。例として、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、East-Seletsky, et al., “Two distinct RNase activities of CRISPR-Cas13a enable guide-RNA processing and RNA detection”, Nature, 2016 Oct 13; 538(7624):270-273を参照されたい。Leptotrichia shahiiのCas13aのin vitroの生化学分析は、Cas13aが単一のCRISPR RNAによってガイドされ、相補的なプロトスペーサーを有するssRNA標的を切断するようにプログラムされ得るということを示している。2つの保存されたHEPNドメイン上の触媒残基が切断を媒介する。触媒残基の突然変異は触媒的に不活性なRNA結合タンパク質を生成する。例として、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Abudayyeh et al., “C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector”, Science, 2016 Aug 5; 353(6299)を参照されたい。

10

【0256】

Alicyclobacillus acidoterrastrisのCas12b1(AacC2c1)の結晶構造がキメラ単一分子ガイドRNA(sgRNA)との複合体として報告されている。例として、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Liu et al., “C2c1-sgRNA Complex Structure Reveals RNA-Guided DNA Cleavage Mechanism”, Mol. Cell, 2017 Jan 19; 65(2):310-322を参照されたい。結晶構造は三者複合体として標的DNAに結合したAlicyclobacillus acidoterrestris C2c1としてもまた報告されている。例として、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Yang et al., “PAM-dependent Target DNA Recognition and Cleavage by C2C1 CRISPR-Cas endonuclease”, Cell, 2016 Dec 15; 167(7):1814-1828参照されたい。AacC2c1の触媒的に有能な立体配座は、独立して単一のRuvC触媒ポケット内に配置された標的および非標的DNA鎖両方によって捕捉されており、C2c1によって媒介される切断は、標的DNAの互い違いの7ヌクレオチド切断をもたらす。C2c1三者複合体と先に同定されたCas9およびCpf1カウンターパートとの間の構造比較は、CRISPR-Cas9システムによって用いられる機序の多様性を実証する。一部の態様において、napDNAbpはC2c1、C2c2、またはC2c3タンパク質であってもよい。一部の態様において、napDNAbpはC2c1タンパク質である。一部の態様において、napDNAbpはCas13aタンパク質である。一部の態様において、napDNAbpはCas12cタンパク質である。一部の態様において、napDNAbpは、天然に存在するCas12b1(C2c1)、Cas13a(C2c2)、またはCas12c(C2c3)タンパク質と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様において、napDNAbpは天然に存在するCas12b1(C2c1)、Cas13a(C2c2)、またはCas12c(C2c3)タンパク質である。

20

30

40

【0257】

H. Cas9環状置換体

様々な態様において、本明細書に開示の方法および組成物において利用されるプライムエディターはCas9の環状置換体を含んでもよい。

【0258】

「環状に置換されたCas9」またはCas9の「環状置換体」または「CP-Cas9」という用語は、循環置換体バリエーションとして生じるかまたは改変されているかまたは操作されるいずれかのCas9タンパク質またはそのバリエーションを指し、これは、Cas9タンパク質(例

50

として、野生型Cas9タンパク質)のN末端およびC末端が局所的に再配置されていることを意味する。このような環状に置換されたCas9タンパク質またはそれらのバリエーションは、ガイドRNA(gRNA)と複合体化した場合にDNAに結合する能力を保持する。それぞれは参照により本明細書に組み込まれる、Oakes et al., “Protein Engineering of Cas9 for enhanced function,” *Methods Enzymol.*, 2014, 546:491-511 and Oakes et al., “CRISPR-Cas9 Circular Permutants as Programmable Scaffolds for Genome Modification,” *Cell*, January 10, 2019, 176:254-267を参照されたい。もたらされる環状に置換されたタンパク質がガイドRNA(gRNA)と複合体化した場合にDNAに結合する能力を保持する限り、本開示は、いずれかの先に公知のCP-Cas9を企図するか、または新たなCP-Cas9を用いる。

10

いずれかのバリエーション、オルソログ、またはいずれかの操作されたもしくは天然に存在するCas9を包含する本明細書に記載のCas9タンパク質のいずれか、またはその等価物が、環状置換体バリエーションとして再構成されてもよい。

様々な態様において、Cas9の環状置換体は以下の構造を有してもよい：

N末端 - [元のC末端] - [任意のリンカー] - [元のN末端] - C末端。

【0259】

一例として、本開示は、カノニカルな*S. pyogenes*のCas9(UniProtKB-Q99ZW2(CAS9_STRP1)の1368アミノ酸(ナンバリングは、配列番号9におけるアミノ酸の場所に基づく))の以下の環状置換体を企図する。

N末端 - [1268-1368] - [任意のリンカー] - [1-1267] - C末端；

20

N末端 - [1168-1368] - [任意の] - [1-1167] - C末端；

N末端 - [1068-1368] - [任意のリンカー] - [1-1067] - C末端；

N末端 - [968-1368] - [任意のリンカー] - [1-967] - C末端；

N末端 - [868-1368] - [任意のリンカー] - [1-867] - C末端；

N末端 - [768-1368] - [任意のリンカー] - [1-767] - C末端；

N末端 - [668-1368] - [任意のリンカー] - [1-667] - C末端；

N末端 - [568-1368] - [任意のリンカー] - [1-567] - C末端；

N末端 - [468-1368] - [任意のリンカー] - [1-467] - C末端；

N末端 - [368-1368] - [任意のリンカー] - [1-367] - C末端；

N末端 - [268-1368] - [任意のリンカー] - [1-267] - C末端；

30

N末端 - [168-1368] - [任意のリンカー] - [1-167] - C末端；

N末端 - [68-1368] - [任意のリンカー] - [1-67] - C末端；または

N末端 - [10-1368] - [任意のリンカー] - [1-9] - C末端、または他のCas9タンパク質の対応する環状置換体(他のCas9オルソログ、バリエーションなどを包含する)。

【0260】

特定の態様において、環状置換体Cas9は、以下の構造を有する(*S. pyogenes*のCas9(UniProtKB-Q99ZW2(CAS9_STRP1)の1368アミノ酸に基づく)(ナンバリングは、配列番号9におけるアミノ酸の場所に基づく)：

N末端 - [102-1368] - [任意のリンカー] - [1-101] - C末端；

N末端 - [1028-1368] - [任意のリンカー] - [1-1027] - C末端；

40

N末端 - [1041-1368] - [任意のリンカー] - [1-1043] - C末端；

N末端 - [1249-1368] - [任意のリンカー] - [1-1248] - C末端；または

N末端 - [1300-1368] - [任意のリンカー] - [1-1299] - C末端、または他のCas9

タンパク質の対応する環状置換体(他のCas9オルソログ、バリエーションなどを包含する)。

【0261】

また他の態様において、環状置換体Cas9は、以下の構造を有する(*S. pyogenes*のCas9(UniProtKB-Q99ZW2(CAS9_STRP1)の1368アミノ酸に基づく)(ナンバリングは、配列番号9におけるアミノ酸の場所に基づく)：

N末端 - [103-1368] - [任意のリンカー] - [1-102] - C末端；

N末端 - [1029-1368] - [任意のリンカー] - [1-1028] - C末端；

50

N末端-[1042-1368]-[任意のリンカー]-[1-1041]-C末端;
N末端-[1250-1368]-[任意のリンカー]-[1-1249]-C末端;または
N末端-[1301-1368]-[任意のリンカー]-[1-1300]-C末端、または他のCas9
タンパク質の対応する環状置換体(他のCas9オルソログ、バリエーションなどを包含する)。
【0262】

一部の態様において、環状置換体は、直接的にまたはアミノ酸リンカーなどのリンカー
を使用することによってのいずれかで、Cas9のC末端断片をCas9のN末端断片に連結す
ることによって形成され得る。一部の態様において、C末端断片は、Cas9のアミノ酸(例
として、アミノ酸約1300-1368)のC末端95%以上、あるいはCas9(例として、配列番
号54-63のいずれか1つ)のC末端90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、5
5%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、もしくは5%、
またはより多くに対応してもよい。N末端部分は、Cas9のアミノ酸(例として、アミノ酸
約1~1300)のN末端95%以上、あるいはCas9の(例として、配列番号9の)N末端90%
、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30
%、25%、20%、15%、10%、もしくは5%、またはそれより多くに対応してもよい。

10

【0263】

一部の態様において、環状置換体は、直接的にまたはアミノ酸リンカーなどのリンカー
を使用することによってのいずれかで、Cas9のC末端断片をCas9のN末端断片に連結す
ることによって形成され得る。一部の態様において、N末端へと再配置されるC末端断片
は、Cas9のアミノ酸のC末端30%以下(例として、配列番号9のアミノ酸1012~1368)
を包含するかまたはそれらに対応する。一部の態様において、N末端へと再配置されるC
末端断片は、Cas9のアミノ酸(例として、配列番号9のCas9)のC末端30%、29%、28
%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、1
6%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3
%、2%、または1%を包含するかまたはそれらに対応する。一部の態様において、N末
端へと再配置されるC末端断片は、Cas9(例として、配列番号9のCas9)のC末端410残
基以下を包含するかまたはそれらに対応する。一部の態様において、N末端へと再配置さ
れるC末端部分は、Cas9(例として、配列番号9のCas9)のC末端410、400、390、38
0、370、360、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、2
50、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、
120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、20、または10残基を包含する
かまたはそれらに対応する。一部の態様において、N末端へと再配置されるC末端部分は
、Cas9(例として、配列番号9のCas9)のC末端357、341、328、120、または69残
基を包含するかまたはそれらに対応する。

20

30

【0264】

他の態様において、環状置換体Cas9バリエーションは、次の方法に基づくCas9一次構造
のトポロジ的再配置として定められてもよく、これは配列番号9の*S.pyogenes* Cas9
に基づく:(a)Cas9一次構造の内部のアミノ酸残基に対応する環状置換体(CP)部位を選択
し、これが元のタンパク質を2つの半分:N末端領域およびC末端領域へと切り分けること;
(b)元のN末端領域に先行するように元のC末端領域(CP部位アミノ酸を含む)を動かすこ
とによって、Cas9タンパク質配列を改変し(例として、遺伝子工学技術による)、それによ
って、今やCP部位アミノ酸残基で始まるCas9タンパク質の新たなN末端を形成すること。
CP部位は、例えばヘリカルIIドメイン、RuvCIIIドメイン、またはCTDドメインを
包含するCas9タンパク質のいずれかのドメイン上に位置付けられ得る。例えば、CP部位は
、(配列番号9の*S.pyogenes* Cas9に対して)元のアミノ酸残基181、199、230、270
、310、1010、1016、1023、1029、1041、1247、1249、または1282に位置
付けられてもよい。ゆえに、ひとたびN末端に位置替えされると、元のアミノ酸181、1
99、230、270、310、1010、1016、1023、1029、1041、1247、1249、ま
たは1282は新たなN末端アミノ酸になるであろう。これらのCP-Cas9タンパク質の命名
法は、それぞれCas9-CP¹⁸¹、Cas9-CP¹⁹⁹、Cas9-CP²³⁰、Cas9-CP²⁷⁰、Cas9-C

40

50

【表 2 1 - 2】

CP名	配列	配列番 号
	FELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVE QHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLKDVL SAYNKHHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGA PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGSGGSGGSGG SGGSGGSGGMDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFV L GNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL EESFLVE EDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRG HFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL ENLI AQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGD QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPIFLKDNREKIEKILTRIPY YVGPLARGNSRFA WMTRKSEETITPWNFEFVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVY NELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSV EISGVEDRINFASLGTYHDLLKHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNF MQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGR HKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLY LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN VPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQ ITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDIRKDFQFYKVR EINNYYHHA HDAYLN AVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVVRKMIKSEQ	10
CP1041	NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFA TVRKVL SMPQVNIVKKTE VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKK LKS VKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAGYKEVKKDLI IKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE FSKRVLADANLKDVL SAYNKHHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK RYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGDKKY SIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFV L GNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRL KRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNGLFGN LIALSLGLTPNFKSNFLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSD AILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL GELHAILRRQEDFYPIFLKDNREKIEKILTRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP WNFEFVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRINFAS LGTYHDLLKHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMK QLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNF MQLIHDDSLTFKEDI QKAQVSGGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARE NQTTQKGQKNSRERMKRIE GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMY VDQELDINRLSDYDVHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKM KNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDIRKDFQFYKVR EINNYYHHAHDAYLN AVVGT ALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYS	290
CP1249	PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLKDVL SAYNKHHRDKPIREQAE NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGG DGGSGGSGGSGGSGGSGGMDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFV L G NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVD DSFFHRL EESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAIL SARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFLAEDAKLQLSKDTY DDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQ DLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEEL LVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPIFLKDNREKIEKILTRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEFVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKV LPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQL KEDYFKKIECFDSVEISGVEDRINFASLGTYHDLLKHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT	291

10

20

30

40

50

【表 2 2】

CP名	配列	配列番号
CP1012 C-末端断片	DYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDIFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV VAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEK LKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD	54
CP1028 C-末端断片	EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDIFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL VAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEK LKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD	58
CP1041 C-末端断片	NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDIFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV VAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEK LKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD	61
CP1249 C-末端断片	PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD	62
CP1300 C-末端断片	KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD	293

10

20

【0 2 6 7】

I. 改変されたPAM特異性を有するCas9バリエーション

本開示の方法および組成物において利用されるプライムエディターはまた、改変されたPAM特異性を有するCas9バリエーションを含んでもよい。本開示のいくつかの側面は、その3'末端にカノニカルなPAM(5'-NGG-3'(式中、NはA、C、GまたはTである))を含まない標的配列に対して活性を示すCas9タンパク質を提供する。一部の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NGG-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。一部の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NNG-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。一部の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NNA-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。一部の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NNC-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。一部の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NNT-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。一部の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NGT-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。一部の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NGA-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。一部の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NGC-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。一部の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NAA-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。一部の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NAC-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。一部の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NAT-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。さらに他の態様において、Cas9タンパク質は、その3'末端に5'-NAG-3'PAM配列を含む標的配列に対して活性を示す。

30

40

【0 2 6 8】

第1のアミノ酸残基(例としてA)から第2のアミノ酸残基(例としてT)への本明細書に記載のアミノ酸突然変異のいずれか(例として、A262T)は、第1のアミノ酸残基から(例と

50

して、保存された)第2のアミノ酸残基に類似であるアミノ酸残基への突然変異をもまた包含してもよいということは了解されるはずである。例えば、疎水性側鎖を有するアミノ酸(例として、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファン)の突然変異は、異なる疎水性側鎖を有する第2のアミノ酸(例として、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファン)への突然変異であってもよい。例えば、アラニンからトレオニンへの突然変異(例としてA262T突然変異)はまた、アラニンからサイズおよび化学的特性がトレオニンに類似であるアミノ酸、例えばセリンへの突然変異であってもよい。別の例として、正荷電側鎖を有するアミノ酸(例として、アルギニン、ヒスチジン、またはリジン)の突然変異は、異なる正荷電側鎖を有する第2のアミノ酸(例として、アルギニン、ヒスチジン、またはリジン)への突然変異であってもよい。別の例として、極性側鎖を有するアミノ酸(例として、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン)の突然変異は、異なる極性側鎖を有する第2のアミノ酸(例として、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン)への突然変異であってもよい。追加の類似のアミノ酸ペアは次を包含するが、これらに限定されない:フェニルアラニンおよびチロシン;アスパラギンおよびグルタミン;メチオニンおよびシステイン;アスパラギン酸およびグルタミン酸;ならびにアルギニンおよびリジン。当業者は、このような保存的アミノ酸置換が蓋然的にはタンパク質構造に対して軽度の効果を有し、機能を毀損することなしに良く忍容されることが蓋然的であるということを認識するであろう。一部の態様において、1つのアミノ酸からトレオニンへの本明細書において提供されるアミノ酸突然変異のいずれかのアミノは、セリンへのアミノ酸突然変異であってもよい。一部の態様において、1つのアミノ酸からアルギニンへの本明細書において提供されるアミノ酸突然変異のいずれかのアミノは、リジンへのアミノ酸突然変異であってもよい。一部の態様において、1つのアミノ酸からイソロイシンへの本明細書において提供されるアミノ酸突然変異のいずれかのアミノは、アラニン、バリン、メチオニン、またはロイシンへのアミノ酸突然変異であってもよい。一部の態様において、1つのアミノ酸からリジンへの本明細書において提供されるアミノ酸突然変異のいずれかのアミノは、アルギニンへのアミノ酸突然変異であってもよい。一部の態様において、1つのアミノ酸からアスパラギン酸への本明細書において提供されるアミノ酸突然変異のいずれかのアミノは、グルタミン酸またはアスパラギンへのアミノ酸突然変異であってもよい。一部の態様において、1つのアミノ酸からバリンへの本明細書において提供されるアミノ酸突然変異のいずれかのアミノは、アラニン、イソロイシン、メチオニン、またはロイシンへのアミノ酸突然変異であってもよい。一部の態様において、1つのアミノ酸からグリシンへの本明細書において提供されるアミノ酸突然変異のいずれかのアミノは、アラニンへのアミノ酸突然変異であってもよい。しかしながら、追加の保存されたアミノ酸残基は当業者によって認識されるであろうということが認識されるべきであり、他の保存されたアミノ酸残基へのアミノ酸突然変異のいずれかもまた本開示の範囲内である。

【0269】

一部の態様において、Cas9タンパク質は、5'-NAA-3'PAM配列をその3'末端に含む標的配列に対して活性を発揮する突然変異の組合せを含む。一部の態様において、突然変異の組合せは、表1の列記されているクローンのいずれか1つに存在する。一部の態様において、突然変異の組合せは、表1の列記されているクローンの保存的突然変異である。一部の態様において、Cas9タンパク質は、表1に列記されるCas9クローンのいずれか1つの突然変異の組合せを含む。

【0270】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表1 : NAA PAMクローン

野生型SpCas9からの変異 (例えば、配列番号9)	
D177N, K218R, D614N, D1135N, P1137S, E1219V, A1320V, A1323D, R1333K	
D177N, K218R, D614N, D1135N, E1219V, Q1221H, H1264Y, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, G715C, D1135N, E1219V, Q1221H, H1264Y, A1320V, R1333K	
A367T, K710E, R1114G, D1135N, P1137S, E1219V, Q1221H, H1264Y, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R753G, D861N, D1135N, K1188R, E1219V, Q1221H, H1264H, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, V743I, R753G, M1021T, D1135N, D1180G, K1211R, E1219V, Q1221H, H1264Y, A1320V, R1333K	10
A10T, I322V, S409I, E427G, V743I, R753G, E762G, D1135N, D1180G, K1211R, E1219V, Q1221H, H1264Y, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R753G, D1135N, D1180G, K1211R, E1219V, Q1221H, H1264Y, S1274R, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, A589S, R753G, D1135N, E1219V, Q1221H, H1264H, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R753G, E757K, G865G, D1135N, E1219V, Q1221H, H1264Y, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, R753G, E757K, D1135N, E1219V, Q1221H, H1264Y, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, K599R, M631A, R654L, K673E, V743I, R753G, N758H, E762G, D1135N, D1180G, E1219V, Q1221H, Q1256R, H1264Y, A1320V, A1323D, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, K673E, V743I, R753G, E762G, N869S, N1054D, R1114G, D1135N, D1180G, E1219V, Q1221H, H1264Y, A1320V, A1323D, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, L727I, V743I, R753G, E762G, R859S, N946D, F1134L, D1135N, D1180G, E1219V, Q1221H, H1264Y, N1317I, A1320V, A1323D, R1333K	20
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, K673E, V743I, R753G, E762G, N803S, N869S, Y1016D, G1077D, R1114G, F1134L, D1135N, D1180G, E1219V, Q1221H, H1264Y, V1290G, L1318S, A1320V, A1323D, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, K673E, V743I, R753G, E762G, N803S, N869S, Y1016D, G1077D, R1114G, F1134L, D1135N, K1151E, D1180G, E1219V, Q1221H, H1264Y, V1290G, L1318S, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, K673E, V743I, R753G, E762G, N803S, N869S, Y1016D, G1077D, R1114G, F1134L, D1135N, D1180G, E1219V, Q1221H, H1264Y, V1290G, L1318S, A1320V, A1323D, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, K673E, F693L, V743I, R753G, E762G, N803S, N869S, L921P, Y1016D, G1077D, F1080S, R1114G, D1135N, D1180G, E1219V, Q1221H, H1264Y, L1318S, A1320V, A1323D, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, E630K, R654L, K673E, V743I, R753G, E762G, Q768H, N803S, N869S, Y1016D, G1077D, R1114G, F1134L, D1135N, D1180G, E1219V, Q1221H, H1264Y, L1318S, A1320V, R1333K	30
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, K673E, F693L, V743I, R753G, E762G, Q768H, N803S, N869S, Y1016D, G1077D, R1114G, F1134L, D1135N, D1180G, E1219V, Q1221H, G1223S, H1264Y, L1318S, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, K673E, F693L, V743I, R753G, E762G, N803S, N869S, L921P, Y1016D, G1077D, F1801S, R1114G, D1135N, D1180G, E1219V, Q1221H, H1264Y, L1318S, A1320V, A1323D, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, V743I, R753G, M1021T, D1135N, D1180G, K1211R, E1219V, Q1221H, H1264Y, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, K673E, V743I, R753G, E762G, M673I, N803S, N869S, G1077D, R1114G, D1135N, V1139A, D1180G, E1219V, Q1221H, A1320V, R1333K	
A10T, I322V, S409I, E427G, R654L, K673E, V743I, R753G, E762G, N803S, N869S, R1114G, D1135N, E1219V, Q1221H, A1320V, R1333K	40

【0 2 7 1】

一部の態様において、Cas9タンパク質は、表1のバリエーションのいずれか1つによって提供されるCas9タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様において、Cas9タンパク質は、表1のバリエーションのいずれか1つによって提供されるCas9タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0 2 7 2】

一部の態様において、Cas9タンパク質は、配列番号9によって提供されるStreptococcus

10

20

30

40

50

ccus pyogenes Cas9と比較して、カノニカルなPAM(5'-NGG-3')をその3'末端に含まない標的配列に対して増大した活性を発揮する。一部の態様において、Cas9タンパク質は、カノニカルなPAM配列(5'-NGG-3')に直接的に隣接しない3'末端を有する標的配列に対して、同じ標的配列に対する配列番号9によって提供されるStreptococcus pyogenes Cas9の活性と比較して、少なくとも5倍増大した活性を発揮する。一部の態様において、Cas9タンパク質は、カノニカルなPAM配列(5'-NGG-3')に直接的に隣接しない標的配列に対して、同じ標的配列に対する配列番号9によって提供されるStreptococcus pyogenesの活性と比較して、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1,000倍、少なくとも5,000倍、少なくとも10,000倍、少なくとも50,000倍、少なくとも100,000倍、少なくとも500,000倍、または少なくとも1,000,000倍増大した活性を発揮する。一部の態様において、標的配列の3'末端はAAA、GAA、CAA、またはTAA配列に直接的に隣接する。一部の態様において、Cas9タンパク質は、5'-NAC-3'PAM配列をその3'末端に含む標的配列に対して活性を発揮する突然変異の組合せを含む。一部の態様において、突然変異の組合せは、表2の列記されているクローンのいずれか1つに存在する。一部の態様において、突然変異の組合せは、表2の列記されているクローンの保存的突然変異である。一部の態様において、Cas9タンパク質は、表2の列記されているCas9クローンのいずれか1つの突然変異の組合せを含む。

10

【0273】

【表24-1】

20

表2：NAC PAMクローン

野生型SpCas9からの変異(例えば、配列番号9)
T472I, R753G, K890E, D1332N, R1335Q, T1337N
I1057S, D1135N, P1301S, R1335Q, T1337N
T472I, R753G, D1332N, R1335Q, T1337N
D1135N, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
T472I, R753G, K890E, D1332N, R1335Q, T1337N
I1057S, D1135N, P1301S, R1335Q, T1337N

30

40

50

【表 2 4 - 2】

T472I, R753G, D1332N, R1335Q, T1337N
T472I, R753G, Q771H, D1332N, R1335Q, T1337N
E627K, T638P, K652T, R753G, N803S, K959N, R1114G, D1135N, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
E627K, T638P, K652T, R753G, N803S, K959N, R1114G, D1135N, K1156E, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
E627K, T638P, V647I, R753G, N803S, K959N, G1030R, I1055E, R1114G, D1135N, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
E627K, E630G, T638P, V647A, G687R, N767D, N803S, K959N, R1114G, D1135N, E1219V, D1332G, R1335Q, T1337N
E627K, T638P, R753G, N803S, K959N, R1114G, D1135N, E1219V, N1266H, D1332N, R1335Q, T1337N
E627K, T638P, R753G, N803S, K959N, I1057T, R1114G, D1135N, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
E627K, T638P, R753G, N803S, K959N, R1114G, D1135N, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
E627K, M631I, T638P, R753G, N803S, K959N, Y1036H, R1114G, D1135N, E1219V, D1251G, D1332G, R1335Q, T1337N
E627K, T638P, R753G, N803S, V875I, K959N, Y1016C, R1114G, D1135N, E1219V, D1251G, D1332G, R1335Q, T1337N, I1348V
K608R, E627K, T638P, V647I, R654L, R753G, N803S, T804A, K848N, V922A, K959N, R1114G, D1135N, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
K608R, E627K, T638P, V647I, R753G, N803S, V922A, K959N, K1014N, V1015A, R1114G, D1135N, K1156N, E1219V, N1252D, D1332N, R1335Q, T1337N
K608R, E627K, R629G, T638P, V647I, A711T, R753G, K775R, K789E, N803S, K959N, V1015A, Y1036H, R1114G, D1135N, E1219V, N1286H, D1332N, R1335Q, T1337N
K608R, E627K, T638P, V647I, T740A, R753G, N803S, K948E, K959N, Y1016S, R1114G, D1135N, E1219V, N1286H, D1332N, R1335Q, T1337N
K608R, E627K, T638P, V647I, T740A, N803S, K948E, K959N, Y1016S, R1114G, D1135N, E1219V, N1286H, D1332N, R1335Q, T1337N
I670S, K608R, E627K, E630G, T638P, V647I, R653K, R753G, I795L, K797N, N803S, K866R, K890N, K959N, Y1016C, R1114G, D1135N, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
K608R, E627K, T638P, V647I, T740A, G752R, R753G, K797N, N803S, K948E, K959N, V1015A, Y1016S, R1114G, D1135N, E1219V, N1266H, D1332N, R1335Q, T1337N
I570T, A589V, K608R, E627K, T638P, V647I, R654L, Q716R, R753G, N803S, K948E, K959N, Y1016S, R1114G, D1135N, E1207G, E1219V, N1234D, D1332N, R1335Q, T1337N
K608R, E627K, R629G, T638P, V647I, R654L, Q740R, R753G, N803S, K959N, N990S, T995S, V1015A, Y1036D, R1114G, D1135N, E1207G, E1219V, N1234D, N1266H, D1332N, R1335Q, T1337N
I562F, V565D, I570T, K608R, L625S, E627K, T638P, V647I, R654I, G752R, R753G, N803S, N808D, K959N, M1021L, R1114G, D1135N, N1177S, N1234D, D1332N, R1335Q, T1337N
I562F, I570T, K608R, E627K, T638P, V647I, R753G, E790A, N803S, K959N, V1015A, Y1036H, R1114G, D1135N, D1180E, A1184T, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
I570T, K608R, E627K, T638P, V647I, R654H, R753G, E790A, N803S, K959N, V1015A, R1114G, D1127A, D1135N, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
I570T, K608R, L625S, E627K, T638P, V647I, R654I, T703P, R753G, N803S, N808D, K959N, M1021L, R1114G, D1135N, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
I570S, K608R, E627K, E630G, T638P, V647I, R653K, R753G, I795L, N803S, K866R, K890N, K959N, Y1016C, R1114G, D1135N, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N
I570T, K608R, E627K, T638P, V647I, R654H, R753G, E790A, N803S, K959N, V1016A, R1114G, D1135N, E1219V, K1246E, D1332N, R1335Q, T1337N
K608R, E627K, T638P, V647I, R654L, K673E, R753G, E790A, N803S, K948E, K959N, R1114G, D1127G, D1135N, D1180E, E1219V, N1286H, D1332N, R1335Q, T1337N
K608R, L625S, E627K, T638P, V647I, R654I, I670T, R753G, N803S, N808D, K959N, M1021L, R1114G, D1135N, E1219V, N1286H, D1332N, R1335Q, T1337N
E627K, M631V, T638P, V647I, K710E, R753G, N803S, N808D, K948E, M1021L, R1114G, D1135N, E1219V, D1332N, R1335Q, T1337N, S1338T, H1349R

10

20

30

40

【0274】

一部の態様において、Cas9タンパク質は、表2のバリエーションのいずれか1つによって提供されるCas9タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様において、Cas9タンパク質は、表2のバリエーションのいずれか1つによって提供されるCas9タンパク質のアミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0275】

一部の態様において、Cas9タンパク質は、配列番号9によって提供されるStreptococcus

50

ccus pyogenes Cas9と比較して、カノニカルなPAM(5'-NGG-3')をその3'末端に含まない標的配列に対して増大した活性を発揮する。一部の態様において、Cas9タンパク質は、カノニカルなPAM配列(5'-NGG-3')に直接的に隣接しない3'末端を有する標的配列に対して、同じ標的配列に対する配列番号9によって提供されるStreptococcus pyogenes Cas9の活性と比較して、少なくとも5倍増大した活性を発揮する。一部の態様において、Cas9タンパク質は、カノニカルなPAM配列(5'-NGG-3')に直接的に隣接しない標的配列に対して、同じ標的配列に対する配列番号9によって提供されるStreptococcus pyogenesの活性と比較して、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1,000倍、少なくとも5,000倍、少なくとも10,000倍、少なくとも50,000倍、少なくとも100,000倍、少なくとも500,000倍、または少なくとも1,000,000倍増大した活性を発揮する。一部の態様において、標的配列の3'末端はAAC、GAC、CAC、またはTAC配列に直接的に隣接する。

10

【0276】

一部の態様において、Cas9タンパク質は、5'-NAT-3'PAM配列をその3'末端に含む標的配列に対して活性を発揮する突然変異の組合せを含む。一部の態様において、突然変異の組合せは表3の列記されているクローンのいずれか1つに存在する。一部の態様において、突然変異の組合せは、表3の列記されているクローンの保存的突然変異である。一部の態様において、Cas9タンパク質は、表3に列記されるCas9クローンのいずれか1つの突然変異の組合せを含む。

20

【0277】

【表25】

表3: NAT PAMクローン

野生型SpCas9からの変異(例えば、配列番号9)
K961E, H985Y, D1135N, K1191N, E1219V, Q1221H, A1320A, P1321S, R1335L
D1135N, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, P1321S, D1322G, R1335L
V743I, R753G, E790A, D1135N, G1218S, E1219V, Q1221H, A1227V, P1249S, N1286K, A1293T, P1321S, D1322G, R1335L, T1339I
F575S, M631L, R654L, V748I, V743I, R753G, D853E, V922A, R1114G D1135N, G1218S, E1219V, Q1221H, A1227V, P1249S, N1286K, A1293T, P1321S, D1322G, R1335L, T1339I
F575S, M631L, R654L, R664K, R753G, D853E, V922A, R1114G D1135N, D1180G, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, N1286K, P1321S, D1322G, R1335L
M631L, R654L, R753G, K797E, D853E, V922A, D1012A, R1114G D1135N, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, N1317K, P1321S, D1322G, R1335L
F575S, M631L, R654L, R664K, R753G, D853E, V922A, R1114G, Y1131C, D1135N, D1180G, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, P1321S, D1322G, R1335L
F575S, M631L, R654L, R664K, R753G, D853E, V922A, R1114G, Y1131C, D1135N, D1180G, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, P1321S, D1322G, R1335L
F575S, D596Y, M631L, R654L, R664K, R753G, D853E, V922A, R1114G, Y1131C, D1135N, D1180G, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, Q1256R, P1321S, D1322G, R1335L
F575S, M631L, R654L, R664K, K710E, V750A, R753G, D853E, V922A, R1114G, Y1131C, D1135N, D1180G, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, P1321S, D1322G, R1335L
F575S, M631L, K649R, R654L, R664K, R753G, D853E, V922A, R1114G, Y1131C, D1135N, K1156E, D1180G, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, P1321S, D1322G, R1335L
F575S, M631L, R654L, R664K, R753G, D853E, V922A, R1114G, Y1131C, D1135N, D1180G, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, P1321S, D1322G, R1335L
F575S, M631L, R654L, R664K, R753G, D853E, V922A, I1057G, R1114G, Y1131C, D1135N, D1180G, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, N1308D, P1321S, D1322G, R1335L
M631L, R654L, R753G, D853E, V922A, R1114G, Y1131C, D1135N, E1150V, D1180G, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, P1321S, D1332G, R1335L
M631L, R654L, R664K, R753G, D853E, I1057V, Y1131C, D1135N, D1180G, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, P1321S, D1332G, R1335L
M631L, R654L, R664K, R753G, I1057V, R1114G, Y1131C, D1135N, D1180G, G1218S, E1219V, Q1221H, P1249S, P1321S, D1332G, R1335L

30

40

【0278】

プライムエディターに関して用いられ得る種々のnapDNAbpの上の記載は、決して限

50

定することを意味しない。プライムエディターは、公知であるかまたは指向性進化もしくはそれ以外の変異誘発プロセスによって作られ得るかもしくは進化させられ得るカノニカルなSpCas9またはいずれかのオルソログCas9タンパク質またはいずれかのバリエーションCas9タンパク質を含んでもよく、Cas9のいずれかの天然に存在するバリエーション、突然変異体、またはそうでなければ操作されたバージョンを包含する。様々な態様において、Cas9またはCas9バリエーションはニッカーゼ活性を有し、すなわち標的DNA配列の一方の鎖のみを切断する。他の態様において、Cas9またはCas9バリエーションは不活性なヌクレアーゼを有し、すなわち「不活性型」Cas9タンパク質である。使用されてもよい他のバリエーションCas9タンパク質は、カノニカルなSpCas9よりも小さい分子量を有する(例として、より容易な送達のために)かまたは改変もしくは再配置された一次アミノ酸構造(例として、環状置換体フォーマット)を有するものである。本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターはまた、収束進化の結果であるCas12a/Cpf1およびCas12bタンパク質を包含するCas9等価物を含んでもよい。本明細書において使用されるnapDNAbp(例として、SpCas9、Cas9バリエーション、またはCas9等価物)は、それらのPAM特異性を変更/増強する種々の改変を含有してもよい。最後に、本出願は、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%の配列同一性を参照Cas9配列、例えば参照SpCas9カノニカルな配列または参照Cas9等価物(例として、Cas12a/Cpf1)に対して有するいずれかのCas9、Cas9バリエーション、またはCas9等価物を企図する。

特定の態様において、拡大されたPAM能力を有するCas9バリエーションはSpCas9(H840A)VRQR(配列番号294)であり、これは次のアミノ酸配列を有する(SpCas9(H840A)に対して相対的なV、R、Q、R置換が太字の下線で示されている。加えて、SpCas9(H840)のメチオニン残基はSpCas9(H840A)VRQRでは除去された):

【表26】

```
DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTA
RRRYTRRKNNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIY
HLRKKLVDSTDKADLRLLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFQLVQTYNQLFEENPINAS
GVDKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNIFDLAEDAKLQLSKDTYD
DDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALV
RQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFD
NGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPIFLKDNREKIEKILTFRIPYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP
WNFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLS
GEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDN
EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV
DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKL
YLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVK
KMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKY
DENDKLIREVKVITLKSKLVSDFFRKDFQIFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVY
GDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR
DIATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVL
VVAKEVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLFELENGRKR
MLASARELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKR
VILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATL
IHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 294)
```

【0279】

別の特定の態様において、拡大されたPAM能力を有するCas9バリエーションはSpCas9(H840A)VRERであり、これは次のアミノ酸配列を有する(配列番号12のSpCas9(H840A)に対して相対的なV、R、E、R置換が太字の下線で示されている。加えて、SpCas9(H840)のメチオニン残基はSpCas9(H840A)VRERでは除去された):

【表 2 7】

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTA
 RRRYTRRKNRICYLQEFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIY
 HLRKKLVSDTKADLRLLIYLALAHMIKIRGHFLIEGDLNPDNSDVDFQLVQTYNQLFEEENPINAS
 GVDKAKILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYD
 DDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALV
 RQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLNREDLLRKQRTFD
 NGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP
 WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLS
 GEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDN
 EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
 KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTIKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAICKGILQTVKVV
 DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKL
 YLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVK
 KMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELDDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKY
 DENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYYHHAHDAYLNAVVGTAIKKYPKLESEFVY
 GDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR
 DFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVL
 VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKR
 MLASARELQKGNELALPSKYVNFYLYASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEHIEQISEFSKR
 VILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKEYRSTKEVL DATL
 IHQSITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 295)

10

20

【0280】

一部の態様において、非カノニカルなPAM配列について機能するnapDNABpはアルゴ
 ノートタンパク質である。このような核酸プログラム型DNA結合タンパク質の1つの例は
 、*Natronobacterium gregoryi*からのアルゴノートタンパク質(NgAgo)である。Ng
 AgoはssDNAによってガイドされるエンドヌクレアーゼである。NgAgoは約24ヌクレ
 オチドの5'リン酸化されたssDNA(gDNA)に結合してそれをその標的部位へとガイドし
 、gDNA部位においてDNA二本鎖切断を作製するであろう。Cas9とは対照的に、NgAgo-
 gDNAシステムはプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を必要としない。ヌクレアー
 ゼ不活性なNgAgo(dNgAgo)を使用することは、標的化され得る塩基を多大に拡大し得
 る。NgAgoの特徴付けおよび使用はGao et al., *Nat Biotechnol.*, 2016 Jul; 34(7):
 768-73. PubMed PMID: 27136078; Swarts et al., *Nature*. 507(7491)(2014): 2
 58-61; および Swarts et al., *Nucleic Acids Res.* 43(10)(2015): 5120-9に記載さ
 れており、それらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0281】

一部の態様において、napDNABpはアルゴノートタンパク質の原核生物ホモログであ
 る。アルゴノートタンパク質の原核生物ホモログは知られており、例えばMakarova K.
 , et al., “Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to fu
 nction as key components of a novel system of defense against mobile g
 enetic elements”, *Biol Direct*. 2009 Aug 25; 4:29. doi:10.1186/1745-6150-
 4-29に記載されており、その内容全体は参照によって本明細書に組み込まれる。一部の
 態様において、napDNABpは*Marinitoga piezophila*アルゴノート(MpAgo)タンパ
 ク質である。CRISPR関連*Marinitoga piezophila*アルゴノート(MpAgo)タンパク質
 は、5'-リン酸化されたガイドを使用して一本鎖標的配列を切断する。5'ガイドはすべての
 公知のアルゴノートによって使用される。MpAgo-RNA複合体の結晶構造は、5'リン
 酸相互作用をブロックする残基を含むガイド鎖結合部位を示す。このデータは、5'ヒド
 ロキシル化されたガイドに対する非カノニカルな特異性を有するアルゴノートサブクラス
 の進化を示唆する。例として、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kay
 a et al., “A bacterial Argonaute with noncanonical guide RNA specificity
 ”, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Apr 12; 113(15): 4057-62を参照されたい。
 他のアルゴノートタンパク質が使用されてもよく、本開示の範囲内であるということが認

40

50

識されるべきである。

【0282】

本開示の一部の側面は、異なるPAM特異性を有するCas9ドメインを提供する。典型的には、*S. pyogenes*からのCas9(spCas9)などのCas9タンパク質は、特定の核酸領域に結合するためにカノニカルなNGG PAM配列を必要とする。これはゲノム内の所望の塩基を編集する能力を限定する場合がある。一部の態様において、本明細書において提供される塩基編集融合タンパク質は、精密な位置付けに置かれることを必要としてもよく、例えば、ここでは、標的塩基が4塩基領域(例として、「編集窓」)内に置かれ、これがPAMのおよそ15塩基上流にある。その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Komor, A.C., et al., “Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage” *Nature* 533,420-424(2016)を参照されたい。したがって、一部の態様において、本明細書において提供される融合タンパク質のいずれかは、カノニカルな(例として、NGG)PAM配列を含有しないヌクレオチド配列に結合することが可能なCas9ドメインを含有してもよい。非カノニカルなPAM配列に結合するCas9ドメインは当技術分野において記載されており、当業者にとって明らかであろう。例えば、非カノニカルなPAM配列に結合するCas9ドメインは、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kleinstiver, B.P., et al., “Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities” *Nature* 523,481-485(2015);およびKleinstiver, B.P., et al., “Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition” *Nature Biotechnology* 33,1293-1298(2015)に記載されている。

【0283】

例えば、次のアミノ酸配列を有する野生型*Francisella novicida* Cpf1(D917、E1006、およびD1255)(配列番号296)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%の配列同一性を有するドメインなどの変更されたPAM特異性を有するnapDNAbpドメイン:

【表28】

```
MSIYQEFVNKYSLSKTLRFELIPQGKTLLENIKARGLILDDEKRAKDYKKAKQIIDKYHQFFIEILSSV
CISEDLLQNYSDVYFKLKKSDDDNLQKDFKSAKDTIKKQISEYIKDSEKFKNLFNQNLIDAKKGQES
DLILWLKQSKDNGIELFKANSIDTDIDEALEIHKSFKGWTTYFKGFHENRKNVYSSNDIPTSIYRIVDD
NLPKFLENKAKYESLKDKAPEAINYEQIKKDLAEELTFDIDYKTSEVNQRVFSLDEVFEIANFNYYLN
QSGITKFNTHIGGKFFVNGENTKRKGINEYINLYSQINDKTLKKYKMSVLFKQILSDTESKSFVIDKLE
DDSDVVTMTQSFYEQIAAFKTVEEKSIKETLSLLFDDLKAQKLDLSKIYFKNDKSLDLSQQVFDDY
SVIGTAVLEYITQQIAPKNLDNPSKKEQELIAKTEKAKYLSLETIKLALLEEFNKHRDIDKQCRFEIL
ANFAAIPMIFDEIAQNKDNLAQISIKYQNQGKDLLQASAEDDVKAIKDLLDQTNNLLHKLKIFHISQ
SEDKANILDKDEHFYLVFEECYFELANIVPLYNKIRNYITQKPYSDEKFKLNFENSTLANGWDKNKE
PDNTAILFIKDDKYVLGVMMKKNNKIFDDKAIKENKGEYKKIVYKLLPGANKMLPKVFFSAKSIKF
YNPSEDILRIRNHSTHTKNGSPQKGYEKIEFNIEDCRKFIDFYKQSIKHPWWDKDFGRFSDTQRYNSI
DEFYREVENQGYKLTFENISESYIDSVVNQGLYLFQIYNKDFSAYSKGRPNLHTLYWKALFDERNL
QDVVYKLNGEAELFYRKQSIKKITHPAKEAIANKNDNPKKESVFEYDLIKDKRFTEDKFFFHCPIT
INFKSSGANKFNDEINLLLKEKANDVHILSIDRGERHLAYYTLVDGKGNIKQDTFNIGNDRMKTNY
HDKLAAIEKDRDSARKDWKKINNIKEMKEGYLSQVVHEIAKLVEYNAIVVFEDLNFGFKRGRFKVE
KQVYQKLEKMLIEKLNLYLVFKDNEFDKTGGVLRAYQLTAPFETFKKMGKQTGIYYVPAGFTSKICP
VTGFFVNQLYPKYESVSKSQEFFSKFDKICYNLDKGYFEFSFDYKNFGDKAAKKGWTFASFGSRLINF
RNSDKNHNWDTREYVPTKELEKLLKDYSIEYGHGECIKAAICGESDKKFFAKLTSVLNTILQMRNSK
TGTELDYLI SPVADVNGNFFDSRQAPKNMPQDADANGAYHIGLKGMLMGLGRIKNNQEGKKNLVIK
NEEYFEFVQNRNN (配列番号 296)
```

【0284】

以下のアミノ酸配列を有する、野生型*Geobacillus thermodenitrificans* Cas9(配列番号31)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%の配列同一性を有するドメインなどのPAM特異性の変更された追加のnapDNAbpドメイン:

【表 2 9】

```

MKYKIGLDIGITSIGWAVINLDIPRIEDLGVRIFDRAENPKTGESLALPRRLARSARRRLRRRKHLRLRI
RRLFVREGILTKEELNKLFEKKHEIDVWQLRVEALDRKLNDELARILLHLAKRRGFRSNRKSERTN
KENSTMLKHIEENQSILSSYRTVAEMVVKDPKFSLHKNKEDNYTNTVARDDLEREIKLIFAKQREY
GNIVCTEAFEHEYISIWASQRPFASKDDIEKKVGFCTFEPKEKRAPKATYTFQSFTVWEHINKLRLVS
PGGIRALTDDERRLIYKQAFHKNKITFHDVRTLLNLPDDTRFKGLLYDRNTTLKENEKVRFLELGAY
HKIRKAIDS VYGKGA AKSFRPIDFDTFGYALTMFKDDTDIRS YLRNEYEQNGKRMENLADKVYDEE
LIEELLNLSFSKFGHLSLKALRNILPYMEQGEVYSTACERAGYTFTGPKKKQKT VLLPNIPPIANPVV
MRALTQARKVVNAIHKKYGSPVSIHIELARELSQSFDERRKMQKEQEGNRKKNETAIRQLVEYGLTL
NPTGLDIVKFKLWSEQNGKCAYSLQPIEIERLLEPGYTEVDHVIPYSRSLDDSYTNKVLVLTKENREK
GNRTPAEYLGSGSERWQQFETFLVTNKQFSKKKRDRLLRLHYDENEENEFKNRNLNDTRYISRFLA
NIREHLKFADSDDKQKVYTVNGRITAHLSRWNIKNRREESNLHHAVIDAAIVACTTPSDIARVTAI
YQRREQNKELSKKTDPQFPQPWPHFADELQARLSKNPKESIKALNLGNYDNEKLESLQPVFVSRMP
KRSITGAAHQETLRRYIGIDERSGKIQT VVKKKLSEIQLDKTGHFPMYGKESDPRTYEAIQRLLHN
NDPKKAFQEPLYKPKKNGELGPIRTIKIIDTTNQVIPLNDGKTVAYNSNIVRVDVFEKDGKYYCVPIY
TIDMMKGILPNKAIEPNKPYSEWKEMTEDYTFRFSLYPNDLIRIEFPREKTIKTAVGEEIKIKDLFAYY
QTIDSSNGGLSLVSHDNNISLRSIGSRTLKRFEKYQVDVLGNIYKVRGEKRVGVASSSSHKAGETIRP
L (配列番号 31)

```

10

【0285】

一部の態様において、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)は、カノニカルな(NGG)PAM配列を必要としない核酸プログラム型DNA結合タンパク質である。一部の態様において、napDNAbpはアルゴノートタンパク質である。このような核酸プログラム型DNA結合タンパク質の1つの例は、*Natronobacterium gregoryi*からのアルゴノートタンパク質(NgAgo)である。NgAgoはssDNAによってガイドされるエンドヌクレアーゼである。NgAgoは約24ヌクレオチドの5'リン酸化されたssDNA(gDNA)に結合してそれをその標的部位へとガイドし、gDNA部位においてDNA二本鎖切断を作製するであろう。Cas9とは対照的に、NgAgo-gDNAシステムはプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を必要としない。ヌクレアーゼ不活性なNgAgo(dNgAgo)を使用することは、標的化され得る塩基を多大に拡大し得る。NgAgoの特徴付けおよび使用は、それらの各々が参照により本明細書に組み込まれる、Gao et al., *Nat Biotechnol.*, 34(7):768-73(2016), PubMed PMID:27136078; Swarts et al., *Nature*, 507(7491):258-61(2014); および Swarts et al., *Nucleic Acids Res.* 43(10)(2015):5120-9に記載されている。*Natronobacterium gregoryi* Argonauteの配列は配列番号297によって提供される。

20

30

【0286】

開示される融合タンパク質は、以下のアミノ酸配列を有する野生型*Natronobacterium gregoryi* Argonaute(配列番号297)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%の配列同一性を有するnapDNAbpドメインを含んでもよい:

40

50

【表 3 0】

```

MTVIDLDSTTTADELTSGHYDISVTLTGVDNTDEQHPRMSLAFEQDNGERRYITLWKN'TTPKDVF
TYDYATGSTYIFTNIDYEVKGDGYENLTATYQTTVENATAQEVGTTDEDETFAGGEPLDHLDDALN
ETPDDAETESDSGHVMTSFASRDQLPEWTLHTYTLTATDGAKTDTTEYARRTLAYTVRQELYTDHDA
APVATDGLMLLTPEPLGETPLDLDCGVRVEADETRTLDYTTAKDRLLARELVEEGLKRSLWDDYLV
RGIDEVLSKEPVLTCDEFDLHERYDLSVEVGHSGRAYLHINFRHRFVPKLTLADIDDDNIYPGLRVKT
TYRPRRGHIVWGLRDECATDSLNTLGNQSVVAYHRNNQTPINTDLLDAIEAADRRVETRRQGHGD
DAVSFPQELLAVEPNTHQIKQFASDGFHQQARSKTRLASARCSEKAQAFERLDPVRLNGSTVEFSS
EFTTGNNEQQLRLLYENGESVLTFRDGGARGAHPDETFSGKIVNPPESFEVAVVLPEQQADTCKAQW
DTMADLLNQAGAPPTRSETVQYDAFSSPESISLNVAGAIDPSEVDAAFFVVLPPDQEGFADLASPTET
DELKKALANMGIYSQMAFYDRIRDAKIFYTRNVALGLLAAAGGVAFTTEHAMPGDADMFIGIDVS
RSYPEDGASGQINIAATAVAYKDG'TILGHSSTRPQLGEKLQSTDVRDIMKNAILGYQQVTGESPTIH
VIHRDGMNEDLDPATEFLNEQGVYDIVEIRKQPQTRLLAVSDVQYDTPVKISAAINQNEPRATVA
TFGAPEYLATRDGGGLPRPIQIERVAGETDIETLTRQVYLLSQSHIQVHNSTARLPITTAYADQASTHA
TKGYLVQTGAFESNVGFL (配列番号 297)

```

10

【0287】

加えて、いずれかの利用可能な方法が、バリエーションまたは突然変異体 Cas9 タンパク質を得るかまたは構築するために利用されてもよい。「突然変異」という用語は、本明細書において使用される場合、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、またはある配列内の 1 以上の残基の欠失もしくは挿入を指す。突然変異は、典型的には、元の残基、次に配列内の残基の位置および新たに置換された残基の同一性を同定することによって本明細書に記載される。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が当技術分野において周知であり、例えば Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012)) によって提供される。突然変異は、種々のカテゴリー、例えば 1 塩基多型、微小重複領域、インデル、および逆位を包含し得、決して限定することを意味しない。突然変異は、タンパク質活性を縮減または廃止する突然変異の正常の結果である「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。なぜなら、ヘテロ接合体では、第 2 の染色体コピーが完全に機能的なタンパク質をコードする遺伝子の未変異のバージョンを持ち、この存在が突然変異の効果を補償するからである。突然変異は、「機能獲得」突然変異も包含し、これは、正常な条件下ではそうでなければ存在しない異常な活性をタンパク質または細胞に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制御配列にあり、よって、いくつかの帰結を有し得る。例えば、突然変異は、1 以上の遺伝子が間違った組織において発現されることに至り得、これらの組織は、それらが正常では欠く機能を獲得する。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。

20

30

【0288】

突然変異は部位特異的突然変異誘発を用いて参照 Cas9 タンパク質に導入され得る。当技術分野で公知の部位特異的突然変異誘発のより古い方法は、一本鎖 DNA 鋳型の単離を許す M13 バクテリオファージベクターなどのベクターへの変異させられるべき配列のサブクローニングに依拠する。これらの方法では、変異誘発プライマー(すなわち、変異させられるべき部位にアニールすることができるが、変異させられるべき部位に 1 以上の mismatches のヌクレオチドを持つプライマー)を一本鎖鋳型にアニーリングさせ、次いで、変異誘発プライマーの 3' 末端からスタートして鋳型の相補体を重合する。次いで、もたらされた二重鎖は宿主細菌に形質トランスファーされ、プラークが所望の突然変異についてスクリーニングされる。より最近では、部位特異的突然変異誘発は PCR 方法論を使用しており、これらは一本鎖鋳型を必要としないという利点を有する。加えて、サブクローニングを必要としない方法が開発されている。PCR に基づく部位特異的突然変異誘発が行われる場合には、いくつかの問題が考慮されなければならない。第 1 に、これらの方法では、ポリメラーゼによって導入される望まれない突然変異の拡大を防止するため

40

50

に、PCRサイクル数を縮減することが望ましい。第2に、反応中に残存する変異していない親の分子の数を縮減するために、選択が使用されなければならない。第3に、単一のPCRプライマーセットの使用を許すために、伸長された長さのPCR法が好ましい。第4に、いくつかの熱安定性ポリメラーゼの非鋳型依存性末端伸長活性ゆえに、多くの場合には、PCRによって生成された突然変異体産物の平滑末端ライゲーションに先行して、端を磨く工程を手続きに組み込むことが必要である。

【0289】

突然変異は、指向性進化プロセス、例えばファージ支援連続進化(PACE)またはファージ支援非連続的進化(PANCE)によってもまた導入されてもよい。「ファージ支援連続進化(PACE)」という用語は、本明細書において使用される場合、ファージをウイルスベクターとして採用する連続的進化を指す。PACE技術の一般概念は、例えば、2010年3月11日に国際公開第2010/028347号として公開された、2009年9月8日に出願された国際PCT出願PCT/US2009/056194号;2012年6月28日に国際公開第2012/088381号として公開された、2011年12月22日に出願された国際出願PCT/US2011/066747号;2015年5月5日に発行された米国特許出願第9,023,594号、2015年9月11日に国際公開第2015/134121号として公開された2015年1月20日に出願された国際PCT出願、PCT/US2015/012022号、および2016年10月20日に国際公開第2016/168631号として公開された2016年4月15日に出願された国際PCT出願、PCT/US2016/027795号に記載されており、それらの各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。バリエーションCas9はファージ支援非連続的進化(PANCE)によってもまた得られてもよい。本明細書において使用される場合、ファージをウイルスベクターとして使用する非連続的進化を指す。PANCEは急速なin vivoの指向性進化のための単純化された技術であり、新しいE.coliホスト細胞による進化させられるべき目当ての遺伝子を含む進化する「セクションファージ」(SP)の連続プラスコ植え継ぎを用い、それによって、ホストE.coli内の遺伝子が一定に保たれることを許しながら、SPに含有される遺伝子は連続的に進化する。連続プラスコ植え継ぎは微生物の実験室進化のための広くアクセス可能なアプローチとして長く用をなしており、より最近では、バクテリオファージ進化のための類縁のアプローチが開発されている。PANCEシステムはPACEシステムよりも低いストリンジェンシーを特色とする。

【0290】

Cas9またはCas9等価物に関する上に記されている参照のいずれかは、すでにそのように申し立てられていない場合には、それらの全体が参照によってここに組み込まれる。

【0291】

逆転写酵素ドメインおよびその改変バリエーション

様々な態様において、本明細書において開示される改善されたプライムエディターはポリメラーゼ(例として、DNA依存性DNAポリメラーゼまたはRNA依存性DNAポリメラーゼ、例えば逆転写酵素)またはそのバリエーションを包含し、これは、napDNAbpもしくは他のプログラム型ヌクレアーゼとの融合タンパク質として提供またはトランスで提供される。様々な態様において、本明細書において開示される改善されたプライムエディターには、以下にさらに記載されるような最適化された進化した逆転写酵素が包含される。

【0292】

一部の態様において、改善されたプライムエディタータンパク質は、1つ以上のアミノ酸置換を含むMMLV逆転写酵素を含む。野生型MMLV逆転写酵素は、以下の配列によって提供される:

10

20

30

40

50

【表 3 1】

説明	配列
逆転写酵素 (M-MLV RT) 野生型 モロニーマウス白血病ウ イルス	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIPLKATSTPVSQKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDLREVNRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSTLFDALHRDLADFRIQHP DLILLQYVDDLALLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLGTAFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGK LTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDT DRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKA LPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTDSDRYAFATAHIIH GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQ KGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番 号 33)

10

【0293】

20

本明細書に記載の改善されたプライムエディターで使用される逆転写酵素は、野生型アミノ酸配列と比較して1つ以上の突然変異を含み得る。一部の態様において、逆転写酵素は上記のMMLV五変異体(すなわち、アミノ酸置換D200N、T306K、W313F、T330PおよびL603Wを含む)である。

【0294】

一部の態様において、本開示は、MMLV逆転写酵素バリエーション、およびMMLV逆転写酵素バリエーションを含むプライムエディター(例として、napDNAbpおよび逆転写酵素がトランスで提供される融合タンパク質およびプライムエディター)を提供し、バリエーションは、T13I、V19I、A32T、G38V、S60Y、P111L、K120R、H126Y、T128N、T128F、T128H、V129S、P132S、G138R、C157F、P175Q、P175S、D200S、D200Y、D200N、D200C、Y222F、V223A、V223M、V223T、V223W、V223Y、L234I、T246I、N249S、T287A、P292T、E302A、E302K、T306K、G316R、E346K、K373N、W388C、V402A、K445N、M457I、およびA462Sからなる群から選択される配列番号33に対する1つ以上の突然変異を含む。一部の態様において、MMLV逆転写酵素バリエーションは、これらの突然変異の2つ以上、これらの突然変異の3つ以上、これらの突然変異の4つ以上、またはこれらの突然変異の5つ以上を含む。

30

【0295】

一部の態様において、本明細書において提供されるプライムエディターで使用されるMMLV逆転写酵素バリエーションは、配列番号33と比較して単一の突然変異を含む。一部の態様において、単一の突然変異は、T13I、G38V、K120R、H126Y、T128N、T128F、T128H、V129S、P132S、P175Q、P175S、D200C、D200Y、V223M、V223T、V223W、V223Y、L234I、P292T、G316R、K373N、M457I、およびV402Aからなる群から選択される。

40

【0296】

ある特定の態様において、本明細書において提供されるプライムエディターで使用されるMMLV逆転写酵素バリエーションは、配列番号33のアミノ酸配列に対する突然変異の以下の群:D200YおよびE302A;D200Y、V223A、およびM457I;V223M、T306K、およびA462S;D200NおよびE302K;D200YおよびE302K;T128NおよびV223A;V19I、A32T、およびD200Y;D200S、V223A、E346K、およびW388C;S60Y、V223A、およびN249S;P111L、V223A、T287A、およびG316R;S60Y、G138R、およびV2

50

23A;S60Y、Y222F、V223A、およびK445N;またはS60Y、C157F、V223A、およびT246Iのいずれか1つを含む。ある特定の態様において、本明細書において提供されるプライムエディターにおいて使用されるMMLV逆転写酵素バリエーションは、配列番号35~42、172~177、183、および184のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号35~42、172~177、183、および184のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基13I、19I、32T、38V、60Y、111L、120R、126Y、128N、128F、128H、129S、132S、138R、157F、175Q、175S、200S、200Y、200N、200C、222F、223A、223M、223T、223W、223Y、234I、246I、249S、287A、292T、302A、302K、306K、316R、346K、373N、388C、402A、445N、457I、および462Sのうちの少なくとも1つを含む。

10

【0297】

他の例では、本明細書に記載のタンパク質は、アミノ酸位置V19、A32、S60、P111、T128、G138R、C157F、D200、Y222、V223、T246、N249、T287、G316、E346、W388、および/またはK445に1つ以上の置換を含むMMLV逆転写酵素を含み得る。一部の態様において、本明細書に記載のタンパク質は、V19I、A32T、S60Y、P111L、T128N、G138R、C157F、D200S、D200Y、Y222F、V223A、T246I、N249S、T287A、G316R、E346K、W388CおよびK445Nからなる群から選択される1つ以上の置換を含むMMLV逆転写酵素を含む。ある特定の態様において、本明細書中に記載のタンパク質は、以下のいずれか1つを含むMMLV逆転写酵素を含む

20

【0298】

アミノ酸置換の以下の群:

【0299】

T128NおよびV223A;
V19I、A32T、およびD200Y;
D200S、V223A、E346K、およびW388C;
S60Y、V223A、およびN249S;
P111L、V223A、T287A、およびG316R;
S60Y、G138R、およびV223A;
S60Y、Y222F、V223A、およびK445N;または
S60Y、C157F、V223A、およびT246I。

30

【0300】

例示的な進化した逆転写酵素は以下の通りである:

40

50

【表 3 2 - 1】

説明	配列
逆転写酵素 (M-MLV RT) T128NおよびV223A	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIPLKATSTPVSQKYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTNP PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSTLFDLALHRLDLADFRIQHP DLILLQYADDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQ QKAYQEIQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGK LTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDT DRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKA LPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTDSTRYAFATAHIH GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQ KGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番 号 35)
逆転写酵素 (M-MLV RT) V19I、A32T、および D200Y	TLNIEDEYRLHETSKEPDISLGSTWLSDFPQTWAETGGMGLAV RQAPLIPLKATSTPVSQKYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILV PCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVP NPNYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSTLFDLALHRLDLADFRIQHP DLILLQYVDDLLEAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQ QKAYQEIQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGK LTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDT DRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKA LPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTDSTRYAFATAHIH GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQ KGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番 号 36)

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 2】

逆転写酵素 (M-MLV RT) D200S、V223A、E346K 、およびW388C	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREV NKRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF <u>SE</u> ALHRDLADFRIQHP DLILLQY <u>A</u> DDL ~~LL~~ LAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLG TAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQ QKAYQ <u>K</u> IKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGP <u>C</u> RRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLT KDAGK LTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDT DRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETETEWAKA LPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTD SRYAFATAHH GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQ KGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番 号 37)
逆転写酵素 (M-MLV RT) S60Y、V223A、および N249S	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIPLKATSTPV <u>Y</u> IKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREV NKRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHP DLILLQY <u>A</u> DDL ~~LL~~ LAATSELDCQQGTRALLQTLG <u>S</u> LG YRASAK KAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLG TAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQ QKAYQ <u>E</u> IKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLT KDAGK LTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDT DRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETETEWAKA LPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTD SRYAFATAHH GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQ KGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番 号 38)

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 3】

逆転写酵素 (M-MLV RT) P111L、V223A、T287A、 およびG316R	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIIPKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRLVQDLREVNRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDFAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHP DLILLQYADDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKEAVMGQPTPKTPR QLREFLGTAGFCRLWIPRFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGK LTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLD DRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETETEVWAKA LPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTDSRYAFATAHIH GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQ KGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番 号 39)
逆転写酵素 (M-MLV RT) S60Y、G138R、および V223A	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIIPKATSTPVYIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNRVEDIHPTV PNPYNLLSRLPPSHQWYTVLDLKDFAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHP DLILLQYADDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGK LTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLD DRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETETEVWAKA LPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTDSRYAFATAHIH GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQ KGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番 号 40)

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 4】

逆転写酵素 (M-MLV RT) S60Y、Y222F、V223A、 およびK445N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIPLKATSTPVYIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREV NKRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDP EMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFR IQHP DLILLQFADDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLG TAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKGT LFNWGP DQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLT KDAGK LTMGQPLVILAPHAVEALV NQPPDRWLSNARMTHYQALLD T DRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETET EWIWAKA LPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLN VYTDSRYAFATAHIH GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQ KGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番 号 41)
逆転写酵素 (M-MLV RT) S60Y、C157F、V223A、 およびT246I	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIPLKATSTPVYIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREV NKRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFFLRLHPTSQPLFAFEW RDP EMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFR IQHP DLILLQYADDLLLAATSELDCQQGTRALLQILGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLG TAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKGT LFNWGP DQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLT KDAGK LTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLD T DRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETET EWIWAKA LPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLN VYTDSRYAFATAHIH GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQ KGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配列番 号 42)
逆転写酵素 (M-MLV RT) D200S、V223A、E346K 、およびW388C	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIPLKATSTPVS IKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREV NKRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDP EMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFSEALHRDLADFR IQHP DLILLQYADDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGP DQ QKAYQKIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWCRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLT KD GKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALL LDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 172)

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 5】

逆転写酵素 (M-MLV RT) S60Y、V223A、および N249S	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIPLKATSTPVYIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHP DLILLQYADDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGSLGYRASAK KAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDPQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDA GKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALL LDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 173)
逆転写酵素 (M-MLV RT) P111L、V223A、T287A、 およびG316R	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRLVQDLREVNKRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHP DLILLQYADDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKEAVMGQPTPKTPR QLREFLGKAGFCRLFIPRFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDPQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDA GKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALL LDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 174)
逆転写酵素 (M-MLV RT) S60Y、G138R、および V223A	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIPLKATSTPVYIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTV PNPYNLLSRLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHP DLILLQYADDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDPQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDA GKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALL LDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 175)

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 6】

逆転写酵素 (M-MLV RT) S60Y、Y222F、V223A、 およびK445N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIIPKATSTPVYIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHP DLILLQFADDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDA GKLTMGQPLVILAPHAVEALVNQPPDRWLSNARMTHYQALL LDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 176)
逆転写酵素 (M-MLV RT) S60Y C157F、V223A およびT246I	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIIPKATSTPVYIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFFLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHP DLILLQYADDLLLAATSELDCQQGTRALLQILGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDA GKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALL LDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 177)
逆転写酵素 (M-MLV RT) V223M、 T306K、A462S	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIIPKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHP DLILLQYMDDLALLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDA GKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQSLL LDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 183)

10

20

30

40

50

【表 3 2 - 7】

逆転写酵素 (M-MLV RT) D200NおよびE302K	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLA VRQAPLIPLKATSTPVSQKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGIL VPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREV NKRVEDIHPTV PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPENGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHP DLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAK KAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLRKFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDA GKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALL LDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLE (配列番号 184)

10

【0301】

本明細書において開示される改善されたプライムエディターにおいて、本明細書に記載の進化したバリエーション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%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む逆転写酵素の使用も本開示によって企図され、ただし、RT配列が本明細書において開示されるアミノ酸置換の1つを含むことを条件とする。

20

【0302】

本開示はまた、本明細書に記載の改善されたプライムエディターにおけるいずれかの野生型逆転写酵素の使用を企図する。使用され得る例示的な野生型逆転写酵素には、以下に限定されないが、以下の配列、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そのいずれかのバリエーションが含まれる。

30

40

50

【表 3 3 - 1】

説明	配列	配列 番号
マウス乳癌ウイルス (MMTV) 逆転写酵素	VFTLWGRDIMKDIKVRMLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQIS WKSDQPVWLNQWPLKQEKQLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSP WNTPVFVIKKKSGKWRLQLDLRAVNATMHDMGALQPGLPSP VAVPKGWEIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVSPNFKRPYQ RFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHY MDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEQIKYDNL KYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRNLNDFQKLLGNINWIRPF LKLTTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLST ARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISP KVITPYDIFCTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLL QEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPDLLTFTLQTAIIFPHMTSTTP LEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPIIKENTQNTAQQAIEIVAVI TAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHL QRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRILT	43
トリ肉腫白血病ウイル ス(ASLV) 逆転写 酵素	TVALHLAIPKWKPDHTPVWIDQWPLPEGKLVALTQLVEKEL QLGHIPEPSLSCWNTPVFVIRKASGSYRLLHDLRAVNAKLVPFG AVQQGAPVLSALPRGWPLMVLDLKDCFFSIPLAEQDREAFAP TLPSVNNQAPARRFQWKVLPQGMTCSP TICQLVVGQVLEPLR LKHPSLRMLHYMDDLLLAASSHDGLEAAGEEVISTLERAGFTI SPDKIQREPGVQYLYGKLGSTYVAPVGLVAEPRIATLWDVQK LVGSLQWLRPALGIPRLMGPFYEQLRGSDPNEAREWNLDK MAWREIVQLSTTAALERWDPALPLEGAVARCEQGAIGVLGQ GLSTHPRPCLWLFSTQPTKAFTAWLEVLTLLITKLRAVARTF GKEVDILLPACFREDLPLPEGILLALKGFAGKIRSSDTPSIFDIA RPLHVSLSKVRVTDHPVPGPTVFTDASSSTHKGVVVWREGPRW EIKEIADSGASVQQLERAVAMALLLWPTTPTNVVTDSAFVA KMLLKMGQEGVPSTAAAFILEDALSQRSAMAAVLHVRSHSE VPGFFTEGNDVADSQATFQAY	44
ブタ内在性レトロウ イルス(PERV) 逆転 写酵素	TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLA KQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQGG ILVPVQSPWNTPLLPRKPGTNDYRPVQDLREVNRVQDIHPT VPNPYNLLSALPPERNNWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFE WRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQ HPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRAS AKKAQICRREVTYLGYSLRGGQRWLTEARKKTVVQIPAPTTA KQVREFLGTAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEH QKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLT QTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDA DKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLL TERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKD LTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WAS SLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHV HGA IYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLEALHLPKRLAIHCPG HQA KADLISRG NQMADRVAKQAAQAVNLLPI	45

10

20

30

40

50

【表 3 3 - 2】

HIV-MMLV 逆転写酵素	PISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKE GKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDF WEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTA FTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFKKQ NPDIVIIYQYMDLLYVGSDLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTP DKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQ KLVGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLLRGTKALTEVIPLTEEAEL ELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQGWYTYQIYQE PFKNLKTGKYARMRGAHTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKT PKFKLPIKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNTPLVCLVV ALNPATLLPLPEGLQHNCILDILAEAHGTRPDLTDQPLPADH TWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQR AELIALTQALKMAEGKKLVYTDSTRYAFATAHIIHGEIYRRRG WLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEA RGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIEN	46
AVIRE 逆転写酵素	APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVAEINPPGLASTQ APIHVQLLSTALPVRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAGILRP VHSPWNTPLLPVRKSGTSEYRMVQDLREVNRKRVETIHPTVPN PYTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDFAFFCIPLAPESQLIFAFEWADA EEGESGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALNRDLQGFRLDHPSVS LLQYVDDLLIAADTQAACLSATRDLLMTLAEALGYRVSGKKA QLCQEEVTYLGFKIHKGSRLSNSRTQAILQIPVPKTKRQVREF LGTIGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEAF QSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTAALGP WKRVPVAYLSKRLDPVAAGWPRCLRAIAAAALLTREASKLTFG QDIEITSSHNLESLLRSPDKWLTNARITQYQVLLLDPPRVRFK QTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTDQPLAQ AEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDVWAEPLPIGTSAQ KAELIALTKALEWSKDKSVNIYTDSTRYAFATLHVHGMIRER GLLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPKRVAVMHCKGHQKDD APTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQYS NVEEALG	216
ヒヒ内在性ウイルス (BAEVM) 逆転写酵素	VSLQDEHRLFDIPVTTSLPDVWLQDFPQAWAETGGLGRAKQC APIIIDLKPTAVPVSIKQYPMSLEAHMGIRQHIIKFLELGVLRPC RSPWNTPLLVPKKPGTQDYRPVQDLREINKRTVDIHPTVPNPY NLLSTLKPDISWYTVLDLKDFAFFCLPLAPQSQELFAFEWKDP ERGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLTDFRTQHPEVT LLQYVDDLLAAPTCKACTQGTRHLLQELGEKGYRASAKKA QICQTKVTYLGYLSEGKRWLTPGRIETVARIPPPRNPREVREF LGTAGFCRLWIPGFAELAAPLYALTKESTPFTWQTEHQLAFE LKKALLSAPALGLPDTSKPFTLFLDERQGIAGVLTQKLGPWK RPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRIMAATAMLVKDSAKLTLGQ PLTVITPHTLEAIVRQPPDRWITNARLTHYQALLLDTRVQFG PPVTLNATLLPVPENQPSPHDCRQVLAETHGTREDLKDQELP DADHTWYTDGSSYLDGTRRAGAAVVDGHNTIWAQSLPPGT SAQKAELIALTKALELSKGKKANIYTDSTRYAFATAHTHGSIYE RRGLLTSEGKEIKNKAELIALLKALFLPQEVAIHCPGHQKGQD PVAVGNRQADRVARQAAMAELVTLATEPDNTSHITIEHTYTS EDQEEA	48

10

20

30

40

50

【表 3 3 - 3】

テナガザル白血病ウイルス(GALV) 逆転写酵素	LNLEEEYRLHEKPVPSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQV PPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEAREGIRPHIQKFLDLGVLV PCRSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPN PYNLLSSLPPSYTWYSVLDLKDAFFCLRLHPNSQPLFAFEWKD PEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQ VLLQYVDDLVAAPTYEDCKKGTQKLLQELSKLGYRVS KAQLCQREVTYLGYLLKEGKRWLTPARKATVMKIPVPTTPRQ VREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQQA FDHIKKALLSAPALALPDLTKPFTLYIDERAGVARGVLTQTLG PWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLKADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERV SFAPPAVLNPATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLEDQP LPGVPTWYTDGSSFITEGKRRAGAPIVDGKRTVWASSLPEGTS AQKAELVALTQALRLAEGKNINIYTD SRYAFATAHIHGAIIYKQ RGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPRRVAIHCPGHQGRSNP VATGNRRADEAAKQAAALSTRVLAGTTKPQEPIEPAQEK	49
コアラレトロウイルス(KORV) 逆転写酵素	MNLEEEYRLHEKPVPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQ VPPVVVELKSDASPVAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGIL VPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVKNRVQDIHPTV PNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW RDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFRALN PQVVMLQYVDDLVAAPTYRDCKEGTRRLQELSKLGYRVS AKKAQLCREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTP RQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAH QEAFGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQ TLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLKAD KLTGLQNVTVIAPHNLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERV SFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHCSEILAEETGTRPDLRD QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLP GTSQAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGA IYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIHCPGHQGR TDPVATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETTKNQEHFEPTRGK	222
マゾンファイザーサルウイルス(MPMV) 逆転写酵素	MWGRDLLSQMKIMMCSPNDIVTAQMLAQGYSPGKGLGKKE NGILHIPNQGSNKKGFNFLTAAIDILAPQQCAEPITWKSDE PVWVDQWPLTNDKLAAAQQLVQEQL EAGHITESSPWNTPIF VIKKKSGKWRLQLDLRAVNATMVLMGALQPGLPSPVAIPQG YLKIIIDLKDCFFSIPLHPSDQKRFAFSLPSTNFKQPMQRFQWK VLPQGMANSPTLCQKYVATAIHKVRHAWKQMYIIHYMDDILI AGKDGQQVLQCFDQLKQELTAAGLHIAPEKVQLQDPYTYLGF ELNGPKITNQKAVIRKDKLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLKLTT GDLKPLFDTLKGSDPNSHRSLSKEALASLEKVETAIAEQFVT HINYSPLIFLIFNTALTPTGLFWQDNPIMWIHLASPCKVLLPY YDAIADLIILGRDHSSKKYFGIEPSTIIQPYSKSQIDWLMQNT EMWPIACASEVGILDNHYPPNKLIQFCKLHTEFVPQIISKTPLNNAL LVFTDGSSTGMAAYTLTDTTIKFQTNLNSAQLVELQALIAVLS AFPNQPLNIYTD SAYLAHSIPLLETVAQIKHISSETAKLFLQCQQ LIYNRSIPFYIGHVRAHSGPLPGPIAQGNQRADLATKIVA	51

10

20

30

40

50

【表 3 3 - 4】

POK11ERV 逆転写酵素	ATVEPPKPIPLTWKTEKPVWVNQWPLPKQKLEALHLLANEQL EKGHIEPSFSPWNSPVFVIQKKS GKWRMLTDLRAVNAV IQPM GPLQPGLPSPAMIPKDWPLIIIDLKDCFFTIPLAEQDCEKFAFTIP AINNKEPATRFQWKVLPQGMLNSPTICQTFVGRALQPVREKFS DCYIIHYIDDILCAAETKDKLIDCYTFLQAEVANAGLAIASDKI QTSTPFHYLGMQIENRRIKPKQKIEIRKDTLKTLDNFQKLLGDIN WIRPTLGIPTYAMSNLFSILRGDSDLNSKRILTPEATKEIKLVEE KIQSAQINRIDPLAPLQLLIFATAHSPTGIIIQNTDLVEWSFLPHS TVKTFTLYLDQIATLIGQTRLRIIKLCGNDPDKIVVPLTKEQVR QAFINSGAWQJGLANFVGIIIDNHYPKTKIFQFLKMTTWILPKIT RREPLENALT VFTDGS SNGKAA YTGPKERVIKTPYQSAQRAEL VAVITVLQDFDQPINIISDSAYVVQATRDVETALIKYSMDDQL NQLFNLLQQTVRKRNFPPYITHIRAHTNLPGLPTKANEEADLL VS	52
サルレトロウイルス 2型(SRV2) 逆転写酵素	MWGRDLLSQMKIMMCS PNDIVTAQMLAQGYSPGKGLGKRE DGILQPIPN SGQLDRKGFGNFLATAVDILAPQRYADPITWKSD EPVWVDQWPLTQEKLAAAQQLVQEQLQAGHIIESNSPWNTPI FVIKKKSGKWRLQLDLRAVNATMVL MGALQPGLPSPVAIPQG YFKIVIDLKDCFFTIPLQPV DQKRFAFSLPSTNFKQPMKRYQW KVLPQGMANSPTLCQKYVAAAIEPVRKSWAQMYIIHYMDDIL IAGKLGEQVLQCFAQLKQALTTTGLQIAPEKVQLQDPYTYLGF QINGPKITNQKAVIRRD KLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLHLTT GDLKPLFDILKGDSNPNSPRSLSEAALASLQKVETAIAEQFVTQ IDYTQPLTFLIFNTT LTPTGLFWQNNPVMWVHLPASPCKVLLP YYDAIADLIILGRDNSK KYFGLEPSTIIQPYSKSQIHWLMQNT E TWPIACASYAGNIDNHYPNKL IQFCKLHAVVFPRIISKTPLDN ALLVFTDGSSTGIAAYTFEKT TVRFKTSHTSAQLVELQALIAVL SAFPHRALNVYTDSAYLAHSIPLLETVSHIKHISDTAKFFLQCQ QLIYNRSIPFYLGHIRAHSGLPGLSQGNHITDLATKVVA	53
ウーリーサル肉腫ウ イルス(WMSV) 逆転 写酵素	LNLEEEYRLHEKVPVSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQV PPVVVELRSGASPVAVRQYPM SKEAREGIRPHIQRFDLGVLV PCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPN PYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKD AFFCLKLHPNSQPLFAFEWRD PEKGNTGQLTWTRL PQGFKNSPTL FDEALHRDLAPFRALNPQ VVLLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVSAK KAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPARKATVMKIPPTTPRQ VREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQA FDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLG PWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLNERV SFAPPAVLNPATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQP LPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGT SAQKAELVALTQALRLAEGKDINIYTDSRYAFATAHIHGAIYK QRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIHCPGHQKGND PVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI	228

10

20

30

40

50

【表 3 3 - 5】

TF1 逆転写酵素	ISSSKHTLSQMKNVSNIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTEKLPK PIKGLEFEVELTQENYRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKS GIRESKAINACPVMFVPKKEGTLRMVVDYKPLNKYVKPNIYP LPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP RGVFEYLVMPYGISTAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMDDI LIHSKSESEHVKHVKDVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVKFI GYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRKELRQFLGSVNYLR KFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP PVLRFHDFSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGY SAKMSKAQLNYSVSDKEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILT DHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDFNFEINYPGSA ADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI	55
CRISPR 逆転写酵素	NSQAQSACCAGANQIVEGATLEKVVAPACLQQAWTRVRKNK GGPGGDGVTIEIFAQNAEVELEKLRAETLAGIYRPRKVRHAIV PKPKGGERKLTIPSVDRLQTATMLSLGQTVDDHFFSSASWAY REGRGVDDALADLRLRLNSGLFWTFDADIMQYFDRILHKRLI DDLFIWVDDLRLVRLIQLWLSFSYWGRGIAQGAPISPLLANLF LHPMDRLLELEGLASVRYADDFVVLCSKALAQAQLIVASH LAARGLKLNMSKTRILAPSEAFIFLGQTVPEPVWDTQP	56
VP96 逆転写酵素	NLVKRLAHLGKSEPEVIHFLADAPNKYRVYKIPKRSYGHRVI AQPTRELKLYQKAFLELYSFPVHSSATAYCKGKSIKDNLASHV KNHYLLKTDLENFFNSITPNIFWKSINDSIATPKFSTSEIALVE RLIFWRPSKLQGGKLVLSVGAPSSPTISNFCLYQFDEYLSIICKE QNISYTRYADDLTFSTCDKDVLTHTVIPLIQSLDYFFASELKL HKTIVFSSKAHNRHVTGITLNNEGKLSLGRERKRYIKHLVHSF KYGKLDNTEIRHLQGMLSFAXHIEPIFIDRLKEKYTDELIKIIYE AGHE	57
VC95 逆転写酵素	NILTTLREQLLTNNVIMPQEFERLEVRGSHAYKVYSIPKRKAG RRTIAHPSSKLKICQRHLNAILNPLLKVHDSSAYVKGRSIKDN ALVHSHSAYVLKMDFQNFNSITPTILRQCLIQNDILLSVNELE KLEQLIFWNPSKKRNGKLILSVGSPISPLISNAIMYPFDKIINDIC TKHGINYTRYADDITFSTNIKNTLNKLPEIVEQLIQTAYAGRIIN KRKTVFSSKKHNRHVTGITLTNDSKISIGRSRKR YISSLVFKYIN KNLDIDEINHMKGMLAFAYNIEPIYIHRLSHKYKVNIVEKILRG SN	241
EC48 逆転写酵素	GRPYVTNLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTLEKLSKALSISVEE LKAIAELSLDEKYTLKEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQSRINK RIFKELVVFPSFLFGSVPSKNDVLNSNVKRDYVSCAKAHCGA KTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDICTK DDFVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVD DITVSSKISNYDFSQMOSHIERMLSEHDLPIKHKTKIFHCSSEP IKVHGLRVDDYDSPRLPSDEVKRIASIHNLKLLAAKNNTKTSV AYRKEFNRCMGRVNLGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKR DVAVIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMILTR SESFKEKLECFKSRLASLKPL	59

10

20

30

40

50

【表 3 3 - 6】

GS 逆転写酵素	ALLERILARDNLITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQLRDYIRAH WSTIHAQLLAGTYRPAPVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLI QQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHDAVRQAQGYIQEGY RYVVDMDLEKFFDRVNHDLMSRVARKVKDKRVLKLIRAYL QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKR GLKFCRYADDCNIYVKSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVN EKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRSIQRLKQIRQLT NPNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIR RRLRLCQWLQWKRVTRIRELRALGLKETAVMEIANTRKGA WRTTKTPQLHQALGKTYWTAQGLKSLTQRYFELRQG	60
ER 逆転写酵素	DTSNLMEQILSSDNLNRAYLQVVRNKGAEQVDGMKYTELKE HLAKNGETIKGQLRTRKYKQPARRVEIPKPDGGVRNLGVPT VTDRFIQQAIAQVLTPIYEEQFHDHSYGFRPNRCAQQAILTALN IMNDGNDWIVDIDLEKFFDTVNHDKLMTLIGRTIKDGDVISIV RKYLVSIGIMIDDEYEDSIVGTPQGGNLSPLLANIMLNELDKEM EKRLNLFVRYADDCIIMVGSEMSANRVMRNISRFIGEKLGLKV NMTKSKVDRPSGLKYLGFYFDPRAHQFKAKPHAKSVAKF KKRMKELTCRSWGVSNYSYKVEKLNQLIRGWINYFKIGSMKTL CKELDSRIRYRLRMCIWKQWKTQPNQEKNLVKLGIDRNTARR VAYTGKRIAYVCNKGAVNVAISNKRLASFGLISMLDYYIEKC VTC	185
NE144 逆転写酵素	AGQPTSREALYERIRSTSKEEVILEEMIRLGFWPAQGAVPHDP AEEIRRRGELERQLSELREKSRKLYNEKALIAEQRKQRLAESR RKQKETKARRERERQERAQKWAQRKAGEILFLGEDVSGGMS HKTCDALIKREGVPAIASAEELARAMGIALKELRFLAYNRKV SRVTHYRRFLLPKKTGGLRLISAPMPRLKRAQAWALEHIFNKL SFEPAAHGFVAGRSIVSNARPHVGADVVDNLDLKDFPTVSFP RVKGALRHLGYSESVATALALVCTEPEVDEVGLDGTWYVA RGERFLPQGSPCSPAITNLLCRRLDRRLHGLAQALGFVYTRYA DDLTFSGRGEAAESKRVGKLLRGAADIVAHEGFVHPDKTRV MRRGRREQVTGVVVDKTSVPRDELKFRATLYQIEKDGP DKRWGNGGDVLA AVHGYACFVAMVDPSRGQPLLARARALL AKHGGPSKPPGGSGPRAPTVPQPTANAPEAPKPVAPATPAAPA KKGWKL	239

10

20

30

【0303】

本明細書において開示される改善されたプライムエディタータンパク質における上記の酵素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%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む逆転写酵素の使用も、本開示によって企図される。

【0304】

一部の態様において、本開示は、逆転写酵素、および逆転写酵素を含むプライムエディター(例として、各構成成分がトランスで提供される融合タンパク質またはプライムエディター)を提供し、逆転写酵素は、配列番号216のAVIRE逆転写酵素、または配列番号216と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するAVIRE逆転写酵素バリエーションであり、AVIRE逆転写酵素バリエーションは、D199N、T305K、W312F、G329P、およびL604Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の態様において、AVIRE逆転写酵素バリエーションは、これらの突然変異の2つ以上、これらの突然変異の3つ以上、これらの突然変異の4つ以上、またはこれらの突然変異の5つ以上を含む。一部の態様において、AVIRE逆転写酵素バリエーションは突然変異D199Nを含む。一部の態様において、AVIRE

40

50

逆転写酵素バリエーションは突然変異T305Kを含む。一部の態様において、AVIRE逆転写酵素バリエーションは突然変異W312Fを含む。一部の態様において、AVIRE逆転写酵素バリエーションは突然変異G329Pを含む。一部の態様において、AVIRE逆転写酵素バリエーションは突然変異L604Wを含む。

【0305】

ある特定の態様において、AVIRE逆転写酵素バリエーションは、配列番号217～221のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号217～221のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は残基199N、305K、312F、329P、および604Wの少なくとも1つを含む。

10

AVIRE-RT(D199N):

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAGILRPVHSPWNTPLLPVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHPTVPNPYTLTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDFAFFCIPLAPESQLIFAFEWA
DAEEGESGQLTWTRLPPQGFKNSPTLTFNEALNRDLQGFRLDHPVSLLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGTYCRLWIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEA
FQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRDL
PVAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPPDKWLTNARIT
QYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTQPL
AQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSEIWAELPIGTSQAQKAEIALTKALE
WSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIRERGLLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPK
RVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQY
SNVEEALG (配列番号217)

20

AVIRE-RT(T305K):

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAGILRPVHSPWNTPLLPVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHPTVPNPYTLTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDFAFFCIPLAPESQLIFAFEWA
DAEEGESGQLTWTRLPPQGFKNSPTLTFDEALNRDLQGFRLDHPVSLLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGKIGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEA
FQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRDL
PVAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPPDKWLTNARIT
QYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTQPL
AQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSEIWAELPIGTSQAQKAEIALTKALE
WSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIRERGLLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPK
RVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQY
SNVEEALG (配列番号218)

30

AVIRE-RT(W312F):

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAGILRPVHSPWNTPLLPVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHPTVPNPYTLTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDFAFFCIPLAPESQLIFAFEWA
DAEEGESGQLTWTRLPPQGFKNSPTLTFDEALNRDLQGFRLDHPVSLLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGTYCRLFIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEAF
QSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRDL
PVAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPPDKWLTNARIT
QYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTQPL
AQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSEIWAELPIGTSQAQKAEIALTKALEWS

40

50

KDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIRERGLLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPKRV
AVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQYSN
VEEALG(配列番号219)

AVIRE-RT(G329P):

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHPTVPNPYTLTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFWA
DAEEGESGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFDEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGITGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRPGNDPLVWGEKEEEA
FQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRDL
PVAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPDKWLTNARIT
QYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLSTSTRPDLTQPL
AQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSEIWAEPPIGTSAQKAELIALTKALE
WSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIRERGLLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPK
RVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQY
SNVEEALG(配列番号220)

10

AVIRE-RT(L604W):

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHPTVPNPYTLTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFWA
DAEEGESGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFDEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGITGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEA
FQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRDL
PVAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPDKWLTNARIT
QYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLSTSTRPDLTQPL
AQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSEIWAEPPIGTSAQKAELIALTKALE
WSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIRERGLWTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLP
KRVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQ
YSNVEEALG(配列番号221)

20

30

【0306】

ある特定の態様において、AVIRE逆転写酵素バリエーションは、配列番号243のアミノ酸配列、または配列番号243と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は残基199N、305K、312F、329P、および604Wを含む:

AVIRE_penta:

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHPTVPNPYTLTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFWA
DAEEGESGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFNEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGKIGYCRLFIPGFAELAQPLYAATRPGNDPLVWGEKEEEAF
QSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRDL
VAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPDKWLTNARITQ
YQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLSTSTRPDLTQPLA
QAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSEIWAEPPIGTSAQKAELIALTKALEWS
KDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIRERGLWTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPKRV
AVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQYSN

40

50

VEEALG(配列番号243)

【0307】

一部の態様において、本開示は、逆転写酵素、および逆転写酵素を含むプライムエディター(例として、各成分がトランスで提供される融合タンパク質またはプライムエディター)を提供し、逆転写酵素は、配列番号222のKORV逆転写酵素、または配列番号222と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するKORV逆転写酵素バリエーションであり、KORV逆転写酵素バリエーションは、D197N、T303K、W310F、E327P、およびL599Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の態様において、KORV逆転写酵素バリエーションは、これらの突然変異の2つ以上、これらの突然変異の3つ以上、これらの突然変異の4つ以上、またはこれらの突然変異の5つ以上を含む。一部の態様において、KORV逆転写酵素バリエーションは突然変異D197Nを含む。一部の態様において、KORV逆転写酵素バリエーションは突然変異T303Kを含む。一部の態様において、KORV逆転写酵素バリエーションは突然変異W310Fを含む。一部の態様において、KORV逆転写酵素バリエーションは突然変異E327Pを含む。一部の態様において、KORV逆転写酵素バリエーションは突然変異L599Wを含む。

10

【0308】

ある特定の態様において、KORV逆転写酵素バリエーションは、配列番号223~227のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号223~227のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、ここでアミノ酸配列は、残基197N、303K、310F、327P、および599Wの少なくとも1つを含む:

20

KORV-RT D197N:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKR VQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKD AFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEK GNTGQLTWTRLPQGFKNSPTL FNEALHRDLASFALNPQVVM LQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRL LQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLG YLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAH
QEA FGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLD PVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNV LVIAPHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPD LRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLP EGTS AQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLP
KRVAIHCPGHQRGTD PVATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETTKNQEHFEPTRGK(配
列番号223)

30

KORV-RT T303K:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKR VQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKD AFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEK GNTGQLTWTRLPQGFKNSPTL FDEALHRDLASFALNPQVVM LQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRL LQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLG YLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLGKAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAH
QEA FGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLD PVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNV LVIAPHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPD LRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLP EGTS AQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLP

40

50

KRVAIHCPGHQRGTDPVATGNRKAD EAAKQAAQSTRILTETTKNQE HFEPTRGK(配
列番号224)

KORV-RT W310F:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPM SKEAREGIRPHIQRFDLGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFALNPQVVMLQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLG YLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLG TAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAH
QEA FGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLD PVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNVLVIA PHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPD LRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMD GRRQAGAAIVDNKRTVWASNLP EGTS AQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLP
KRVAIHCPGHQRGTDPVATGNRKAD EAAKQAAQSTRILTETTKNQE HFEPTRGK(配
列番号225)

10

KORV-RT E327P:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPM SKEAREGIRPHIQRFDLGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFALNPQVVMLQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLG YLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAH
QEA FGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLD PVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNVLVIA PHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPD LRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMD GRRQAGAAIVDNKRTVWASNLP EGTS AQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLP
KRVAIHCPGHQRGTDPVATGNRKAD EAAKQAAQSTRILTETTKNQE HFEPTRGK(配
列番号226)

20

30

KORV-RT L599W:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPM SKEAREGIRPHIQRFDLGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFALNPQVVMLQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLG YLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAH
QEA FGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLD PVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNVLVIA PHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPD LRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMD GRRQAGAAIVDNKRTVWASNLP EGTS AQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHL
PKRVAIHCPGHQRGTDPVATGNRKAD EAAKQAAQSTRILTETTKNQE HFEPTRGK(
配列番号227)

40

【0309】

ある特定の態様において、KORV逆転写酵素バリエントは、配列番号244のアミノ酸
配列、または配列番号244と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少
なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%
、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列
は残基197N、303K、310F、327P、および599Wを含む:

50

KORV_penta:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRQVDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGN TGQLTWTRLPQGFKNSPTL FNEALHRDLASFALNPQVVM LQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRLQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLG YLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLGKAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAH
QEAFGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNV LVIAPHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPD LRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGR RQAGAAIVDNKRTVWASNLPEG TSAQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHL
PKRVAIIHCPGHQRGTD PVATGNRKAD EAAKQAAQSTRILTETT K NQEHFEPTRGK(
配列番号244)

10

【0310】

一部の態様において、本開示は、逆転写酵素、および逆転写酵素を含むプライムエディター(例として、各成分がトランスで提供される融合タンパク質またはプライムエディター)を提供し、逆転写酵素は、配列番号228のWMSV逆転写酵素、または配列番号228と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するWMSV逆転写酵素バリエーションであり、WMSV逆転写酵素バリエーションは、D197N、T303K、W311F、E327P、およびL599Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の態様において、WMSV逆転写酵素バリエーションは、これらの突然変異の2つ以上、これらの突然変異の3つ以上、これらの突然変異の4つ以上、またはこれらの突然変異の5つ以上を含む。一部の態様において、WMSV逆転写酵素バリエーションは突然変異D197Nを含む。一部の態様において、WMSV逆転写酵素バリエーションは突然変異T303Kを含む。一部の態様において、WMSV逆転写酵素バリエーションは突然変異W311Fを含む。一部の態様において、WMSV逆転写酵素バリエーションは突然変異E327Pを含む。一部の態様において、WMSV逆転写酵素バリエーションは突然変異L599Wを含む。

20

30

【0311】

ある特定の態様において、WMSV逆転写酵素バリエーションは、配列番号229~233のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号229~233のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、ここでアミノ酸配列は、残基197N、303K、311F、327P、および599Wの少なくとも1つを含む:

WMSV-RT D197N:

LNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGVLPVPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGN TGQLTWTRLPQGFKNSPTL FNEALHRDLAPFRALNPQVVL LQYVDDL
AAPT YRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKI PPPPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLT LGQNV TVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRD LKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEG TSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHL PKR
VAIIHCPGHQKGND PVATGNRRAD EAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号229)

40

50

WMSV-RT T303K:

LNLEEEYRLHEKPVPSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGLVLPVCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLV
AAPT YRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPPTTPRQVREFLGKAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKA VAAVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLN PATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEG TSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQ RGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKR
VAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号230)

10

WMSV-RT W311F:

LNLEEEYRLHEKPVPSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGLVLPVCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLV
AAPT YRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPPTTPRQVREFLG TAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKA VAAVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLN PATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEG TSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQ RGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKR
VAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号231)

20

WMSV-RT E327P:

LNLEEEYRLHEKPVPSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGLVLPVCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLV
AAPT YRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKA VAAVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLN PATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEG TSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQ RGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKR
VAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号232)

30

WMSV-RT L599W:

LNLEEEYRLHEKPVPSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGLVLPVCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLV
AAPT YRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKA VAAVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLN PATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEG TSAQKAELVALTQAL

40

50

RLAEGKDINIYTDSDRYAFATAHIHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPK
RVAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号233
)

【0312】

ある特定の態様において、WMSV逆転写酵素バリエーションは、配列番号245のアミノ酸配列、または配列番号245と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は残基197N、303K、311F、327P、および599Wを含む:

WMSV_penta:

LNLEEEYRLHEKPPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGLVLPVCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGNLTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLAPFRALNPQVLLQYVDDLLV
AAPT YRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPPTTPRQVREFLGKAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKAVAAVALLKADADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLN PATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVD GKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTDSDRYAFATAHIHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPK
RVAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号245
)

【0313】

一部の態様において、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含むドメインはPERV逆転写酵素を含む。例えば、本明細書に記載の改善されたプライムエディタータンパク質は、配列番号45のアミノ酸配列に対して1つ以上の突然変異を含むPERV逆転写酵素を含み得る。一部の態様において、PERV逆転写酵素は、配列番号45のアミノ酸配列に対してD199N、T305K、W312F、E329PおよびL602Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の態様において、PERV逆転写酵素は、配列番号45のアミノ酸配列に対して突然変異D199N、T305K、W312F、E329P、およびL602Wを含む。一部の態様において、本開示は、逆転写酵素、および逆転写酵素を含むプライムエディター(例えば、各構成成分がトランスで提供される融合タンパク質またはプライムエディター)を提供し、逆転写酵素は、配列番号45のPERV逆転写酵素、または配列番号45と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するPERV逆転写酵素バリエーションであり、PERV逆転写酵素バリエーションは、D199N、T305K、W312F、E329P、およびL602Wからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の態様において、PERV逆転写酵素バリエーションは、これらの突然変異の2つ以上、これらの突然変異の3つ以上、これらの突然変異の4つ以上、またはこれらの突然変異の5つ以上を含む。一部の態様において、PERV逆転写酵素バリエーションは突然変異D199Nを含む。一部の態様において、PERV逆転写酵素バリエーションは突然変異T305Kを含む。一部の態様において、PERV逆転写酵素バリエーションは突然変異W312Fを含む。一部の態様において、PERV逆転写酵素バリエーションは突然変異E329Pを含む。一部の態様において、PERV逆転写酵素バリエーションは突然変異L602Wを含む。

【0314】

ある特定の態様において、逆転写酵素バリエーションは、配列番号214および234~238のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号214および234~238のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90

10

20

30

40

50

%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は残基199N、305K、312F、329P、および602Wの少なくとも1つを含む。

PERVバリエーション21:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREV TYLGYSLRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLG TAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLL TSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQMADRVAKQAAQAVNLLPI (配列番号214)

10

PERV-RT D199N:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREV TYLGYSLRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLG TAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLL TSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQMADRVAKQAAQAVNLLPI (配列番号234)

20

PERV-RT T305K:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREV TYLGYSLRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLGKAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLL TSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQMADRVAKQAAQAVNLLPI (配列番号235)

30

PERV-RT W313F:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREV TYLGYSLRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLG TAGFCRLFIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK

40

50

KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTIWASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQ MADRVAKQAAQAVNLLPI (配列番号236)

PERV-RT E329P:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGT KALLLELSDLG YRASAKKAQICRREV TYLGYS LRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLG TAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVT KPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTIWASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQ MADRVAKQAAQAVNLLPI (配列番号237)

PERV-RT L602W:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGT KALLLELSDLG YRASAKKAQICRREV TYLGYS LRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLG TAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVT KPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTIWASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLT SAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQ MADRVAKQAAQAVNLLPI (配列番号238)

【0315】

ある特定の態様において、PERV逆転写酵素バリエーションは、配列番号215のアミノ酸配列、または配列番号215と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は残基199N、305K、312F、329P、および602Wを含む:

PERVバリエーション21.6(D199N、T305K、W312F、E329P、およびL602W置換を含む五変異体):

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGT KALLLELSDLG YRASAKKAQICRREV TYLGYS LRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLGKAGFCRLFIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVT KPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTIWASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLT SAGREIKNKEEILSLLEAL

HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQMADRVAKQAAQAVNLLPI(配列番号215)

【0316】

一部の態様において、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含むドメインはTf1逆転写酵素を含む。例えば、本明細書に記載の改善されたプライムエディタータンパク質は、配列番号55のアミノ酸配列に対して1つ以上の突然変異を含むTf1逆転写酵素を含み得る。一部の態様において、Tf1逆転写酵素は、配列番号55のアミノ酸配列に対してV14A、E22K、P70T、G72V、M102I、K106R、K118R、A139T、L158Q、F269L、S297Q、K356E、A363V、K413E、I423VおよびS492Nからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。ある特定の態様において、Tf1逆転写酵素は、配列番号55のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換群のいずれか1つを含む:

10

K118RおよびS297Q;

V14A、L158Q、F269L、およびK356E;

K106R、L158Q、F269L、A363V、およびI423V;

E22K、P70T、G72V、M102I、K106R、A139T、L158Q、F269L、A363V、K413E、およびS492N;または

P70T、G72V、M102I、K106R、L158Q、F269L、A363V、K413E、およびS492N。

【0317】

一部の態様において、本開示は、逆転写酵素、および逆転写酵素を含むプライムエディター(例えば、各成分がトランスで提供される融合タンパク質またはプライムエディター)を提供し、逆転写酵素は、配列番号171のTf1逆転写酵素、または配列番号171と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するTf1逆転写酵素バリエーションであり、Tf1逆転写酵素バリエーションは、配列番号171に対して、V14A、E22K、I64L、I64W、P70T、G72V、M102I、K106R、K118R、L133N、A139T、L158Q、S188K、I260L、F269L、E274R、R288Q、Q293K、S297Q、N316Q、K321R、K356E、A363V、K413E、I423V、およびS492Nからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の態様において、Tf1逆転写酵素バリエーションは、単一の突然変異を含み、単一の突然変異は、I64L突然変異、I64W突然変異、K118R突然変異、L133N突然変異、S188K突然変異、I260L突然変異、E274R突然変異、R288Q突然変異、Q293K突然変異、S297Q突然変異、N316Q突然変異、またはK321R突然変異を含む。

20

30

【0318】

一部の態様において、Tf1逆転写酵素バリエーションは、配列番号171のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群:

K118RおよびS297Q;V14A、L158Q、F269L、およびK356E;E22K、P70T、G72V、M102I、K106R、A139T、L158Q、F269L、A363V、K413E、およびS492N;P70T、G72V、M102I、K106R、L158Q、F269L、A363V、K413E、およびS492N;K106R、L158Q、F269L、A363V、およびI423V;K118R、S297Q、S188K、I64L、I260L、およびR288Q;E22K、P70T、G72V、M102I、K106R、A139T、L158Q、F269L、A363V、K413E、S492N、K118R、S297Q、S188K、I64L、およびI260L;K118RおよびS188K;

40

K118R、S188K、およびI260L;K118R、S188K、I260L、およびS297Q;またはK118R、S188K、I260L、R288K、およびS297Qのいずれか1つを含む。

【0319】

ある特定の態様において、Tf1逆転写酵素バリエーションは、配列番号196~213および251~255のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号196~213および251~255のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基1

50

4A、22K、64L、64W、70T、72V、102I、106R、118R、133N、139T、158Q、188K、260L、269L、274R、288Q、293K、297Q、316Q、321R、356E、363V、413E、423V、および492Nのうちの少なくとも1つを含む。

Tf1バリエーション5.131:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPKLPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLFEFEVELTQE
NYRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKSGIIREKAINACPVIFVPRKEGTLRMVV
DYRPLNKYVKNPIYPLPLIEQLLTKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCR
PRGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHV
KDVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNR
KELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVLRFHDFSKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSKMSKAQLNYSVS
DKEMLAIIKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号196)

10

Tf1バリエーション5.27:

ISSSKHTLSQMNKASNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLFEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGIIREKAINACPVMFVPRKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKNPIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVLRFHDFSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号197)

20

Tf1バリエーション5.47:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLFEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGIIREKAINACPVMFVPRKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKNPIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVLRFHDFSKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTVEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号198)

30

Tf1バリエーション5.59:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPKLPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLFEFEVELTQE
NYRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKSGIIREKAINACPVIFVPRKEGTLRMVV
DYKPLNKYVKNPIYPLPLIEQLLTKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCR
PRGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHV
KDVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNR
KELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVLRFHDFSKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSKMSKAQLNYSVS
DKEMLAIIKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号199)

40

Tf1バリエーション5.60:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLFEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKSGIIREKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKNPIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP

50

VLRHFDFSKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISISGGSKRTADGSEFE
PKKKRKV (配列番号200)

Tf1バリエーション5.612:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPKLPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQE
NYRLPLRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVV
DYRPLNKYVVKPNYPLPLIEQLLTKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCR
PRGVFEYLVMPYGIKTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDDILIHKSSESEHVKH
VKDVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVVKFLGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKN
RKELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVS
PPVLRHFDFSKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSV
SDKEMLAIIKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQ
DFNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI (配列番号201)

10

Tf1バリエーション5.618:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVMFVPKKEGTLRMVVD
YRPLNKYVVKPNYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPYGIKTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDDILIHKSSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号202)

20

Tf1バリエーションS188K:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVMFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVVKPNYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPYGIKTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDDILIHKSSESEHVKHV
KDVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNR
KELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVLRFDFSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVS
DKEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号203)

30

Tf1バリエーションI260L:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVMFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVVKPNYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPYGIKTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDDILIHKSSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVVKFLGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号204)

40

Tf1バリエーションR288Q:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVMFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVVKPNYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPYGIKTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDDILIHKSSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNQK

50

ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号 205)

Tf1 バリアント Q293K:

ISSSKHTLSQMNKVS NIVKEPELPDIYKEFKDITADTNT EKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKM QAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGT LRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPL PLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPY GISTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIH SKSESEHV KHV
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRKFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号 206)

10

Tf1 バリアント I64L:

ISSSKHTLSQMNKVS NIVKEPELPDIYKEFKDITADTNT EKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPLRNYPLPPGKM QAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGT LRMV
DYKPLNKYVKPNIYPL PLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFR
PRGVFEYLVMPY GISTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIH SKSESEHV KHV
KDVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNR
KELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVLRFHDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVS
DKEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEINYRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号 207)

20

Tf1 バリアント I64W:

ISSSKHTLSQMNKVS NIVKEPELPDIYKEFKDITADTNT EKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPWRNYPLPPGKM QAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGT LRMV
DYKPLNKYVKPNIYPL PLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFR
PRGVFEYLVMPY GISTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIH SKSESEHV KHV
KDVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNR
KELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVLRFHDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVS
DKEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEINYRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号 208)

30

Tf1 バリアント N316Q:

ISSSKHTLSQMNKVS NIVKEPELPDIYKEFKDITADTNT EKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKM QAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGT LRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPL PLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPY GISTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIH SKSESEHV KHV
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLQKLLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号 209)

40

Tf1 バリアント K321R:

ISSSKHTLSQMNKVS NIVKEPELPDIYKEFKDITADTNT EKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKM QAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGT LRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPL PLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPY GISTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIH SKSESEHV KHV
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK

50

ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKRDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号210)

Tf1バリアントL133N:

ISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNT EKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKM QAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPLPNIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPY GISTAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIH SKSESEHV KHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKRDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号211)

10

Tf1バリアントK118R:

ISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNT EKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKM QAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGTLRMVVD
YRPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPY GISTAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIH SKSESEHV KHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKRDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号212)

20

Tf1バリアントK118R:Tf1バリアントS297Q:

ISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNT EKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKM QAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPY GISTAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIH SKSESEHV KHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKRDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号213)

30

Tf1-rat4:

MISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNT EKLPKPIKGLEFEVELTQ
ENYRLPIRNYPLPPGKM QAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGTLRMV
VDYRPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFR
CPRGVFEYLVMPYGIKTAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIH SKSESEHV KHV
VKDVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFLGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKN
QKELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKRDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLV
SPPVLRHFDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYS
VSDKEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFL
QDFNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号251)

40

Tf1evo3.1:

ISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNT EKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLTPVKM QAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPY GISTAPAHFYCINTILGEAKESHVVCYMD DILIH SKSESEHV KHV
KDVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNR

50

KELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVLRFHDFSKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSKMSKAQLNYSVS
DKEMLAIIKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号252)

Tf1evo3.2:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKGGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVD
YRPLNKYVKPNVYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVLRFHDFSKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号253)

10

Tf1evo+rat-1:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKGGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVD
YRPLNKYVKPNVYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPYGIKTAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHV
KDVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVVKFLGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKN
QKELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVVRWKWTPTQTQAIENIKQCLV
SPPVLRHFDFSKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSKMSKAQLNYS
VSDKEMLAIIKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFL
QDFNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号254)

20

Tf1evo+rat2:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVD
YRPLNKYVKPNVYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPYGIKTAPAHFYCINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHV
KDVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVVKFLGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKN
QKELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVVRWKWTPTQTQAIENIKQCLV
SPPVLRHFDFSKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSKMSKAQLNYS
VSDKEMLAIIKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFL
QDFNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号255)

30

【0320】

一部の態様において、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含むドメインはEc48逆転写酵素を含む。例えば、本明細書に記載の改善されたプライムエディタータンパク質は、配列番号59のアミノ酸配列に対して1つ以上の突然変異を含むEc48逆転写酵素を含み得る。一部の態様において、Ec48逆転写酵素は、配列番号59のアミノ酸配列に対してA36V、E54K、K87E、R205K、V214L、D243N、R267I、S277F、E279K、N317S、K318E、H324Q、K326E、E328KおよびR372Kからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。ある特定の態様において、Ec48逆転写酵素は、配列番号59のアミノ酸配列に対して以下のアミノ酸置換群のいずれか1つを含む:

40

R267I、K318E、K326E、E328K、およびR372K;

K87E、R205K、V214L、D243N、R267I、N317S、K318E、H324Q、およびK326E;

E54K、K87E、D243N、R267I、E279K、およびK318E;

A36V、K87E、R205K、D243N、R267I、E279K、およびK318E;

E54K、K87E、D243N、R267I、E279K、およびK318E;または

E54K、K87E、D243N、R267I、S277F、E279K、およびK318E。

50

【0321】

一部の態様において、本開示は、逆転写酵素、および逆転写酵素を含むプライムエディター(例として、各成分がトランスで提供される融合タンパク質またはプライムエディター)を提供し、逆転写酵素は、配列番号59のEc48逆転写酵素、または配列番号59と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するEc48逆転写酵素バリエーションであり、Ec48逆転写酵素バリエーションは、配列番号59に対して、A36V、E54K、E60K、K87E、S151T、E165D、L182N、T189N、R205K、V214L、D243N、R267I、S277F、E279K、V303M、K307R、R315K、N317S、K318E、H324Q、K326E、E328K、K343N、R372K、R378K、およびT385Rからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の態様において、Ec48逆転写酵素バリエーションは単一の突然変異を含み、単一の突然変異は、L182N突然変異、T189N突然変異、K307R突然変異、R315K突然変異、R378K突然変異またはT385R突然変異である。

10

【0322】

一部の態様において、Ec48逆転写酵素バリエーションは、配列番号のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群:R267I、K318E、K326E、E328K、およびR372K;K87E、R205K、V214L、D243N、R267I、N317S、K318E、H324Q、およびK326E;E54K、K87E、D243N、R267I、E279K、およびK318E;A36V、K87E、R205K、D243N、R267I、E279K、およびK318E;E54K、K87E、D243N、R267I、E279K、およびK318E;E54K、K87E、D243N、R267I、S277F、E279K、およびK318E;E60K、K87E、E165D、D243N、R267I、E279K、K318E、およびK343N;E60K、K87E、S151T、E165D、D243N、R267I、E279K、V303M、K318E、およびK343N;またはR315K、L182N、およびT189Nのいずれか1つを含む。

20

【0323】

ある特定の態様において、Ec48逆転写酵素バリエーションは、配列番号188~195、256および257のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号188~195、256および257のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列が、残基36V、54K、60K、87E、151T、165D、182N、189N、205K、214L、243N、267I、277F、279K、303M、307R、315K、317S、318E、324Q、326E、328K、343N、372K、378K、および385Rのうちの少なくとも1つを含む。

30

Ec48バリエーション3.23:

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPSFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVLDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQKKGLVYTRLLDDITVSSKISNYDFSQMQS
HIERMLSEHNLPINKHKTKIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDEVKRIRASIHNKLK
LAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVSELGRVGQEEYESFKKQLQAIKPMPSKRDVAVI
DAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLKPL
(配列番号188)

40

Ec48バリエーション3.35(またはEc48-evo2):

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDKKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPSFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVLDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTKIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNKLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK

50

PL(配列番号189)

Ec48バリエーション3.36:

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKVLSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPFSLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQKKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK

PL(配列番号190)

Ec48バリエーション3.37:

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDKKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPFSLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK

PL(配列番号191)

Ec48バリエーション3.38:

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDKKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPFSLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPFDKVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK

PL(配列番号192)

Ec48バリエーション3.500:

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KKIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPFSLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALDYLVVDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSNRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK

PL(配列番号193)

Ec48バリエーション3.501:

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KKIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPFSLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRTVFEEILHIKDEALDYLVVDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTSMAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSNRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK

PL(配列番号194)

Ec48バリエーション3.8(またはEc48-evo1):

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINKRIFKELVVFPFSLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDICTKDD

10

20

30

40

50

FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHDLPINKHKTIFHCSEPIKVHGLVDYDSPRLPSDEVKRIRASIHNK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEEYKSFKKQLQAIKPMPSKRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKKKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号195)

Ec48-v2:

GRPYVTNLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINKRIFKELVVFPSPFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDDICTKDD
FVVQGANTSSYIANLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHDLPINKHKTIFHCSEPIKVHGLRVDYDSPRLPSDEVKRIRASIHNK
KLLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGKVNKLGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKRDV
AVIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASL
KPL(配列番号256)

10

Ec48-evo3:

GRPYVTNLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KKIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPSPFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALDYLVDDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTIFHCSEPIKVHGLVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSNRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号257)

20

【0324】

一部の態様において、本開示は、逆転写酵素、および逆転写酵素を含むプライムエディター(例として、各成分がトランスで提供される融合タンパク質またはプライムエディター)を提供し、逆転写酵素は、配列番号239のNe144逆転写酵素、または配列番号239と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するNe144逆転写酵素バリエーションであり、Ne144逆転写酵素バリエーションは、配列番号239に対してA157T、A165T、およびG288Vからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の態様において、Ne144逆転写酵素バリエーションは、突然変異A157T、A165TおよびG288Vを含む。

30

【0325】

ある特定の態様において、Ne144逆転写酵素バリエーションは、配列番号240のアミノ酸配列、または配列番号240と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、ここでアミノ酸配列は、残基157T、165T、および288Vのうちの少なくとも1つを含む:

Ne144 RT 38.14:

AGQPTSREALYERIRSTSKEEVILEEMIRLGFWPAQGAVPHDPAEEIRRRGELERQLS
ELREKSRKLYNEKALIAEQRKQRLAESRRKQKETKARRERERQERAQKWAQRKAGEI
LFLGEDVSGGMSHKTCDAELIKREGVPAIASAEELARAMGITLKELRFLTYNRKVS
RVTYRRFLLPKKTGGLRLISAPMPRLKRAQAWALEHIFNKLSEFPAAHGFAVAGRSIVS
NARPHVGADVVDNLKDFDFTVSFPRVKGALRHLGYSESVATALALVCTEPEVDEV
VLDGTTWYVARGERFLPQGSPCSPAITNLLCRRLDRRLHGLAQALGFVYTRYADDLT
FSGRGEAAESKRVGKLLRGAADIVAHEGFVVHPDKTRVMRRGRREQVTGVVVNDKT
SVPRDELKRKFRATLYQIEKDGPADKRWGNGGDVLAAVHGYACFVAMVDPSRGQPLL
ARARALLAKHGGPSKPPGGSGPRAPTVPQPTANAPEAPKPVAPATPAAPAKKGWKL
F(配列番号240)

40

50

【0326】

一部の態様において、本開示は、逆転写酵素、および逆転写酵素を含むプライムエディター（例えば、各成分がトランスで提供される融合タンパク質またはプライムエディター）を提供し、逆転写酵素は、配列番号241のVc95逆転写酵素、または配列番号241と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するVc95逆転写酵素バリエーションであり、Vc95逆転写酵素バリエーションは、配列番号241に対してL11M、S75A、V97M、N146D、およびN245Tからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の態様において、Vc95逆転写酵素バリエーションは突然変異L11M、S75A、V97M、N146DおよびN245Tを含む。

10

【0327】

ある特定の態様において、Vc95逆転写酵素バリエーションは、配列番号242のアミノ酸配列、または配列番号242と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、ここでアミノ酸配列は、残基11M、75A、97M、146D、および245Tのうちの少なくとも1つを含む：Vc95 RTバリエーション-25.8:

NILTTTLREQLMTNNVIMPQEFERLEVRGSHAYKVYSIPKRKAGRRTIAHPSSKCLKICQ
RHLNAILNPLLKVHDASYAYVKGRSIKDNLVHSHSAYMLKMDFQNFFNSITPTILR
QCLIQNDILLSVNELEKLEQLIFWNPSKKRDGKLILSVGSPISPLISNAIMYPFDKIIN
DICTKHGINYTRYADDITFSTNIKNTLNKLPEIVEQLIIQTYAGRIIINKRKTVFSSKKH
NRHVTGITLTITDSKISIGRSRKRYISSLVFKYINKNLIDEINHMKGMLAFAYNIEPIY
IHRLSHKYKVNIVEKILRGSN(配列番号242)

20

【0328】

一部の態様において、本開示は、逆転写酵素を含む逆転写酵素およびプライムエディター（例として、各成分がトランスで提供される融合タンパク質またはプライムエディター）を提供し、逆転写酵素は、配列番号60のGs逆転写酵素、または配列番号60と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するGs逆転写酵素バリエーションであり、Gs逆転写酵素バリエーションは、配列番号60に対して、N12D、A16E、A16V、L17P、V20G、L37R、L37P、R38H、Y40C、I41N、I41S、W45R、I67T、I67R、G72E、G73V、G78V、Q93R、A123V、Y126F、E129G、K162N、P190L、D206V、R233K、A234V、R263G、P264S、R267M、K279E、R287I、R291K、P309T、R344S、R358S、R360S、E363G、V374A、およびQ412Hからなる群から選択される1つ以上の突然変異を含む。一部の態様において、Gs逆転写酵素バリエーションは、これらの突然変異のうちの2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、または10個以上を含む。

30

【0329】

一部の態様において、Gs逆転写酵素バリエーションは、配列番号60のアミノ酸配列に対して以下の突然変異群:L17PおよびD206V;N12D、L37R、およびG78V;A16E、L37P、およびA123V;A16V、R38H、W45R、Y126F、およびQ412H;A16V、R38H、W45R、およびR291K;N12D、L37R、G72E、E129G、P264S、R344S、およびR360S;N12D、Y40C、I67T、G73V、Q93R、R287I、およびR358S;N12D、Y40C、I67T、G73V、Q93R、およびR358S;

40

N12D、I41N、P190L、A234V、およびK279E;N12D、L37R、R267M、P309T、R358S、およびE363G;A16V、V20G、I41S、R233K、およびP264S;L17P、V20G、I41S、I67R、R263G、P264S、およびV374A;またはL17P、V20G、I41S、I67R、K162N、R263G、およびP264Sのうちのいずれか1つを含む。

【0330】

50

ある特定の態様において、Gs逆転写酵素バリエーションは、配列番号159～171のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号159～171のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含み、ここでアミノ酸配列は、残基12D、16E、16V、17P、20G、37R、37P、38H、40C、41N、41S、45R、67T、67R、72E、73V、78V、93R、123V、126F、129G、162N、190L、206V、233K、234V、263G、264S、267M、279E、287I、291K、309T、344S、358S、360S、363G、374A、および412Hのうちの少なくとも1つを含む：

L17P+D206Vを含むGsバリエーション

EANQGAPGIDGVSTDQLRDYIRAHWSTIHAQLLAGTYRPAPVRRVEIPKPGGGTRQL
GIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHDAVRQAQGYIQEGYRYVV
DMDLEKFFDRVNHDLMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQAGVMIEGVKVQTEEGTPQ
GGPLSPLLANILLDVL DKELEKRGLKFCRYADDCNIYVKSLRAGQRVKQSIQRFLEKT
LKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRSIQRLKQIRQLTNPWNWSIS
MPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRLRLCQWLQWKVRTRIRE
LRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTYWTAQGLKSLTQRYFELRQ
G(配列番号159)

GsバリエーションN12D+L37R+G78V

ALLERILARDDLITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQRRDYIRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGGGTRQLVIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNA
HDAVRQAQGYIQEGYRYVV DMDLEKFFDRVNHDLMSRVARKVKDKRVLKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDL DKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPR
SIQRLKQIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRR
RLRLCQWLQWKVRTRIRELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKT
YWTAQGLKSLTQRYFELRQG(配列番号160)

Gs A16E+L37P+A123V

ALLERILARDNLITELKRVEANQGAPGIDGVSTDQPRDYIRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNA
HDAVRQVQGYIQEGYRYVV DMDLEKFFDRVNHDLMSRVARKVKDKRVLKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDL DKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPR
SIQRLKQIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRR
RLRLCQWLQWKVRTRIRELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKT
YWTAQGLKSLTQRYFELRQG(配列番号161)

GsバリエーションA16V+R38H+W45R+Y126F+Q412H

ALLERILARDNLITVLKRVEANQGAPGIDGVSTDQLHDYIRAHIRSTIHAQLLAGTYRP
APVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAH
DAVRQAQGGFIQEGYRYVV DMDLEKFFDRVNHDLMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQ
AGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDL DKELEKRGLKFCRYADDCNIYVK
SLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRS
IQRLKQIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRL
RLRLCQWLQWKVRTRIRELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTY
WTAQGLKSLTHRYFELRQG(配列番号162)

Gs A16V+R38H+W45R+R291K

ALLERILARDNLITVLKRVEANQGAPGIDGVSTDQLHDYIRAHIRSTIHAQLLAGTYRP
APVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAH
DAVRQAQGYIQEGYRYVV DMDLEKFFDRVNHDLMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQ
AGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDL DKELEKRGLKFCRYADDCNIYVK

10

20

30

40

50

SLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRS
IQKLKQIRIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRR
LRLCQWLQWKRVRTSIRELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTY
WTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号163)

Gsバリエーション814 N12D+L37R+G72E+E129G+P264S+R344S+R360S
ALLERILARDDLITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQRRDYIRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGEGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAH
DAVRQAQGYIQGGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQ
AGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYVK
SLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRSWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRS
IQLKQIRIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRSR
LRLCQWLQWKRVRTSIRELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTY
WTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号164)

10

Gsバリエーション815 N12D+Y40C+I67T+G73V+Q93R+R287I+R358S
ALLERILARDDLITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQLRDCIRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVETPKPGGVTRQLGIPTVVDRLIQQAILRELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNA
HDAVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPI
SIQRLKQIRIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRR
RLRLCQWLQWKRVSTIRELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKT
YWTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号165)

20

Gsバリエーション816 N12D+Y40C+I67T+G73V+Q93R+R358S
ALLERILARDDLITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQLRDCIRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVETPKPGGVTRQLGIPTVVDRLIQQAILRELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNA
HDAVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPR
SIQRLKQIRIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRR
RLRLCQWLQWKRVSTIRELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKT
YWTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号166)

30

Gsバリエーション817 N12D+I41N+P190L+A234V+K279E
ALLERILARDDLITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQLRDYNRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNA
HDAVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTLQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLRVGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPEREARIRLAPR
SIQRLKQIRIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRR
RLRLCQWLQWKRVRTSIRELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKT
YWTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号167)

40

Gsバリエーション818 N12D+L37R+R267M+P309T+R358S+E363G
ALLERILARDDLITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQRRDYIRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNA
HDAVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKMAFLGFSFTPERKARIRLAP
RSIQRLKQIRIRQLTNPWNWSISMTERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIR
RRLRLCQWLQWKRVSTRIRGLRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGK
TYWTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号168)

Gsバリエーション819 A16V+V20G+I41S+R233K+P264S

50

ALLERILARDNLITVLKRGEANQGAPGIDGVSTDQLRDYSRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNA
HDAVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLKAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRSWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPR
SIQRLKQRIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRR
RLRLCQWLQWKRVRTRIRELRLALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKT
YWTAQGLKSLTQRYFELRQG(配列番号169)

Gsバリエーション820 L17P+V20G+I41S+I67R+R263G+P264S+V374A

ALLERILARDNLITAPKRGEANQGAPGIDGVSTDQLRDYSRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVERPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNA
HDAVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDGWSWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPR
SIQRLKQRIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRR
RLRLCQWLQWKRVRTRIRELRLALGLKETAAEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKT
YWTAQGLKSLTQRYFELRQG(配列番号170)

Gsバリエーション821 L17P+V20G+I41S+I67R+K162N+R263G+P264S

ALLERILARDNLITAPKRGEANQGAPGIDGVSTDQLRDYSRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVERPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNA
HDAVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHILMSRVARKVKDKNVLKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDGWSWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPR
SIQRLKQRIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRR
RLRLCQWLQWKRVRTRIRELRLALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKT
YWTAQGLKSLTQRYFELRQG(配列番号171)

【0331】

図27Aに例示されるように、本開示は、部分的には、プライム編集のための操作されたおよびPACE²進化型RTバリエーションを提供する。これまで、哺乳動物細胞においてプライム編集のために利用されてきた唯一のRT酵素は、M-MLV RTである。M-MLV RTは大きな酵素(2.2kB)であり、アデノ随伴ウイルス(AAV)などの多くのin vivo送達方法に障壁をもたらす。RT酵素はそれらのサイズおよび酵素活性が大きく異なるので、本明細書に開示される代替酵素は、プライム編集(例として、より小さいサイズまたは改善された編集)に固有の利点を提供する。これらの改善は、より効率的であり、治療用途のためにより容易に送達されるプライムエディターをもたらす。

【0332】

様々な他の態様において、PEmaxを包含する改変されたプライムエディタータンパク質は、逆転写酵素ドメインを含む。一部の態様において、逆転写酵素ドメインは、配列番号34のアミノ酸配列を有する野生型MMLV逆転写酵素のバリエーションである。

【0333】

例えば、配列番号2のPEmaxは、配列番号33の野生型MMLV逆転写酵素ドメインに基づき(特に、配列番号33のヌクレオチド配列を有するジェンスクリプトのコドン最適化MMLV逆転写酵素)、配列番号34の野生型MMLV RTと比較してアミノ酸置換D200N T306K W313F T330P L603Wを含む、配列番号34のバリエーション逆転写酵素ドメインを含む。PEmaxのバリエーションRTのアミノ酸配列は配列番号34である。

【0334】

改変されたプライムエディターは他のバリエーションRTも含み得る。様々な態様において、本明細書に記載の改変されたプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、次の突然変異の1以上を含むバリエーションRTを包含し得る:配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列に

10

20

30

40

50

おける対応するアミノ酸位置におけるP51L、S67K、E69K、L139P、T197A、D200N、H204R、F209N、E302K、E302R、T306K、F309N、W313F、T330P、L345G、L435G、N454K、D524G、E562Q、D583N、H594Q、L603W、E607K、またはD653N。

【0335】

本開示の様々な態様に従ってnapDNAbpタンパク質に融合または個々のタンパク質として提供され得るいくつかの例示的な逆転写酵素が、下で提供される。例示の逆転写酵素は、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%の配列同一性を以下の野生型酵素または部分的な酵素に対して有するバリエーションを含む：

【表34-1】

説明	配列(野生型に対してバリエーション置換)
逆転写酵素 (M-MLV RT)野生型 モロニー Maus 白血病ウイルス	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSQKYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCCQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYYLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGTAFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWG PDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLDTRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLVVYTDSRYAFATAHGHGEIYRRRGILLTSEGKEIKNKDEILALIK ALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLL IENSSP (配列番号 33)

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 2】

説明	配列(野生型に対してバリエーション置換)
PEI(本明細書で開示されるブライム編集1融合タンパク質)において使用される	
M-MLV RT D200N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVS LGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREV NKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVM GQTPKTTPRQLREFLG TAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKGTGLFNWG PDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNC LDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLNVYTDSRYAFATAH IHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLK ALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLL IENSSP (配列番号 63)
M-MLV RT D200N T330P	TLNIEDEYRLHETSKEPDVS LGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREV NKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVM GQTPKTTPRQLREFLG TAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTGLFNWG PDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNC LDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLNVYTDSRYAFATAH IHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLK ALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLL IENSSP (配列番号 64)
M-MLV RT D200N T330P L603W	TLNIEDEYRLHETSKEPDVS LGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREV NKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVM GQTPKTTPRQLREFLG TAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTGLFNWG PDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 3】

説明	配列(野生型に対してバリエーション置換)
	LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETETEWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLNVYTDSRYAFATAHIGEIYRRRG <u>W</u> LTSEGKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 65)
M-MLV RT D200N T330P L603W E69K	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSIKQYPMSQ <u>K</u> ARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNT LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQW YTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLF <u>N</u> EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRA LLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKETV MGQTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK <u>P</u> GTLFNW GPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMG QPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVV ALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTD GSSLLQEGQRKAGAAVTTETETEWAKALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIGEIYRRRG <u>W</u> LTSEGKEIKNKDEILA LLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDT STLLIENSSP (配列番号 66)
M-MLV RT D200N T330P L603W E302R	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLF <u>N</u> EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKETV MGQTPKTPRQLR <u>R</u> FLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK <u>P</u> GTLFNW PDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETETEWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLNVYTDSRYAFATAHIGEIYRRRG <u>W</u> LTSEGKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 67)
M-MLV RT D200N T330P L603W E607K	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLF <u>N</u> EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKETV MGQTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK <u>P</u> GTLFNW PDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETETEWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 4】

説明	配列(野生型に対してバリエーション置換)
	EGKKLNVYTDSRYAFATAHIGHEIYRRRG <u>W</u> LTS <u>K</u> GKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 68)
M-MLV RT D200N T330P L603W L139P	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSG <u>P</u> PPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLF <u>N</u> EALHRDLADFRIQHDPDILLQYVDDLLLAATSELDCCQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGTAAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK <u>P</u> GTLFNWG PDQKQAYQEIQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETETEVIAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLNVYTDSRYAFATAHIGHEIYRRRG <u>W</u> LTS <u>G</u> KKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 69)
M-MLV RT D200N T330P L603W L435G	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLF <u>N</u> EALHRDLADFRIQHDPDILLQYVDDLLLAATSELDCCQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGTAAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK <u>P</u> GTLFNWG PDQKQAYQEIQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LV <u>I</u> GAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETETEVIAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLNVYTDSRYAFATAHIGHEIYRRRG <u>W</u> LTS <u>G</u> KKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 70)
M-MLV RT D200N T330P L603W N454K	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLF <u>N</u> EALHRDLADFRIQHDPDILLQYVDDLLLAATSELDCCQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGTAAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK <u>P</u> GTLFNWG PDQKQAYQEIQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLS <u>K</u> ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETETEVIAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLNVYTDSRYAFATAHIGHEIYRRRG <u>W</u> LTS <u>G</u> KKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 71)

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 5】

説明	配列(野生型に対してバリエーション置換)
M-MLV RT D200N T330P L603W T306K	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLFNEALHRDLADFRIQHDPDLILLQYVDDLLAATSELDCQQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYYLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWG PDQQKAYQEIQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLNVYTDSRYAFATAHGHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 72)
M-MLV RT D200N T330P L603W W313F	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLFNEALHRDLADFRIQHDPDLILLQYVDDLLAATSELDCQQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYYLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGP DQQKAYQEIQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLNVYTDSRYAFATAHGHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 73)
M-MLV RT D200N T330P L603W D524G E562Q D583N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLFNEALHRDLADFRIQHDPDLILLQYVDDLLAATSELDCQQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYYLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWG PDQQKAYQEIQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTGGG SLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAQLIALTQALKMA EGKKLNVYTNSRYAFATAHGHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 74)
M-MLV RT D200N T330P	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 6】

説明	配列(野生型に対してバリエーション置換)
L603W E302R W313F	TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDP  EMGISGQLTWTRL  PQGFKN SPTL  FNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLR  FLGTAGFCRL  FJPGFAEMAAPLYPLTK  PGTLFNWG PDQKQAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLT  MGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLNVTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG  WLTSEGKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 75)
M-MLV RT D200N T330P L603W E607K L139P	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVNPYNLLSG  PPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDP  EMGISGQLTWTRL  PQGFKN SPTL  FNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK  PGTLFNWG PDQKQAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLT  MGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLNVTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG  WLT  SKGKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 76)
M-MLV RT P51L S67K T197A H204R E302K F309N W313F T330P L435G N454K D524G D583N H594Q D653N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LII  LLKATSTPVSIKQYPM  KQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVNPYNLLSGLPPSHQW YTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDP  EMGISGQLTWTRL  PQGFK NSP  ALFDEAL  RRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTR ALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLR  KFLGTAG  NCRL  FJPGFAEMAAPLYPLTK  PGTLFN WGP  DQKQAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLT  TM GQPLVIGAPHAVEALVKQPPDRWLS  KARMTHYQALLLDTDRVQFGPV VALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYT  GGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKKLNVTNSRYAFATAHI  QGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILA LLKALFLPKRLSIHCPGHQKGHSAEARGNRMAN  QAARKAAITETPDT STLLIENSSP (配列番号 77)
M-MLV RT D200N P51L S67K T197A H204R E302K F309N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LII  LLKATSTPVSIKQYPM  KQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVNPYNLLSGLPPSHQW YTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDP  EMGISGQLTWTRL  PQGFK NSP  ALF  NEAL  RRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTR ALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARKET

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 7】

説明	配列(野生型に対してバリエーション置換)
W313F T330P L345G N454K D524G D583N H594Q D653N	VMGQPTPKTPRQLR <u>K</u> FLGTAG <u>N</u> CRL <u>F</u> IPGFAEMAAPLYPLTK <u>P</u> GTLFN WGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLT GQPLVIGAPHAVEALVKQPPDRWLS <u>K</u> ARMTHYQALLDTRVQFGPV VALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYT <u>G</u> GSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKKLVYTN <u>S</u> RYAFATAHI <u>Q</u> GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILA LLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMAN <u>N</u> QAARKAAITETPDT STLLIENSSP (配列番号 78)
PE2および PEmax における M-MLV RT D200N T330P L603W T306K W313F	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIPLKATSTPVSQYPMSEARLGKPHIQRLDQGLVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWY TVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLF <u>N</u> EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLILLAATSELDCCQGTRAL LQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLYLLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLG <u>K</u> AGFCRL <u>F</u> IPGFAEMAAPLYPLTK <u>P</u> GTLFNWG PDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQP LVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLDTRVQFGPVVAL NPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGS SLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKKLVYTD <u>S</u> RYAFATAHIHGEIYRRRG <u>W</u> LTSEGKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP (配列番号 34)

10

20

【0336】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、次の突然変異の1以上を含むバリエーションRTを包含し得る:配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるP51X、S67X、E69X、L139X、T197X、D200X、H204X、F209X、E302X、T306X、F309X、W313X、T330X、L345X、L435X、N454X、D524X、E562X、D583X、H594X、L603X、E607X、またはD653Xであって、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。

30

【0337】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるP51X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはLである。

40

【0338】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるS67X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはKである。

【0339】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるE69X

50

突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはKである。

【0340】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるL139X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはPである。

【0341】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるT197X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはAである。

【0342】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるD200X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはNである。

【0343】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるH204X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはRである。

【0344】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるF209X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはNである。

【0345】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるE302X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはKである。

【0346】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるE302X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはRである。

【0347】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるT306X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはKである。

10

20

30

40

50

【0348】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるF309X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはNである。

【0349】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるW313X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはFである。

10

【0350】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるT330X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはPである。

【0351】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるL345X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはGである。

20

【0352】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるL435X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはGである。

30

【0353】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるN454X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはKである。

【0354】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるD524X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはGである。

40

【0355】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるE562X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはQである。

【0356】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナー

50

としてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるD583X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはNである。

【0357】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるH594X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはQである。

10

【0358】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるL603X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはWである。

【0359】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるE607X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはKである。

20

【0360】

様々な他の態様において、本明細書に記載のプライムエディター(RTが融合パートナーとしてまたはトランスでどちらかで提供される)は、配列番号33の野生型M-MLV RTにおけるまたは別の野生型RTポリペプチド配列上の対応するアミノ酸位置におけるD653X突然変異を含むバリエーションRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある特定の態様において、XはNである。

【0361】

本開示の様々な態様に従ってnapDNAbpタンパク質に融合または個々のタンパク質として提供され得るいくつかの例示的な逆転写酵素が、下で提供される。例示的な逆転写酵素は、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%の配列同一性を、配列番号33~34および63~78によって表される野生型酵素または部分的な酵素に対して有するバリエーションを包含する。

30

【0362】

ここに記載されるプライムエディター(PE)システムは、次の米国特許(これらのそれぞれはそれらの全体が参照によって組み込まれる):米国特許第10,202,658号;第10,189,831号;第10,150,955号;第9,932,567号;第9,783,791号;第9,580,698号;第9,534,201号;および第9,458,484号のいずれかに記載または開示されているいずれかの公に利用可能な逆転写酵素と、変異をインストールするための公知の方法またはタンパク質を進化させるための公知の方法を用いて作られ得るそのいずれかのバリエーションとを企図する。次の参照は当技術分野の逆転写酵素について記載する。それらの開示のそれぞれはそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0363】

Herzig, E., Voronin, N., Kucherenko, N. & Hizi, A. A Novel Leu92 Mutant of HIV-1 Reverse Transcriptase with a Selective Deficiency in Strand Transfer Causes a Loss of Viral Replication. J. Virol. 89, 8119-8129 (2015).

【0364】

Mohr, G. et al. A Reverse Transcriptase-Cas1 Fusion Protein Contains a Cas6 Domain Required for Both CRISPR RNA Biogenesis and RNA Spacer

50

Acquisition. *Mol. Cell* 72,700-714.e8(2018).

[0365]

Zhao, C., Liu, F. & Pyle, A. M. An ultraprocessive, accurate reverse transcriptase encoded by a metazoan group II intron. *RNA* 24,183-195(2018).

[0366]

Zimmerly, S. & Wu, L. An Unexplored Diversity of Reverse Transcriptases in Bacteria. *Microbiol Spectr* 3,MDNA3-0058-2014(2015).

[0367]

Ostertag, E. M. & Kazazian Jr, H. H. Biology of Mammalian L1 Retrotransposons. *Annual Review of Genetics* 35,501-538(2001).

[0368]

Perach, M. & Hizi, A. Catalytic Features of the Recombinant Reverse Transcriptase of Bovine Leukemia Virus Expressed in Bacteria. *Virology* 259,176-189(1999).

[0369]

Lim, D. et al. Crystal structure of the moloney murine leukemia virus RNase H domain. *J. Virol.* 80,8379-8389(2006).

[0370]

Zhao, C. & Pyle, A. M. Crystal structures of a group II intron maturase reveal a missing link in spliceosome evolution. *Nature Structural & Molecular Biology* 23,558-565(2016).

[0371]

Griffiths, D. J. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol.* 2,REVIEWS1017(2001).

[0372]

Baranauskas, A. et al. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein Eng Des Sel* 25,657-668(2012).

[0373]

Zimmerly, S., Guo, H., Perlman, P. S. & Lambowitz, A. M. Group II intron mobility occurs by target DNA-primed reverse transcription. *Cell* 82,545-554(1995).

[0374]

Feng, Q., Moran, J. V., Kazazian, H. H. & Boeke, J. D. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87,905-916(1996).

[0375]

Berkhout, B., Jebbink, M. & Zsiros, J. Identification of an Active Reverse Transcriptase Enzyme Encoded by a Human Endogenous HERV-K Retrovirus. *Journal of Virology* 73,2365-2375(1999).

[0376]

Kotewicz, M. L., Sampson, C. M., D'Alessio, J. M. & Gerard, G. F. Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. *Nucleic Acids Res* 16,265-277(1988).

[0377]

Arezi, B. & Hogrefe, H. Novel mutations in Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase increase thermostability through tighter binding to template-primer. *Nucleic Acids Res* 37,473-481(2009).

[0378]

Blain, S. W. & Goff, S. P. Nuclease activities of Moloney murine leukemia v

10

20

30

40

50

irus reverse transcriptase. Mutants with altered substrate specificities. *J. Biol. Chem.* 268, 23585-23592 (1993).

[0379]

Xiong, Y. & Eickbush, T. H. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J* 9, 3353-3362 (1990).

[0380]

Herschhorn, A. & Hizi, A. Retroviral reverse transcriptases. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2717-2747 (2010).

[0381]

Taube, R., Loya, S., Avidan, O., Perach, M. & Hizi, A. Reverse transcriptase of mouse mammary tumour virus: expression in bacteria, purification and biochemical characterization. *Biochem. J.* 329 (Pt 3), 579-587 (1998).

[0382]

Liu, M. et al. Reverse Transcriptase-Mediated Tropism Switching in Bordetella Bacteriophage. *Science* 295, 2091-2094 (2002).

[0383]

Luan, D. D., Korman, M. H., Jakubczak, J. L. & Eickbush, T. H. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* 72, 595-605 (1993).

[0384]

Nottingham, R. M. et al. RNA-seq of human reference RNA samples using a thermostable group II intron reverse transcriptase. *RNA* 22, 597-613 (2016).

[0385]

Telesnitsky, A. & Goff, S. P. RNase H domain mutations affect the interaction between Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase and its primer-template. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1276-1280 (1993).

[0386]

Halvas, E. K., Svarovskaia, E. S. & Pathak, V. K. Role of Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase Deoxyribonucleoside Triphosphate-Binding Site in Retroviral Replication and In Vivo Fidelity. *Journal of Virology* 74, 10349-10358 (2000).

[0387]

Nowak, E. et al. Structural analysis of monomeric retroviral reverse transcriptase in complex with an RNA/DNA hybrid. *Nucleic Acids Res* 41, 3874-3887 (2013).

[0388]

Stamos, J. L., Lentzsch, A. M. & Lambowitz, A. M. Structure of a Thermostable Group II Intron Reverse Transcriptase with Template-Primer and Its Functional and Evolutionary Implications. *Molecular Cell* 68, 926-939. e4 (2017).

[0389]

Das, D. & Georgiadis, M. M. The Crystal Structure of the Monomeric Reverse Transcriptase from Moloney Murine Leukemia Virus. *Structure* 12, 819-829 (2004).

[0390]

Avidan, O., Meer, M. E., Oz, I. & Hizi, A. The processivity and fidelity of DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptase of bovine leukemia virus. *European Journal of Biochemistry* 269, 859-867 (2002).

[0391]

10

20

30

40

50

Gerard, G. F. et al. The role of template-primer in protection of reverse transcriptase from thermal inactivation. *Nucleic Acids Res* 30, 3118-3129 (2002).

【0392】

Monot, C. et al. The Specificity and Flexibility of L1 Reverse Transcription Priming at Imperfect T-Tracts. *PLOS Genetics* 9, e1003499 (2013).

【0393】

Mohr, S. et al. Thermostable group II intron reverse transcriptase fusion proteins and their use in cDNA synthesis and next-generation RNA sequencing. *RNA* 19, 958-970 (2013).

【0394】

逆転写酵素に関する上に記されている参照のいずれかは、すでにそのように申し立てられていない場合には、それらの全体が参照によってここに組み込まれる。

【0395】

追加のドメイン

A. リンカー

本明細書に記載の改変されたPE融合タンパク質は、1つ以上のリンカーを含み得る。

【0396】

上で定められている通り、本明細書において用いられる「リンカー」という用語は、2つの分子または部分、例として、ヌクレアーゼの結合ドメインおよび切断ドメインを連結する化学基または分子を指す。一部の態様において、リンカーはRNAによってプログラム型ヌクレアーゼのgRNA結合ドメインおよびポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)の触媒ドメインを連結する。一部の態様において、リンカーはdCas9および逆転写酵素を連結する。典型的には、リンカーは2つの基、分子、または他の部分の間に配置されるかまたはそれらによってフランキングされ、共有結合を介してそれぞれの1つに接続され、ゆえに2つを接続する。一部の態様において、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。一部の態様において、リンカーは有機分子、基、ポリマー、または化学的部分である。一部の態様において、リンカーは、5~100アミノ酸長、例えば5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、30~35、35~40、40~45、45~50、50~60、60~70、70~80、80~90、90~100、100~150、または150~200アミノ酸長である。より長いまたはより短いリンカーも企図される。

【0397】

リンカーは共有結合ほども単純であってもよい、またはそれは長さが多くの原子であるポリマー性リンカーであってもよい。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、分枝または非分枝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モノマー、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)のモノマー、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

10

20

30

40

50

はヘテロアリアル部分を含む。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)の結合を促進するための官能化部分を包含してもよい。いずれかの求電子剤がリンカーの一部として使用されてもよい。例示の求電子剤は、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、ハロゲン化アリアル、ハロゲン化アシル、およびイソチオシアネートを包含するが、これらに限定されない。

【0398】

一部の他の態様において、リンカーは、アミノ酸配列(GGGGS)_n(配列番号84)、(G)_n(配列番号85)、(EAAAK)_n(配列番号86)、(GGS)_n(配列番号87)、(SGGS)_n(配列番号81)、(XP)_n(配列番号88)、またはそれらのいずれかの組合せを含み、nは独立して1~30の整数であり、Xはいずれかのアミノ酸である。一部の態様において、リンカーは、アミノ酸配列(GGS)_n(配列番号87)を含み、ここで、nは1、3、または7である。一部の態様において、リンカーはアミノ酸配列SGSETPGTSESATPES(配列番号89)を含む。一部の態様において、リンカーはアミノ酸配列SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS(配列番号90)を含む。一部の態様において、リンカーはアミノ酸配列SGGSSGGSSGGS(配列番号91)を含む。一部の態様において、リンカーはアミノ酸配列SGGS(配列番号81)を含む。他の態様において、リンカーはアミノ酸配列SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESAGSYPPYDVPDYAGSAAPAAKKKKLDGSGSGGSSGGS(配列番号83、60AA)を含む。

【0399】

ある特定の態様において、リンカーが、本発明のペプチドまたはペプチドドメインもしくは部分のいずれかを連結するために用いられてもよい(例として、逆転写酵素に連結または融合されたnapDNAbp)。

【0400】

上で定められている通り、本明細書において用いられる「リンカー」という用語は、2つの分子または部分、例として、ヌクレアーゼの結合ドメインおよび切断ドメインを連結する化学基または分子を指す。一部の態様において、リンカーはRNAによってプログラム型ヌクレアーゼのgRNA結合ドメインおよびリコンビナーゼの触媒ドメインを連結する。一部の態様において、リンカーはdCas9および逆転写酵素を連結する。典型的には、リンカーは2つの基、分子、または他の部分の間に配置されるかまたはそれらによってフランキングされ、共有結合を介してそれぞれの1つに接続され、ゆえに2つを接続する。一部の態様において、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。一部の態様において、リンカーは有機分子、基、ポリマー、または化学的部分である。一部の態様において、リンカーは、5~100アミノ酸長、例えば5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、30~35、35~40、40~45、45~50、50~60、60~70、70~80、80~90、90~100、100~150、または150~200アミノ酸長である。より長いまたはより短いリンカーも企図される。

【0401】

リンカーは共有結合ほども単純であってもよい、またはそれは長さが多くの原子であるポリマー性リンカーであってもよい。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、分枝または非分枝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モノマー、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)のモノマー、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)の結合を促進するための官能化部分を包含してもよい。いずれかの求電子剤がリンカーの一部として使用されてもよい。例示の求電子剤は、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ネートを包含するが、これらに限定されない。

10

【0402】

一部の他の態様において、リンカーは、アミノ酸配列(GGGGS)_n(配列番号84)、(G)_n(配列番号85)、(EAAAK)_n(配列番号86)、(GGS)_n(配列番号87)、(SGGS)_n(配列番号81)、(XP)_n(配列番号88)、またはそれらのいずれかの組合せを含み、nは独立して1~30の整数であり、Xはいずれかのアミノ酸である。一部の態様において、リンカーは、アミノ酸配列(GGS)_n(配列番号87)を含み、ここで、nは1、3、または7である。一部の態様において、リンカーはアミノ酸配列SGSETPGTSESATPES(配列番号89)を含む。一部の態様において、リンカーはアミノ酸配列SGGSSGGSSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS(配列番号90)を含む。一部の態様において、リンカーはアミノ酸配列SGGSSGGSSGGSS(配列番号91)を含む。一部の態様において、リンカーはアミノ酸配列SGGS(配列番号81)を含む。

20

【0403】

特に、以下のリンカーを様々な態様において使用して、プライムエディタードメインを互いに結合することができる。

GGG(配列番号87);

GGSSGGSS(配列番号92);

GGSSGGSSGGSS(配列番号93);

SGGSSGGSSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS(配列番号80);

SGSETPGTSESATPES(配列番号89);

SGGSSGGSSSGSETPGTSESATPESAGSYDPYDVPDYAGSAAPAAKKKKLDGSGSGSSGGSS(配列番号83).

30

【0404】

PE融合タンパク質はまた、napDNABp(例として、Cas9ドメイン)およびポリメラーゼドメイン(例として、RTドメイン)以外の様々な他のドメインを含んでもよい。例えば、napDNABpがCas9であり、ポリメラーゼがRTである場合、PE融合タンパク質は、Cas9ドメインをRTドメインと結合する1つ以上のリンカーを含んでもよい。リンカーはまた、核局在化配列(NLS)またはFEN1(または他のフラップエンドヌクレアーゼ)などの他の機能的ドメインをPE融合タンパク質またはそのドメインに結合してもよい。

40

【0405】

B. 核局在化配列(NLS)

様々な態様において、改変されたPE融合タンパク質は、細胞核へのタンパク質の移行を促進するのを助ける1つ以上の核局在化配列(NLS)を含んでもよい。このような配列は当技術分野で周知であり、次の例を包含し得る:

50

【表 3 5】

説明	配列	配列番号
SV40ラージT-AGのNLS	PKKKRKV	94
NLS	MKRTADGSEFESPKKKRKV	95
NLS	MDSLMMNRRKFLYQFKNVRWAKG RRETYLC	99
ヌクレオプラスミンのNLS	AVKRPAATKKAGQAKKKKLD	100
EGL-13のNLS	MSRRRKANPTKLSENAKKLAKEV EN	101
C-MYCのNLS	PAAKRVKLD	98
TUS-タンパク質のNLS	KLKIKRPVK	102
ポリオーマラージT-AGのNLS	VSRKRPRP	103
D型肝炎ウイルス抗原のNLS	EGAPPAKRAR	104
マウスP53のNLS	PPQPKKKPLDGE	105
PE1およびPE2のNLS	SGGSKRTADGSEFEPKKKKRKV	96
双節型SV40 NLS	KRTADGSEFESPKKKRKV	97

10

20

【0 4 0 6】

上のNLS例は限定的ではない。改変されたPE融合タンパク質はいずれかの公知のNLS配列を含んでもよく、Cokol et al., “Finding nuclear localization signals,” EMBO Rep., 2000, 1(5):411-415およびFreitas et al., “Mechanisms and Signals for the Nuclear Import of Proteins,” Current Genomics, 2009, 10(8):550-7に記載されているもののいずれかを包含し、それらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【0 4 0 7】

様々な態様において、本明細書において開示される方法および組成物において利用されるプライムエディターおよびプライムエディターをコードする構築物は、1つ以上の、好ましくは少なくとも2つの核局在化シグナルをさらに含む。ある特定の態様において、プライムエディターは少なくとも2つのNLSを含む。少なくとも2つのNLSによる態様において、NLSは同じNLSであり得るか、またはそれらは異なるNLSであり得る。加えて、NLSはプライムエディターの残りの部分との融合タンパク質の一部として発現されてもよい。一部の態様において、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、本開示の融合タンパク質は2つの双節型NLSを含む。一部の態様において、本開示の融合タンパク質は2つよりも多くの双節型NLSを含む。

30

【0 4 0 8】

NLS融合の位置付けはプライムエディターのN末端、C末端、または配列内であり得る(例としてコードされるnapDNAbp構成要素(例としてCas9)およびポリメラーゼドメイン(例として逆転写酵素ドメイン)の間に挿入される。

40

【0 4 0 9】

NLSは当技術分野のいずれかの公知のNLS配列であってもよい。NLSはまた、核局在のためのいずれかの将来に発見されるNLSであってもよい。NLSはまた、いずれかの天然に存在するNLSまたはいずれかの天然に存在しないNLS(例として、1以上の所望の突然変異を有するNLS)であってもよい。

「核局在化配列」または「NLS」という用語は、タンパク質の細胞核中への、例えば核輸送による、インポートを促進するアミノ酸配列を指す。核局在化配列は当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、2001年5月31日

50

にWO/2001/038547として公開された2000年11月23日出願のPlank et al.の国際PCT出願PCT/EP2000/011690に記載されており、この内容は参照により本明細書に組み込まれる。一部の態様において、NLSはアミノ酸配列PKKKRKV(配列番号94)、MDSLLMNRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC(配列番号99)、KRTADGSEFESPKKKRKV(配列番号97)、またはKRTADGSEFEPKKKKRKV(配列番号106)を含む。他の態様において、NLSはアミノ酸配列NLSKRPAAIKKAGQAKKKK(配列番号107)、PAAKRVKLD(配列番号98)、RQRRNELKRSF(配列番号108)、NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGQYFAKPRNQGGY(配列番号109)を含む。

【0410】

本開示の一側面において、プライムエディターは、1以上の核局在シグナル(NLS)、好ましくは少なくとも2つのNLSによって改変されてもよい。ある特定の態様において、プライムエディターは2以上のNLSによって改変される。本開示は、本開示のとき当技術分野で公知のいずれかの核局在シグナルまたは本出願時の後の現況技術によって同定されるかもしくははさなければ利用可能にされるいずれかの核局在シグナルの使用を企図する。代表的な核局在シグナルは、配列が発現される細胞の核にタンパク質を導くペプチド配列である。核局在シグナルは支配的には塩基性であり、タンパク質のアミノ酸配列のほとんどどこにでも配置され得、一般的には、4アミノ酸(Autieri&Agrawal,(1998)J.Biol.Chem.273:14731-37、参照により本明細書に組み込まれる)~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がリッチである(Magin et al.,(2000)Virology 274:11-16、参照により本明細書に組み込まれる)。核局在シグナルは多くの場合には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し遂げるために用いられている。例として、参照により組み込まれる、Tinland et al.,(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:7442-46;Moede et al.,(1999)FEBS Lett.461:229-34を参照されたい。移行は現行では核膜孔タンパク質を伴うと考えられる。

【0411】

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(PKKKKRKV(配列番号94))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110))によって例示される、可変の数のスペーサー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)非カノニカルな配列、例えば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 1991)。

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出現する。NLSはタンパク質のN末端、C末端、および中心領域から同定されている。ゆえに、本開示は、プライムエディターのC末端、N末端、および内部領域において1以上のNLSによって改変されてもよいプライムエディターを提供する。核局在シグナルそれ自体と例えば強直的にまたは立体的に干渉しないようにして、構成要素NLS残基として機能しないより長い配列の残基が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定はないが、事実上、このような配列は長さおよび組成が機能的に限定され得る。

【0412】

本開示は、1以上のNLSを包含するようにプライムエディターを改変するためのいずれかの好適な手段を企図する。一側面において、プライムエディターは、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に翻訳により融合されたプライムエディタータンパク質を発現するように、すなわちプライムエディター-NLS融合体構築物を形成するように、操作されてもよい。他の態様において、プライムエディターをコードするヌクレオチド配列は、コードされるプライムエディターの内部領域に1以上のNLSをコードする読み枠を組み込むように遺伝子改変されてもよい。加えて、NLSは、プライムエディターとN末端に、C末端に、または内部に、例としてタンパク質の中心領域に取り付けられた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ー領域を包含してもよい。ゆえに、本開示は、プライムエディターおよび1以上のNLSを

含む融合タンパク質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。

【0413】

本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターは核局在シグナルをもまた含んでもよく、これらは、1つ以上のリンカー、例としてポリマー性、アミノ酸、核酸、多糖、化学的、または核酸リンカーエレメントを介してプライムエディターに連結される。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的リンカードメイン)であり得、プライムエディターおよび1以上のNLSの間に結合(例として、共有結合的連結、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、プライムエディターに連結され得る。

【0414】

C. フラップエンドヌクレアーゼ(例として、FEN1)

様々な態様において、PE融合タンパク質は1つ以上のフラップエンドヌクレアーゼ(例として、FEN1)を含んでもよく、これは5'一本鎖DNAフラップ(PE融合タンパク質にトランスで提供されるかまたは融合された)の除去を触媒する酵素を指す。これらは、細胞プロセス(DNA複製を包含する)の間に形成された5'フラップの除去を処理する天然に存在する酵素である。本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライム編集は、内因的に供給されるフラップエンドヌクレアーゼまたはトランスで提供されるものを利用して、プライム編集に標的部位に形成された内在性DNAの5'フラップを除去してもよい。フラップエンドヌクレアーゼは当技術分野において知られており、Patel et al., “Flap endonucleases pass 5'-flaps through a flexible arch using a disorder-thread-order mechanism to confer specificity for free 5'-ends,” *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(10):4507-4519およびTsutakawa et al., “Human flap endonuclease structures, DNA double-base flipping, and a unified understanding of the FEN1 superfamily,” *Cell*, 2011, 145(2):198-211(これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)に記載のものから見出され得る。例示のフラップエンドヌクレアーゼは、以下のアミノ酸配列によって表され得るFEN1である:

【表36】

説明	配列	配列番号
FEN1 野生型(wt)	MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSI YQFLIAVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMME NGIKPVYVFDGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQ AQAAGAEQEVEKFTKRLVKVTKQHNDCKHLLSLMGI PYLDAPSEAEASCAALVKAGKVYAAATEDMDCLTFGS PVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSRILQELGLNQEQQFVD LCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSIEEIVRRLLDP NKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELKWSEPN EEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSGTQGRLD DFFKVTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKR GK	配列番号 112

【0415】

フラップエンドヌクレアーゼは、いずれかのFEN1バリエント、突然変異体、または他のフラップエンドヌクレアーゼオルソログ、ホモログ、もしくはバリエントをもまた包含してもよい。非限定的なFEN1バリエントの例は以下の通りである。

10

20

30

40

50

【表 3 7 - 1】

説明	配列	配列番号
FEN1 K168R (FEN1 wtに 対して)	MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSI YQFLIAVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMME NGIKPVYVFDGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQ AQAAGAEQEVEKFTKRLVKVTKQHNDCKHLLSLMGI PYLDAPSEAEASCAALV R AGKVYAAATEDMDCLTFGS PVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSRILQELGLNQE QFVD LCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSIEEIVRRDP NKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPEVELKWSEPN EEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLD DFFKVTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKR GK	配列番号 113
FEN1 S187A (FEN1 wtに 対して)	MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSI YQFLIAVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMME NGIKPVYVFDGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQ AQAAGAEQEVEKFTKRLVKVTKQHNDCKHLLSLMGI PYLDAPSEAEASCAALVKAGKVYAAATEDMDCLTFG A PVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSRILQELGLNQE QFV DLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSIEEIVRRDP PNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPEVELKWSEP NEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRL DDFFKVTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFK RGK	配列番号 114
FEN1 K354R (FEN1 wtに 対して)	MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSI YQFLIAVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMME NGIKPVYVFDGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQ AQAAGAEQEVEKFTKRLVKVTKQHNDCKHLLSLMGI PYLDAPSEAEASCAALVKAGKVYAAATEDMDCLTFGS PVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSRILQELGLNQE QFVD LCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSIEEIVRRDP NKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPEVELKWSEPN EEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLD	配列番号 115

10

20

30

40

50

【表 3 7 - 2】

	DDFKVTGSLSSA <u>R</u> RKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKR GK	
GEN1	MGVNDLWQILEPVKQHIPLRNLGGKTIAVDLSLWVCE AQTVKKMMGSMKPHLRNLFFRISYLTQMDVKLVFV MEGEPPKLKADVISKRNQSRYGSSGKSWSQKTGRSHF KSVLRECLHMLECLGIPWVQAAGEAEAMCAYLNAGG HVDGCLTNDGDTFLYGAQTVYRNFTMNTKDPHVDCY TMSSIKSKLGLDRDALVGLAILLGCDYLPKGVPGVGKE QALKLIQILKGQSLLQRFNRWNETSCNSSPQLLVTKKL AHCSVCSHPGSPKDHENGCRLCKSDKYCEPHDYEYC CPCEWHRTEHDRQLSEVENNIKKKACCCEGFPFHEVIQ EFLNKKDKLVKVIRYQRPDLLLQFRFTLEKMEWPNHY ACEKLLVLLTHYDMIERKLGSRNSQLQPIRIVKTRIRN GVHCFEIEWEKPEHYAMEDKQHGEFALLTIEEESLFEA AYPEIVAVYQKQKLEIKGKKQKRIKPKENNLPEPDEV SFQSHMTLKPTCEIFHKQNSKLNISGSPDPTLPQESISAS LNSLLLPKNTPCLNAQEQQFMSSLRPLAIQKIKAVSKSLI SESSQNTSSHNISVIADLHLSTIDWEGTSFSNSPAIQRN TFSHDLKSEVELSAIPDGFENIPEQLSCESERYTANIK KVLDESDSGISPEEHLLSGITDLCLQDLPLKERIFTKLSY PQDNLQPDVNLKTLKSVKESCIANSKSDCTSHLSKDL PGIPLQNESRDSKILKGDQLLQEDYKVNTSVPYSVSNT VVKTCNVRPPNTALDHSRKVDMQTTTRKILMKKSVCLD RHSSDEQSAPVFGKAKYTTQRMKHSSQKHNSSHFKES GHNKLSSPKIHIKETEQCVRSYETAENEESCFFPDSTKSS LSSLQCHKKENNSGTCLDSPLPLRQRLKLRQST	配列番号 116
ERCC5	MGVQGLWKLLCSEGRQVSPEALEGKILAVDISIWLNQ ALKGVRDRHGNISPHLLTLFHRCLKLLFFRIRPIFVF DGDAPLLKKQTLVKKRQRKDLASSDSRKTTEKLLKTF LKRQAIKTAFRSKRDEALPSLTQVRRENDLYVLPPLQE EEKHSSEEEDEKEWQERMNQKQALQEEFFHNPQAIDIE SEDFSSLPPEVKHEILTMKEFTKRRRTLFEAMPEESDD FSQYQLKGLLKKNYLNQHIEHVQKEMNQHSGHIRRQ YEDEGGFLKEVESRRVSEDTSYILIKGIQAKTVAEV DSESLPSSSKMHGMSFDVKSSPCEKLTEKEPDATPPSP RTLLAMQAALLGSSSEEELESENRRQARGRNAPAAVD EGSISPRTLAIAKRALDDDEDVKVCAGDDVQTGGPGAE EMRINSSTENSDEGLKVRDGGKIPFTATLASSSVNSAEE HVASTNEGPREPTDSVPKEQMSLVHVGTEAFPISESMI KDRKDRLPLESAVVRHSDAPGLPNGRELTPASPTCTNS VSKNETHAEVLEQQNELCPYESKFDSSLLSSDDETKCK PNSASEVIGPVSLQETSSIVSVPSEAVDNVENNVVSNK EHENFLETIQEQTTESAGQDLISIPKAVEPMEIDSESE SDGSFIEVQSVISDEELQAEFPETSKPPSEQGEEELVGTR EGEAPAESESLLRDNSEDDVDGEPQEAEDAEDSLHE WQDINLEELETLESNLLAQQNSLKAQKQQQERIAATVT GQMFLESQELLRLFGIPYIQAPMEAEAQCAILDLTQTS GTITDDSDIWLFGARHVYRNFFNKNKFVEYYQYVDFH NQLGLDRNKLINLAYLLGSDYTEGIPTVGCVTAMEILN	配列番号 117

10

20

30

40

50

【表 3 7 - 3】

	EFPGHGLEPLLKFSEWWHEAQKNPKIRPNPHDTKVKK KLRTLQLTPGFNPAPVAEAYLKPVVDDSKGSFLWGKP DLDKIREFCQRYFGWNRKTDESFPVLKQLDAQQTQ LRIDSFFRLAQQEKEDAKRIKSQRLNRAVTCMLRKEKE AAASEIEAVSVAMEKEFELLDKAKRKTQKRGITNTLEE SSSLKRKRLSDSKRKNTCGGFLGETCLSESSDGSSSEDA ESSSLMNQVQRRTAAKEPKTSASDSQNSVKEAPVKNGG ATTSSSSDSDDDGGKEKMVLVTARSVFGKKRRKLRA RGRKRKT	

10

【0 4 1 6】

様々な態様において、本明細書において企図されるプライムエディターは、上の配列のいずれかと少なくとも約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%同一であるアミノ酸配列を有する上に開示されている配列のいずれかのフラップエンドヌクレアーゼバリエーションを含むこともよい。

5'末端一本鎖DNAフラップの除去を容易化するために本方法によって利用されてもよい他のエンドヌクレアーゼは、(1)trex2、(2)exo1エンドヌクレアーゼを含むが、これらに限定されない(例として、Keijzers et al., Biosci Rep. 2015, 35(3):e00206)。

20

【0 4 1 7】

Trex2

3'の3つのプライム修復エキソヌクレアーゼ2(TREX2)-ヒト

受託番号NM_080701

MSEAPRAETFVFLDLEATGLPSVEPEIAELSLFAVHRSSLENPEHDESGALVLPVLD
 KLTLCMCERPFTAKASEITGLSSEGLARCRKAGFDGAVVRTLQAFSLRQAGPICLVA
 HNGFDYDFPLLCAELRRLGARLPDRTVCLDTLPALRGLDRAHSHGTRARGRQGYSLG
 SLFHRYPFRAEPSAAHSAEGDVHTLLLIPLHRAAELLAWADEQARGWAHIEPMYLPP
 DDPSLEA(配列番号118)。

30

【0 4 1 8】

3'の3つのプライム修復エキソヌクレアーゼ2(TREX2)-マウス

受託番号NM_011907

MSEPPRAETFVFLDLEATGLPNMDPEIAEISLFAVHRSSLENPERDDSGSLVLPVLD
 KLTLCMCERPFTAKASEITGLSSESLMHCGKAGFNGAVVRTLQGFLSRQEGPICLV
 AHNGFDYDFPLLCTELQRLGAHLPPQDTVCLDTLPALRGLDRAHSHGTRAQGRKSYS
 LASLFHRYFQAEPSSAAHSAEGDVHTLLLIPLHRAPELLAWADEQARSWAHIEPMYV
 PPDGPSLEA(配列番号119)。

40

【0 4 1 9】

3'の3つのプライム修復エキソヌクレアーゼ2(TREX2)-ラット

受託番号NM_001107580

MSEPLRAETFVFLDLEATGLPNMDPEIAEISLFAVHRSSLENPERDDSGSLVLPVLD
 KLTLCMCERPFTAKASEITGLSSEGLMNCRKAAFNDAVVRTLQGFLSRQEGPICLV
 AHNGFDYDFPLLCTELQRLGAHLPPDRTVCLDTLPALRGLDRVHSHGTRAQGRKSYS
 LASLFHRYFQAEPSSAAHSAEGDVNTLLLIPLHRAPELLAWADEQARSWAHIEPMYV
 PPDGPSLEA(配列番号120)。

【0 4 2 0】

Exo1

ヒトエキソヌクレアーゼ1(EXO1)は、DNAミスマッチ修復(MMR)、マイクロ媒介末

50

端結合(micro-mediated end-joining、相同組換え(HR)、および複製を包含する、多くの種々のDNA代謝プロセスに関係する。ヒトEXO1は、真核生物ヌクレアーゼRad2/XPGのファミリーに属し、これはまたFEN1およびGEN1も包含する。Rad2/XPGファミリーは、ファージからヒトまでの種を通してヌクレアーゼドメインが保存されている。EXO1遺伝子産物は、5'エキソヌクレアーゼと5'フラップ活性との両方を呈する。加えて、EXO1は、固有の5'RNase H活性も含有する。ヒトEXO1は、二本鎖DNA(dsDNA)、ニック、ギャップ、シュードY構造のプロセシングに対し高親和性を有し、遺伝で受け継いだそのフラップ活性を使用してホリデイ接点を分解し得る。ヒトEXO1はMMRに関係し、MLH1およびMSH2と直接相互作用する保存された結合ドメインを含有する。EXO1核酸分解活性は、PCNA、MutS α (MSH2/MSH6複合体)、14-3-3、MRN、および9-1-1複合体によって正に刺激される。

10

【0421】

エキソヌクレアーゼ1(EXO1)受託番号NM_003686(Homo sapiensエキソヌクレアーゼ1(EXO1)、転写産物バリエーション3)-アイソフォームA

MGIQGLLQFIKEASEPIHVRKYKGQVVAVD TYCWLHKGAIACA EK LAKGEPTDRYVG
FCMKFVNMLLSHG IKPILVFDGCTLP SKKEVERSR RERRQANLLKGKQLLREGKVSE
ARECFTRSINITHAMAHKVIKAARSQGV DCLVAPYEADAQLAYLNKAGIVQAIITEDS
DLLAFGCKKVILKMDQFGNGLEIDQARLGMC RQLG DVFTEEEKFRYMCILSGCDYLSS
LRGIGLAKACKVLR LANNPDIVKVIKKIGHY LKMNITVPEDYINGFIRANNTFLYQLV
FDPIKRKLIPLNAYEDD VDPETLSYAGQYVDD SIALQIALGNKDINTFEQID DYNPDT
AMPAHSRSHSWDDKTCQKSANVSSI WHRNYSRPESGTVSDAPQLKENPSTVGVER
VISTKGLNLPRKSSIVKRPRSAELSEDDLLS QYSLSFTKKTKKNSSEG NKSLSFSEV FV
PDLVNGPTNKKSVSTPPRTRNKFATFLQRKNEESGAVVVP GTRSRFFC SSDSTDCVS
NKVSIQPLDETAVTDKENNLHESEYGDQEGKRLVD TDVARNSSDDIPNNHIPGDHIP
DKATVFTDEESYSFESSKFTRTISPPTLGT LRSCFSWSGGLGDFSRT PPSPPSTALQQF
RRKSDSPTSLPENNM SDVSQ LKSEESSDDESHPLREEACSSQS QESGEFSLQSSNASK
LSQCSSKDS DSEESDCNIKLLDSQSDQTSKLRLSHFSKKDTPLRNKVPGLYKSSSADS
LSTTKIKPLGPARASGLSKKPASI QKRKHHNAENKPGLQIKL NELWKNFGFKKF (配列
番号121)。

20

【0422】

エキソヌクレアーゼ1(EXO1)受託番号NM_006027(Homo sapiensエキソヌクレアーゼ1(EXO1)、転写産物バリエーション3)-アイソフォームB

MGIQGLLQFIKEASEPIHVRKYKGQVVAVD TYCWLHKGAIACA EK LAKGEPTDRYVG
FCMKFVNMLLSHG IKPILVFDGCTLP SKKEVERSR RERRQANLLKGKQLLREGKVSE
ARECFTRSINITHAMAHKVIKAARSQGV DCLVAPYEADAQLAYLNKAGIVQAIITEDS
DLLAFGCKKVILKMDQFGNGLEIDQARLGMC RQLG DVFTEEEKFRYMCILSGCDYLSS
LRGIGLAKACKVLR LANNPDIVKVIKKIGHY LKMNITVPEDYINGFIRANNTFLYQLV
FDPIKRKLIPLNAYEDD VDPETLSYAGQYVDD SIALQIALGNKDINTFEQID DYNPDT
AMPAHSRSHSWDDKTCQKSANVSSI WHRNYSRPESGTVSDAPQLKENPSTVGVER
VISTKGLNLPRKSSIVKRPRSAELSEDDLLS QYSLSFTKKTKKNSSEG NKSLSFSEV FV
PDLVNGPTNKKSVSTPPRTRNKFATFLQRKNEESGAVVVP GTRSRFFC SSDSTDCVS
NKVSIQPLDETAVTDKENNLHESEYGDQEGKRLVD TDVARNSSDDIPNNHIPGDHIP
DKATVFTDEESYSFESSKFTRTISPPTLGT LRSCFSWSGGLGDFSRT PPSPPSTALQQF
RRKSDSPTSLPENNM SDVSQ LKSEESSDDESHPLREEACSSQS QESGEFSLQSSNASK
LSQCSSKDS DSEESDCNIKLLDSQSDQTSKLRLSHFSKKDTPLRNKVPGLYKSSSADS
LSTTKIKPLGPARASGLSKKPASI QKRKHHNAENKPGLQIKL NELWKNFGFKKDSEK
LPPCKKPLSPVRDNIQLTPEAEEDIFNKPECGRVQRAIFQ (配列番号122)。

40

【0423】

エキソヌクレアーゼ1(EXO1)受託番号NM_001319224(Homo sapiensエキソヌクレアーゼ1(EXO1)、転写産物バリエーション4)-アイソフォームC

50

MGIQGLLQFIKEASEPIHVRKYKGQVVAVDTYCWLHKGAIAECAEKLAKGEPTDRYVG
FCMKFVNMLLSHGKIPILVFDGCTLPSKKEVERSRERRQANLLKGKQLLREGKVSE
ARECFTRSINITHAMAHKVIKAARSQGVDCLVAPYEADAQLAYLNKAGIVQAIITEDS
DLLAFGCKKVILKMDQFGNGLEIDQARLGMCRLGDVFTEEFKFRYMCILSGCDYLSS
LRGIGLAKACKVLRRLANNPDIVKVIKKIGHYLMKNITVPEDYINGFIRANNTFLYQLV
FDPIKRKLIPLNAYEDDVPETLSYAGQYVDDSIALLQIALGNKDINTFEQIDDPNPDT
AMPAHSRSHSWDDKTCQKSANVSSIWHNRNYSRPESGTVSDAPQLKENPSTVGVER
VISTKGLNLPRKSSIVKRPRSESEDDLLSQYSLSFTKKTKKNSSEGNKSLSFSEVFVP
DLVNGPTNKKSVSTPPRTRNKFATFLQRKNEESGAVVVPGTRSRFFCSDSDTDCVSN
KVSIIQPLDETAVTDKENNLHESEYGDQEGKRLVDTDVARNSSDDIPNNHIPGDHIPD
KATVFTDEESYSFESSKFTRTISPPTLTGLRSCFSWSGGLGDFSRTPSPSPSTALQQFR
RKSDSPTSLPENNMMSDVSQKSEESSDDESHPLREEACSSQSQESGEFSLQSSNASKL
SQCSSKSDSDSEESDCNIKLLDSQSDQTSKLRSLSHFSKKDTPLRNKVPGLYKSSSADSL
STTKIKPLGPARASGLSKKPASIQKRKHNAENKPGQLIKLNLWKNFGFKKDSEKL
PPCKKPLSPVRDNIQLTPEAEEDIFNKPECGRVQRAIFQ(配列番号123).

10

【0424】

D. インティンおよび分裂インティン

一部の態様において、(例として、AAV粒子を用いるin vivoのプライムエディターの送達)、ポリペプチド(例として、デアミナーゼまたはnapDNAbp)または融合タンパク質(例としてプライムエディター)をN末端の半分およびC末端の半分へと分裂し、それらを別個に送達し、次いでそれらの共局在が完全なタンパク質(または場合に応じて融合タンパク質)を細胞内で再形成することを許すことが有利であってもよいということは理解されるであろう。タンパク質または融合タンパク質の別個の半分同士は、それぞれが、タンパク質トランススプライシングの機序による完全なタンパク質または融合タンパク質の再形成を容易化するための分裂インティンタグを含んでもよい。

20

【0425】

分裂インティンによって触媒されるタンパク質トランススプライシングは、タンパク質ライゲーションのための全く酵素的な方法を提供する。分裂インティンは本質的には一続きのインティン(例としてミニインティン)であり、それぞれNインティンおよびCインティンという名称の2つのピースへと分裂されている。分裂インティンのNインティンおよびCインティンは、非共有結合的に会合して活性なインティンを形成し、一続きのインティンがするのと本質的に同じやり方でスプライシング反応を触媒し得る。分裂インティンは天然に見出され、実験室でもまた操作されている。本明細書において使用される場合、「分裂インティン」という用語は、1以上のペプチド結合切断がN末端およびC末端アミノ酸配列の間に存在するいずれかのインティンを指し、その結果、N末端およびC末端配列が別個の分子になり、これらは、トランススプライシング反応について機能的であるインティンへと非共有結合的に再会合または再構成し得る。いずれかの触媒的に活性なインティンまたはその断片が、本発明の方法への使用のための分裂インティンを導出するために用いられてもよい。例えば、一側面において、分裂インティンは真核生物インティンに由来されてもよい。別の側面では、分裂インティンは細菌インティンに由来されてもよい。別の側面では、分裂インティンは古細菌インティンに由来されてもよい。好ましくは、そのように導出された分裂インティンは、トランススプライシング反応を触媒することにとって必須のアミノ酸配列のみを所有するであろう。

30

40

【0426】

本明細書において使用される場合、「N末端分裂インティン(In)」は、トランススプライシング反応について機能的であるN末端アミノ酸配列を含むいずれかのインティン配列を指す。Inは、ゆえに、トランススプライシングが生起する場合にスプライスアウトされる配列をもまた含む。Inは、天然に存在するインティン配列のN末端部分の改変である配列を含み得る。例えば、このような追加のおよび/または突然変異した残基の包含がInをトランススプライシングにおいて非機能的にしない限り、Inは追加のアミノ酸残基お

50

よび/または突然変異した残基を含み得る。好ましくは、追加のおよび/または突然変異した残基の包含は、Inのトランススプライシング活性を改善または増強する。

【0427】

本明細書において使用される場合、「C末端分裂インテイン(Ic)」は、トランススプライシング反応について機能的であるC末端アミノ酸配列を含むいずれかのインテイン配列を指す。一側面において、Icは一続きの4〜7アミノ酸残基を含み、これらの少なくとも4アミノ酸はそれが由来されたインテイン最後のβ鎖からである。Icは、ゆえに、トランススプライシングが生起する場合にスプライスアウトされる配列をもまた含む。Icは、天然に存在するインテイン配列のC末端部分の改変である配列を含み得る。例えば、このような追加のおよび/または突然変異した残基の包含がInをトランススプライシングにおいて非機能的にしない限り、Icは追加のアミノ酸残基および/または突然変異した残基を含み得る。好ましくは、追加のおよび/または突然変異した残基の包含は、Icのトランススプライシング活性を改善または増強する。

10

【0428】

本発明の一部の態様において、IcまたはInに連結されたペプチドは、とりわけ蛍光基、ビオチン、ポリエチレングリコール(PEG)、アミノ酸アナログ、非天然のアミノ酸、リン酸基、グリコシル基、放射性同位体標識、および医薬分子を包含する追加の化学的部分を含み得る。他の態様において、Icに連結されたペプチドは、とりわけケトン、アルデヒド、Cys残基、およびLys残基を包含する1以上の化学反応性基を含み得る。「インテインスプライシングポリペプチド(ISP)」が存在する場合には、分裂インテインのNインテインおよびCインテインは非共有結合的に会合して活性なインテインを形成し、スプライシング反応を触媒し得る。本明細書において使用される場合、「インテインスプライシングポリペプチド(ISP)」は、Ic、In、または両方が分裂インテインから除去される場合に留まる分裂インテインのアミノ酸配列の部分の部分を指す。ある特定の態様において、InはISPを含む。別の態様において、IcはISPを含む。また別の態様において、ISPはInにもIcにも共有結合的に連結されていない別個のペプチドである。

20

【0429】

分裂インテインは、ミニインテインの構造上に見出される-12の保存されたベータ鎖間の構造化されていないループまたは介在アミノ酸配列中に1以上の分裂部位を操作することによって、一続きのインテインから作成されてもよい。分裂の作成が、タンパク質スプライシング活性が失われる十分な度合まではインテインの構造、特に構造化されたベータ鎖を遮断しないであろうという条件で、ベータ鎖間の領域内の分裂部位の位置のいくらかのフレキシビリティが存在してもよい。

30

【0430】

タンパク質トランススプライシングでは、1つの前駆体タンパク質はNインテインによって後続されるNエクステインパーツからなり、別の前駆体タンパク質はCエクステインパーツによって後続されるCインテインからなり、トランススプライシング反応(一緒にNおよびCインテインによって触媒される)が2つのインテイン配列を切除、2つのエクステイン配列をペプチド結合によって連結する。酵素反応であるタンパク質トランススプライシングは、非常に低い(例としてマイクロモル)濃度のタンパク質で働き得、生理条件下において実行され得る。

40

【0431】

例示の配列は以下の通りである:

【表 38-1】

名称	リガンド依存性インテインの配列
2-4 インテイン:	CLAEGRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAANKDGTLLARPVV SWFDQGTDRDVIGLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKG RVAGPGSGNSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEAS MMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLDQAHLLECAWLEI LMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLLDNRNQGKCVEGMVEIFDMLLAT SSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRA LDKITDTLIHLMAKAGLTQQQHQRQAQLLLILSHIRHMSNKGMEH LYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFADALDD KFLHDMLEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVVH NC (配列番号 124)
3-2 インテイン	CLAEGRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAANKDGTLLARPVVS WFDQGTDRDVIGLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDR VAGPGSGNSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASM MGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLDQAHLLECAWLEIL MIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLLDNRNQGKCVEGMVEIFDMLLATS SRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRA LDKITDTLIHLMAKAGLTQQQHQRQAQLLLILSHIRHMSNKGMEHL YSMKYTNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFADALDDK FLHDMLEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVVHN C (配列番号 125)
30R3-1 インテイン	CLAEGRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAANKDGTLLARPVV SWFDQGTDRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKG DRVAGPGSGNSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEA SMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLDQAHLLECAWL EILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLLDNRNQGKCVEGMVEIFDMLL ATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIH RALDKITDTLIHLMAKAGLTQQQHQRQAQLLLILSHIRHMSNKG MEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFADAL DDKFLHDMLEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC (配列番号 126)
30R3-2 インテイン	CLAEGRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAANKDGTLLARPVV SWFDQGTDRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKG DRVAGPGSGNSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEA SMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLDQAHLLECAWL EILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLLDNRNQGKCVEGMVEIFDMLL ATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIH RALDKITDTLIHLMAKAGLTQQQHQRQAQLLLILSHIRHMSNKG MEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFADAL DDKFLHDMLEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC (配列番号 127)
30R3-3 インテイン	CLAEGRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAANKDGTLLARPVV SWFDQGTDRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKG DRVAGPGSGNSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEA SMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLDQAHLLECAWL EILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLLDNRNQGKCVEGMVEIFDMIL ATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIH RALDKITDTLIHLMAKAGLTQQQHQRQAQLLLILSHIRHMSNKG MEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFADAL DDKFLHDMLEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VIINC (配列番号 128)

10

20

30

40

50

【表 3 8 - 2】

37R3-1 インティ ン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVA AAKDGTLLARPVV SWFDQGTRDVI GLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKG DRVAGPGGSGNSLALS LTADQMVSALLDAEPPILYSEYNPTSPFSEA SMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVP GFVDLT LHDQAHL LERAWL EILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLLDRNQ GKCV EGMVEIFDMLL ATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIH RALDKITDTLIHLMAGAGLT LQQQHQLAQLLLILSHIRHMSNKG M EHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFADAL DDKFLHDMLAEGLRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC (配列番号 129)
37R3-2 インティ ン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVA AAKDGTLLARPVV SWFDQGTRDVI GLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKG D RVAGPGGSGNSLALS LTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEAS MMGLLTNLADRELVHMINWAKRVP GFVDLT LHDQAHL LERAWLEI LMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLLDRNQ GKCV EGMVEIFDMLLAT SSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRA LDKITDTLIHLMAGAGLT LQQQHQLAQLLLILSHIRHMSNKGMEH LYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFADALDD KFLHDMLAEGLRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVVH NC (配列番号 130)
37R3-3 インティ ン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVA VAKDGTLLARPVVS WFDQGTRDVI GLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKG D RVAGPGGSGNSLALS LTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEAS MMGLLTNLADRELVHMINWAKRVP GFVDLT LHDQAHL LERAWLEI LMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLLDRNQ GKCV EGMVEIFDMLLAT SSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRA LDKITDTLIHLMAGAGLT LQQQHQLAQLLLILSHIRHMSNKGMEH LYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFADALDD KFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVVH NC (配列番号 131)

10

20

30

【0 4 3 2】

インティンは連続ドメインとして最も頻繁に見出すが、いくつかは自然に分裂された形態で存在する。この場合には、2つの断片は別個のポリペプチドとして発現され、スプライシングが起こる前に会合しなければならない、いわゆるタンパク質トランススプライシングである。

【0 4 3 3】

例示的な分裂インティンは、2つのサブユニット、すなわちDnaE-NおよびDnaE-Cを含むSsp DnaEインティンである。2つの異なるサブユニットは、DnaE-NおよびDnaE-Cサブユニットをそれぞれコードする別々の遺伝子、すなわちdnaE-nおよびdnaE-cによってコードされる。DnaEは、Synechocytis sp. PCC6803における天然に存在する分裂インティンであり、それぞれがDnaE-NまたはDnaE-Cのいずれかとの融合物を含む2つの別個のタンパク質のトランススプライシングを指示することができる。

40

【0 4 3 4】

追加の天然に存在するかまたは操作されたスプリットインティン配列は、本明細書に記載の全インティン配列または当技術分野で利用可能なものから公知であるか、または作製され得る。スプリットインティン配列の例は、Stevens et al., “A promiscuous split intein with expanded protein engineering applications,” PNAS, 2017, Vol. 114:8538-8543; Iwai et al., “Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from Nostoc punctiforme,” FEBS Lett, 580:1853-1858に見出され得、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)。追加の分

50

裂インテイン配列は、例えば、国際公開第2013/045632号、国際公開第2014/055782号、国際公開第2016/069774号、および欧州特許第2877490号に見出され得、それらの各々の内容は参照により本明細書に組み込まれる。

さらに、トランスでのタンパク質スプライシングがin vivoおよびin vitroで記載されており(Shingledecker, et al., *Gene* 207:187(1998), Southworth, et al., *EMBO J.* 17:918(1998); Mills, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:3543-3548(1998); Lew, et al., *J. Biol. Chem.*, 273:15887-15890(1998); Wu, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 35732:1(1998b), Yamazaki, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:5591(1998), Evans, et al., *J. Biol. Chem.* 275:9091(2000); Otomo, et al., *Biochemistry* 38:16040-16044(1999); Otomo, et al., *J. Biol. Mol. NMR* 14:105-114(1999); Scott, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13638-13643(1999))、続いてライゲーションを受けて機能的産物を形成する2つの不活性断片に関するタンパク質を発現する機会を提供する。

10

【0435】

RNA-タンパク質相互作用ドメイン

様々な態様において、2つの別個のタンパク質ドメイン(例として、Cas9ドメインおよびポリメラーゼドメイン)は、「RNA-タンパク質動員システム」、例えば「MS2タグ付け技術」を用いることによって、機能的な複合体(2つの別個のタンパク質ドメインを含む融合タンパク質の機能と同様)を形成するように互いに共局在させられてもよい。このようなシステムは、一般的には、1つのタンパク質ドメインを「RNA-タンパク質相互作用ドメイン」(「RNA-タンパク質動員ドメイン」としてもまた公知)によって、他をRNA-タンパク質相互作用ドメイン、例として特定のヘアピン構造を特異的に認識および結合する「RNA結合タンパク質」によってタグ付けする。これらの型のシステムは、プライムエディターのドメイン同士を共局在させるためにおよびUGIドメインなどの追加の機能性を多重フラッププライムエディターに動員するために活用され得る。1つの例では、MS2タグ付け技術は、ファージのゲノム上に存在するステムループまたはヘアピン構造、すなわち「MS2ヘアピン」とのMS2バクテリオファージコートタンパク質(「MCP」または「MS2cp」)の天然の相互作用に基づく。MS2ヘアピンのケースでは、それはMS2バクテリオファージコートタンパク質(MCP)によって認識および結合される。ゆえに、1つの例示的シナリオでは、デアミナーゼ-MS2融合体はCas9-MCP融合体を動員し得る。

20

30

【0436】

RNA-タンパク質相互作用の他のモジュールドメインの総説は、当技術分野において、例えば、Johansson et al., “RNA recognition by the MS2 phage coat protein,” *Sem Virol.*, 1997, Vol. 8(3):176-185; Delebecque et al., “Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies,” *Science*, 2011, Vol. 333:470-474; Mali et al., “Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering,” *Nat. Biotechnol.*, 2013, Vol. 31:833-838; および Zalatan et al., “Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds,” *Cell*, 2015, Vol. 160:339-350(それらの各々はその全体が参照されることによって本明細書に組み込まれる)において記載されている。他のシステムも、PCPタンパク質を特異的に動員するPP7ヘアピン、およびComタンパク質を特異的に動員する「com」ヘアピンを包含する。Zalatan et al.を参照されたい。

40

【0437】

MS2ヘアピン(すなわち、「MS2アプタマー」と呼ばれる)のヌクレオチド配列は以下: GCCAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGGGCC(配列番号144)である。

MCPまたはMS2cpのアミノ酸配列は、

GSASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISSNSRSQAYKVTCVSRQSSAQ
NRKYTIKVEVPKVATQTVGGEELPVAGWRSYLNMEITPIFATNSDCELIVKAMQGL
LKDGNPIPSAIAANSIY(配列番号145)

50

である。

【0438】

E. UGIドメイン

他の態様において、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターは、1つ以上のウラシルグリコシラーゼ阻害剤ドメインを含んでもよい。本明細書において用いられる用語「ウラシルグリコシラーゼ阻害剤(UGI)」または「UGIドメイン」は、ウラシルDNAグリコシラーゼ塩基除去修復酵素を阻害することができるタンパク質を指す。一部の態様において、UGIドメインは、野生型UGIまたは配列番号132で明示されるUGIを含む。一部の態様において、本明細書において提供されるUGIタンパク質は、UGIの断片、およびUGIまたはUGI断片に対して相同的なタンパク質を包含する。例えば、一部の態様において、UGIドメインは、配列番号132で明示されるアミノ酸配列の断片を含む。一部の態様において、UGI断片は、配列番号132で明示されるアミノ酸配列の少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも99.5%を含むアミノ酸配列を含む。一部の態様において、UGIは、配列番号132で明示されるアミノ酸配列に対して相同的なアミノ酸配列、または配列番号132で明示されるアミノ酸配列の断片に対して相同的なアミノ酸配列を含む。一部の態様において、UGIもしくはUGIの断片またはUGIもしくはUGI断片のホモログを含むタンパク質は、「UGIバリエーション」と呼ばれる。UGIバリエーションはUGIまたはその断片に対する同一性を共有する。例えば、UGIバリエーションは、野生型UGIまたは配列番号132で明示されるUGIと少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一、または少なくとも99.9%同一である。一部の態様において、UGIバリエーションは、断片が野生型UGIまたは配列番号132で明示されるUGIの対応する断片と少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一、または少なくとも99.9%であるようにして、UGIの断片を含む。一部の態様において、UGIは以下のアミノ酸配列を含む：

ウラシル-DNAグリコシラーゼ阻害剤：

```
>sp | P14739 | UNGI_BPPB2
MTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLL
TSDAPEYKPPWALVIQDSNGENKIKML(配列番号132)。
```

【0439】

本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターは1より多くのUGIドメインを含んでもよく、これらは本明細書に記載の1つ以上のリンカーによって分離されてもよい。

【0440】

F. 追加のPEエレメント

ある特定の態様において、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターは塩基修復の阻害剤を含んでもよい。用語「塩基修復の阻害剤」または「IBR」は、核酸修復酵素、例えば塩基除去修復酵素の活性を阻害することができるタンパク質を指す。一部の態様において、IBRはOGG塩基除去修復の阻害剤である。一部の態様において、IBRは塩基除去修復の阻害剤(「iBER」)である。塩基除去修復の例示の阻害剤は、APE1、Endo III、Endo IV、Endo V、Endo VIII、Fpg、hOGG1、hNEI L1、T7 Endo I、T4PDG、UDG、hSMUG1、およびhAAGの阻害剤を包含する。一部の態様において、IBRはEndo VまたはhAAGの阻害剤である。一部の態様において、IBRは、触媒的に不活性なグリコシラーゼまたは触媒的に不活性なジオキシゲナーゼ、またはオキシダーゼの低分子もしくはペプチド阻害剤、あるいはそれらのバリエーションであって

もよいiBERである。一部の態様において、IBRは、TDG阻害剤、MBD4阻害剤、またはAlkBH酵素の阻害剤であってもよいiBERである。一部の態様において、IBRは、触媒的に不活性なTDGまたは触媒的に不活性なMBD4を含むiBERである。例示の触媒的に不活性なTDGは配列番号136(ヒトTDG)のN140A突然変異体である。

【0441】

いくつかの例示のグリコシラーゼは下で提供される。これらのグリコシラーゼドメインのいずれかの触媒的に不活性化されたバリエーションは、本開示で提供される方法および組成物において利用されるプライムエディターのnapDNAbpまたはポリメラーゼドメインに融合されてもよいiBERである。

【0442】

OGG(ヒト)

MPARALLPRRMGHRRLASTPALWASIPCRSELRLDLVLPSPGQSFRWREQSPAHS
GVLADQVWTLTQTEELHCTVYRGDKSQASRPTPDELEAVRKYFQLDVTLAQLYHH
WGSVDSHFQEVAQKFQGVRLLRQDPIECLFSFICSSNNNIARITGMVERLCQAFGPR
LIQLDDVTYHGFPSLQALAGPEVEAHLRKLGLGYRARYVSASARAILEEQGGLAWLQ
QLRESSYEEAHKALCILPGVGTKVADCICLMALDKPQAVPVDVHMWHIAQRDYSW
HPTTSQAKGPSPQTNKELGNFFRSLWGPYAGWAQAVLFSADLRQSRHAQEPPAKRR
KGSKGPEG(配列番号133)

【0443】

MPG(ヒト)

MVTPALQMKPKQFCRRMGQKKQRPARGQPHSSSDAAQAPAEQPHSSSDAAQAP
CPRERCLGPPTTPGPYRSIYFSSPKGHLTRLGLEFFDQPAVPLARAFLGQVLVRRLPN
GTELGRIVETEAYLGPEDAAHSRGGRTPRNRGMFMKPGTLYVYIIYGMFYFCMNI
SSQGDGACVLLRALEPLEGLETMRQLRSTLRKGTASRVLKDRELCSGPSKLCQALAI
NKSFDQRDLAQDEAVWLERGPLEPSEPAVVAAARVGVGHAGEWARKPLRFYVRGSP
WVSVVDRVAEQDTQA(配列番号134)

【0444】

MBD4(ヒト)

MGTTGLESLSLGDRGAAPTVTSSERLVPDPPNDLRKEDVAMELERVGEDEEQMMIK
RSSECNPLLQEPIASAQFGATAGTECRKSVPCGWERVVKQRLFGKTAGRFDVYFISP
QGLKFRSKSSLANYLHKNGETSLKPEDFDFTVLSKRGIKSRYKDCSMAALTSHLQNQ
SNNSNWNLRTRSKCKKDVFMPPSSSELQESRGLSNFTSTHLLLKEDEGVDDVNFRK
VRKPKGKVITLKGPIKKTKKGCRKSCSGFVQSDSKRESVCNKADAESPEVAQKSQLD
RTVCISDAGACGETLSVTSEENSLVKKKERSLSSGSNFCSEQKTSGIINKFCSAKDSEH
NEKYEDTFLESEEIGTKVEVVERKEHLHTDILKRGSEMDNNCSPTRKDFTGEKIFQED
TIPRTQIERRKTSLYFSSKYNKEALSPRRKAFKKWTPPRSPFNLVQETLFHDPWKL
LIATIFLNRTSGKMAIPVLWKFLEKYPSAEVARTADWRDVSELLKPLGLYDLRAKTI
VKFSDEYLTKQWKYPIELHGIGKYGNDSYRIFCVNEWKQVHPEDHKLNKYHDWLW
ENHEKLSLS(配列番号135)

TDG(ヒト)

MEAENAGSYSLQQAQAFYTFPFQQLMAEAPNMAVVNEQQMPPEVPAPAPAQEPVQ
EAPKGRKRKPRTEPKQPVPEPKPVESKSGKSAKSKEKQEKITDTFKVVRKVDRFN
GVSEAELLTKTLPDILTFNLDIVIIGINPGLMAAYKGHHYPGPGNHFWKCLFMSGLS
EVQLNHMDDH TLPGKYGIGFTNMVERTTPGSKDLSSKEFREGRILVQKLQKYQPRI
AVFNGKCIYEIFSKEVFGVKVKNLEFGLQPHKIPDTETLCYVMPSSSARCAQFPRAQD
KVHYYIKLKLDRDQLKGIERNMDVQEVQYTFDLQLAQEDAKKMAVKEEKYDPGYEA
AYGGAYGENPCSSPEPCGFSSNGLIESVELRGESAFSGIPNGQWMTQSFTDQIPSFNSH
CGTQEQUEEESHA(配列番号136)

【0445】

一部の態様において、本明細書に記載の融合タンパク質は1以上の異種タンパク質ドメ

10

20

30

40

50

インを含んでもよい(例として、プライムエディター構成要素に加えて、約または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のまたはそれよりも多くのドメイン)。融合タンパク質は、いずれかの追加のタンパク質配列と、任意に、いずれかの2つのドメイン間のリンカー配列とを含んでもよい。存在してもよい他の例示の特色は、局在配列、例えば細胞質局在配列、搬出配列、例えば核搬出配列、または他の局在配列、および融合タンパク質の可溶化、精製、または検出に有用である配列タグである。

【0446】

プライムエディターまたはその構成要素(例として、napDNAbpドメイン、ポリメラーゼドメイン、またはNLSドメイン)に融合されてもよいタンパク質ドメインの例は、限定されないが、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。エピトープタグの限定しない例はヒスチジン(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)を包含する自家蛍光タンパク質を包含するが、これらに限定されない。プライムエディターは、DNA分子に結合または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断片をコードする遺伝子配列に融合されてもよく、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 D

10

20

【0447】

本開示のある側面では、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)を包含する自家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、遺伝子産物の発現の変更または改変を測定するためのマーカーとしての用をなす遺伝子産物をコードするように、細胞に導入されてもよい。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させられる。

30

【0448】

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、ヒスチジンタグまたはHisタグともまた呼ばれるポリヒスチジンタグ、マルトース結合タンパク質(MBP)タグ、nusタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)タグ、緑色蛍光タンパク質(GFP)タグ、チオレドキシンタグ、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、FlAsH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とって明らかであろう。一部の態様において、融合タンパク質は1以上のHisタグを含む。

40

【0449】

本開示の一部の態様において、PEシステムの発現される構成要素の滞留時間、量、および/または活性を調整することによって、プライム編集システムの活性は時間的に制御されてもよい。例えば、本明細書に記載のPEは、PEの細胞内半減期を改変することができるタンパク質ドメインと融合されてもよい。2以上のベクターを伴うある種の態様(例として、本明細書に記載の構成要素が2以上の別個のベクター上にコードされるベクター

50

システム)において、PEシステムの活性は、ベクターが送達されるタイミングをコントロールすることによって時間的に制御されてもよい。例えば、一部の態様において、鋳型をコードするベクターに先行して、ヌクレアーゼシステムをコードするベクターがPEを送達してもよい。他の態様において、PEシステムをコードするベクターに先行して、PEgRNAをコードするベクターはガイドを送達してもよい。一部の態様において、PEシステムおよびPEgRNAをコードするベクターが同時に送達される。ある特定の態様において、同時に送達されるベクターは、例としてPE、PEgRNA、および/または第2の鎖ガイドRNA構成要素を時間的に送達する。さらなる態様において、ベクター上のコード配列から転写されるRNA(例として、例えばヌクレアーゼ転写物)は、さらに、RNAの細胞内半減期を改変および/または翻訳コントロールを調節することができる少なくとも1つのエレメントを含んでもよい。一部の態様において、RNAの半減期は増大させられてもよい。一部の態様において、RNAの半減期は減少させられてもよい。一部の態様において、エレメントはRNAの安定性を増大させることができてもよい。一部の態様において、エレメントはRNAの安定性を減少させることができてもよい。一部の態様において、エレメントはRNAの3'UTR内にあってもよい。一部の態様において、エレメントはポリアデニル化シグナル(PA)を包含してもよい。一部の態様において、エレメントは、キャップ、例として上流のmRNAまたはPEgRNA端を包含してもよい。一部の態様において、RNAはPAを含まなくてもよく、その結果、それは転写後に細胞内でより迅速な分解を受ける。一部の態様において、エレメントは少なくとも1つのAUリッチエレメント(ARE)を包含してもよい。組織型、細胞型、タイミング、細胞局在、および環境に依存する様式で、AREはARE結合タンパク質(ARE-BP)によって結合されてもよい。一部の態様において、不安定化エレメントがRNA崩壊を促進、RNA安定性に影響、または翻訳を活性化してもよい。一部の態様において、AREは長さが50~150ヌクレオチドを含んでもよい。一部の態様において、AREは少なくとも1コピーの配列AUUUAを含んでもよい。一部の態様において、少なくとも1つのAREがRNAの3'UTRに追加されてもよい。一部の態様において、エレメントはウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)であってもよい。

10

20

30

40

【0450】

転写物からの発現を増強するための三次構造を作成する転写後制御エレメント(WPRE)。さらなる態様において、エレメントは、転写物からの発現を増強することができる改変および/または短縮されたWPRE配列であり、例えばZufferey et al., J Virol, 73(4): 2886-92(1999)およびFlajolet et al., J Virol, 72(7):6175-80(1998)に記載されている通りである。一部の態様において、WPREまたは等価物はRNAの3'UTRに追加されてもよい。一部の態様において、エレメントは、高速でまたは低速で崩壊する転写物どちらかに濃縮された他のRNA配列モチーフから選択されてもよい。

一部の態様において、PEまたはPEgRNAをコードするベクターは、PEシステムによるベクター上に存在する標的配列の切断によって自己破壊されてもよい。切断はベクターからのPEまたはPEgRNAの連続した転写を防止してもよい。転写は直線化されたベクター上において何らかの時間量にわたって生起してもよいが、細胞内分解を受ける発現された転写物またはタンパク質は、コードするベクターの発現からの連続した供給なしには、オフターゲット効果を生ずるためのより少ない時間を有するであろう。

【0451】

PEgRNAs

本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライム編集システムは、いずれかの好適なPEgRNAの使用を意図する。

【0452】

PEgRNA構成

一部の態様において、本明細書において開示される方法および組成物において利用されるプライム編集システムで使用可能な伸長ガイドRNAによって、従来のガイドRNAは、約20ntのプロトスペーサー配列と、napDNAbpと結合するgRNAコア領域とを包含する。この態様において、ガイドRNAは、5'端にて伸長されたRNAセグメント、すなわち、

50

5'伸長を包含する。この態様において、5'伸長は、逆転写鋳型配列、逆転写プライマー結合部位、および任意の5～20ヌクレオチドリンカー配列を包含する。RTプライマー結合部位はニックの後に形成される遊離3'末端とハイブリダイズし、Rループの非標的鎖に形成され、これによって5'-3'方向におけるDNA重合のために逆転写酵素をプライムする。

【0453】

別の態様において、本明細書において開示される方法および組成物において利用されるプライム編集システムで使用可能な伸長ガイドRNAによって、従来のガイドRNAは、約20ntのプロトスペーサー配列と、napDNAbpと結合するgRNAコアとを包含する。この態様において、ガイドRNAは、3'末にて伸長されたRNAセグメント、すなわち、3'伸長を包含する。この態様において、3'伸長は、逆転写鋳型配列および逆転写プライマー結合部位を包含する。RTプライマー結合部位はニックの後に形成される遊離3'末とハイブリダイズし、Rループの非標的鎖に形成され、これによって5'-3'方向におけるDNA重合のために逆転写酵素をプライムする。

【0454】

別の態様において、本明細書において開示される方法および組成物において利用されるプライム編集システムで使用可能な伸長ガイドRNAによって、従来のガイドRNAは、約20ntのプロトスペーサー配列と、napDNAbpと結合するgRNAコアとを包含する。この態様において、ガイドRNAは、gRNAコア内の分子間のある位置にて伸長されたRNAセグメント、すなわち、分子内伸長を包含する。この態様において、分子内伸長は、逆転写鋳型配列および逆転写プライマー結合部位を包含する。RTプライマー結合部位はニックの後に形成される遊離3'末とハイブリダイズし、Rループの非標的鎖に形成され、これによって5'-3'方向におけるDNA重合のために逆転写酵素をプライムする。

【0455】

一態様において、分子間RNA伸長の位置は、ガイドRNAのプロトスペーサー配列中にはない。別の態様において、分子間RNA伸長の位置は、gRNAコア中にある。また別の態様において、分子間RNA伸長の位置は、プロトスペーサー配列内を除きガイドRNA分子内のどこにでも、またはプロトスペーサー配列を妨害しない位置にある。

一態様において、分子間RNA伸長は、プロトスペーサー配列の3'末端の下流に挿入される。別の態様において、分子間RNA伸長は、プロトスペーサー配列の3'末端の、少なくとも1ヌクレオチド、少なくとも2ヌクレオチド、少なくとも3ヌクレオチド、少なくとも4ヌクレオチド、少なくとも5ヌクレオチド、少なくとも6ヌクレオチド、少なくとも7ヌクレオチド、少なくとも8ヌクレオチド、少なくとも9ヌクレオチド、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも11ヌクレオチド、少なくとも12ヌクレオチド、少なくとも13ヌクレオチド、少なくとも14ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも16ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも18ヌクレオチド、少なくとも19ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも21ヌクレオチド、少なくとも22ヌクレオチド、少なくとも23ヌクレオチド、少なくとも24ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド下流に挿入される。

【0456】

他の態様において、分子間RNA伸長は、gRNAに挿入され、Cas9タンパク質またはその等価物(すなわち、異なるnapDNAbp)と結合および/または相互作用する、tracrRNAに対応するまたはtracrRNAを含むガイドRNAの部分を目指す。好ましくは、分子間RNA伸長の挿入は、tracrRNA部分とnapDNAbpとの間の相互作用を破壊しないか、または最小限に破壊する。

【0457】

RNA伸長の長さ(少なくともRT鋳型およびプライマー結合部位を包含する)は、いずれかの有用な長さであり得る。様々な態様において、RNA伸長は、少なくとも5ヌクレオチド、少なくとも6ヌクレオチド、少なくとも7ヌクレオチド、少なくとも8ヌクレオチド、少なくとも9ヌクレオチド、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも11ヌクレオチド

10

20

30

40

50

50

50

50

RT鋳型配列は、ある特定の態様において、一本鎖DNA分子をコードするが、これは、非標的鎖と相同である(よって、標的鎖の対応する部位に相補的である)が1以上のヌクレオチド変化を包含する。少なくとも1ヌクレオチド変化は、1以上の単一塩基ヌクレオチド変化、1以上の欠失、および1以上の挿入を包含していてもよい。

【0462】

RT鋳型配列の合成された一本鎖DNA産物は、非標的鎖と相同であって、1つ以上のヌクレオチド変化を含有する。RT鋳型配列の一本鎖DNA産物は、平衡状態で、相補的な標的鎖配列とハイブリダイズし、これによって相同の内在性標的鎖配列に取って代わる。取って代わられた内在性鎖は、一部の態様において、5'内在性DNAフラップ種として言及されてもよい。この5'内在性DNAフラップ種は、5'フラップエンドヌクレアーゼ(例として、FEN1)によって除去され得、一本鎖DNA産物は、今や内在性標的鎖とハイブリダイズされており、ライゲートされて内在性配列と新しく合成された鎖との間にミスマッチを作成してもよい。ミスマッチは、細胞固有のDNA修復および/または複製プロセスによって分解されてもよい。

10

【0463】

様々な態様において、RT鋳型配列のヌクレオチド配列は、5'フラップ種と取って代わられ、かつ編集されるべき部位と重複する、非標的鎖のヌクレオチド配列に対応する。

【0464】

伸長ガイドRNAの様々な態様において、逆転写鋳型配列は、ニック部位に隣接する内在性DNA配列に相補的な一本鎖DNAフラップをコードしていてもよく、ここで一本鎖DNAフラップは、所望のヌクレオチド変化を含む。一本鎖DNAフラップは、ニック部位にて内在性一本鎖DNAに取って代わってもよい。ニック部位にて取って代わられた内在性一本鎖DNAは、5'末を有し、内在性フラップを形成し得るが、これは細胞によって切除され得る。様々な態様において、5'末内在性フラップを除去することが、一本鎖3'DNAフラップの、対応する相補的なDNA鎖とのハイブリダイゼーション、および一本鎖3'DNAフラップが持つ所望のヌクレオチド変化の標的DNA中への組み込みまたは同化を促すため、5'末内在性フラップの切除は、産物形成を推進するのに役立ち得る。

20

【0465】

伸長ガイドRNAの様々な態様において、一本鎖DNAフラップの細胞修復は、所望のヌクレオチド変化のインストールをもたらす、これによって所望の産物を形成する。

30

【0466】

さらに他の態様において、所望のヌクレオチド変化は、ニック部位の約-5~+5の間、またはニック部位の約-10~+10の間、またはニック部位の約-20~+20の間、またはニック部位の約-30~+30の間、またはニック部位の約-40~+40の間、またはニック部位の約-50~+50の間、またはニック部位の約-60~+60の間、またはニック部位の約-70~+70の間、またはニック部位の約-80~+80の間、またはニック部位の約-90~+90の間、またはニック部位の約-100~+100の間、またはニック部位の約-200~+200の間である編集窓上にインストールされる。

【0467】

他の態様において、所望のヌクレオチド変化は、ニック部位から約+1~+2、またはニック部位から約+1~+3、+1~+4、+1~+5、+1~+6、+1~+7、+1~+8、+1~+9、+1~+10、+1~+11、+1~+12、+1~+13、+1~+14、+1~+15、+1~+16、+1~+17、+1~+18、+1~+19、+1~+20、+1~+21、+1~+22、+1~+23、+1~+24、+1~+25、+1~+26、+1~+27、+1~+28、+1~+29、+1~+30、+1~+31、+1~+32、+1~+33、+1~+34、+1~+35、+1~+36、+1~+37、+1~+38、+1~+39、+1~+40、+1~+41、+1~+42、+1~+43、+1~+44、+1~+45、+1~+46、+1~+47、+1~+48、+1~+49、+1~+50、+1~+51、+1~+52、+1~+53、+1~+54、+1~+55、+1~+56、+1~+57、+1~+58、+1~+59、+1~+60、+1~+61、+1~+62、+1~+63、+1~+64、+1~+65、+1~+66、+1~

40

50

+67、+1～+68、+1～+69、+1～+70、+1～+71、+1～+72、+1～+73、+1～+74、+1～+75、+1～+76、+1～+77、+1～+78、+1～+79、+1～+80、+1～+81、+1～+82、+1～+83、+1～+84、+1～+85、+1～+86、+1～+87、+1～+88、+1～+89、+1～+90、+1～+90、+1～+91、+1～+92、+1～+93、+1～+94、+1～+95、+1～+96、+1～+97、+1～+98、+1～+99、+1～+100、+1～+101、+1～+102、+1～+103、+1～+104、+1～+105、+1～+106、+1～+107、+1～+108、+1～+109、+1～+110、+1～+111、+1～+112、+1～+113、+1～+114、+1～+115、+1～+116、+1～+117、+1～+118、+1～+119、+1～+120、+1～+121、+1～+122、+1～+123、+1～+124、または+1～+125の編集ウィンドウにインストールされる。

10

【0468】

さらに他の態様において、所望のヌクレオチド変化は、ニック部位から約+1～+2、またはニック部位から約+1～+5、+1～+10、+1～+15、+1～+20、+1～+25、+1～+30、+1～+35、+1～+40、+1～+45、+1～+50、+1～+55、+1～+100、+1～+105、+1～+110、+1～+115、+1～+120、+1～+125、+1～+130、+1～+135、+1～+140、+1～+145、+1～+150、+1～+155、+1～+160、+1～+165、+1～+170、+1～+175、+1～+180、+1～+185、+1～+190、+1～+195、または+1～+200の編集ウィンドウにインストールされる。

20

【0469】

様々な側面において、伸長ガイドRNAは、ガイドRNAの改変バージョンである。ガイドRNAは、天然に存在しても、コードする核酸から発現されても、または化学的に合成されてもよい。着目するゲノムの標的部位の標的鎖と相互作用してハイブリダイズするプロトスペーサー配列を包含する、ガイドRNAを入手またはそうでなければ合成するための方法、およびガイドRNAの適切な配列を決定するための方法は、当技術分野において周知である。

【0470】

様々な態様において、ガイドRNA配列の具体的な設計側面は、PAM配列の位置、標的配列中のパーセントG/C含量、マイクロ相同領域の程度、2次構造などの他の因子の中でも、着目するゲノム標的部位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)と、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライム編集システムに存在するnapDNAbpの型(例として、Cas9タンパク質)とに依存するであろう。

30

【0471】

一般に、ガイド配列は、標的ポリヌクレオチド配列との十分な相補性を有するいずれのポリヌクレオチド配列であって、標的配列とハイブリダイズし、かつnapDNAbp(例として、Cas9、Cas9ホモログ、またはCas9バリエーション)の標的配列への配列特異的結合に向けるものである。一部の態様において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアライメントアルゴリズムを使用して最適に整列されたとき、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%以上、またはこれらより高い。最適なアライメントは、配列を整列させるためのいずれか好適なアルゴリズムの使用で決定されてもよく、アルゴリズムの非限定例は、Smith-Watermanアルゴリズム、Needleman-Wunschアルゴリズム、Burrows-Wheeler Transform(例として、Burrows Wheeler Aligner)、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies)、ELAND(Illumina, San Diego, Calif.)、SOAP(soap.genomics.org.cnにて利用可能)、およびMaq(maq.sourceforge.netにて利用可能)に基づくアルゴリズムを包含する。一部の態様において、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、40、45、50、75ヌクレオチド以上であるか、またはこれらより長い。

40

50

【0472】

一部の態様において、ガイド配列は、長さが約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12ヌクレオチド未満であるか、またはこれらより短い。ガイド配列の、プライムエディターの標的配列への配列特異的結合に向ける能力は、いずれの好適なアッセイによっても査定されてもよい。例えば、プライムエディターの構成要素(試験されるべきガイド配列を包含する)は、本明細書において開示されるプライムエディターの構成要素をコードするベクターでのトランスフェクション、これに続く、本明細書に記載の通りのSurveyorアッセイなどによる標的配列内の優先的な切断の査定などによって、対応する標的配列を有する宿主細胞へ提供されてもよい。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は試験管中、標的配列、プライムエディターの構成要素(試験されるべきガイド配列を包含する)、および試験ガイド配列とは異なる制御ガイド配列を提供すること、ならびに試験ガイド配列とおよび制御ガイド配列との間の反応の、標的配列での結合または切断率を比較することによって、評価されてもよい。他のアッセイもなし得、当業者に思い当たるものであろう。

【0473】

ガイド配列は、いずれの標的配列をも標的にするのに選択されてもよい。一部の態様において、標的配列は、細胞のゲノム内の配列である。例示の標的配列は、標的ゲノム中にユニークな配列を包含する。例えば、*S.pyogenes* Cas9について、ゲノム中の固有の標的配列は、形態MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXGG(配列番号298)のCas9標的部位を包含していてもよく、ここでNNNNNNNNNNNNNNXGGを含む部分では、NはA、G、T、またはCであり;およびXはいずれであってもよい。ゲノム中の固有の標的配列は、形態MMMMMMMMMMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXGG(配列番号299)の*S.pyogenes* Cas9標的部位を包含していてもよく、ここでNNNNNNNNNNNNNNXGGを含む部分では、NはA、G、T、またはCであり;およびXはいずれであってもよい。*S.thermophilus* CRISPR 1 Cas9の場合、ゲノム中の固有の標的配列は、形態MMMMMMMMMMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXXAGAAW(配列番号300)のCas9標的部位を含み得、NNNNNNNNNNNNNNXXAGAAWを含む部分では、NはA、G、T、またはCであり;Xはいずれであってもよく;およびWはAまたはTである。ゲノム中の固有の標的配列は、形態MMMMMMMMMMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXXAGAAW(配列番号301)の*S.thermophilus* CRISPR 1 Cas9標的部位を含み得、ここで、NNNNNNNNNNNNNNXXAGAAWを含む部分では、NはA、G、T、またはCであり;Xはいずれであってもよく;およびWはAまたはTである。*S.pyogenes*のCas9の場合、ゲノム中の固有の標的配列は、形態MMMMMMMMMMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXGGXG(配列番号302)のCas9標的部位を含み得、NNNNNNNNNNNNNNXGGXGを含む部分では、NはA、G、TまたはCであり;およびXはいずれであってもよい。ゲノム中の固有の標的配列は、形態MMMMMMMMMMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXGGXG(配列番号303)の*S.pyogenes*のCas9標的部位を含み得、NNNNNNNNNNNNNNXGGXGを含む部分では、NはA、G、T、またはCであり;およびXはいずれであってもよい。これらの配列の各々において、「M」は、A、G、T、またはCであってもよく、配列を固有のものとして同定する際に考慮される必要はない。

【0474】

一部の態様において、ガイド配列は、ガイド配列内の2次構造の程度を低減するように選択される。2次構造は、いずれの好適なポリヌクレオチド折り畳みアルゴリズムによっても決定されてもよい。いくつかのプログラムは、最小限のギブス(Gibbs)自由エネルギーを算出することに基づく。このようなアルゴリズムの1つの例は、ZukerおよびStiegler(Nucleic Acids Res.9(1981),133-148)によって記載される通りの、mFoldである。別の例の折り畳みアルゴリズムは、重心構造予測アルゴリズムを使用する、ウィーン大学(University of Vienna)の理論化学研究所(Institute for Theoretical Chemistry)にて開発された、オンラインウェブサーバRNAfoldである(例として、A.R.Gruber et al.,2008,Cell 106(1):23-24;およびPA Carr and GM Church,2009,Nature Biotechnology 27(12):1151-62を参照されたい)。さらなるアルゴリズムは、

米国出願第61/836,080号;Broad参照BI-2013/004A)に見出されるものであってもよい(参照により本明細書に組み込まれる)。

【0475】

一般的に、tracrメイト配列は:(1)対応するtracr配列を含有する細胞におけるtracrメイト配列によってフランキングされるガイド配列の切除;および(2)標的配列における複合体の形成の1以上を促進するために、tracr配列との十分な相補性を有するいずれかの配列を包含し、複合体は、tracr配列にハイブリダイズしたtracrメイト配列を含む。一般的に、相補性の度合は、2つの配列の短い方の長さに沿って、tracrメイト配列およびtracr配列の最適なアライメントの参照によってである。最適な整列は、いずれの好適なアライメントアルゴリズムによっても決定されてもよく、さらにtracr配列またはtracrメイト配列のいずれかの配列内に自己相補性などの2次構造を構成していてもよい。一部の態様において、tracr配列とtracrメイト配列との間の相補性の程度は、その2つのより短い長さに沿って最適に整列されたとき、約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%以上、またはこれらより高い。一部の態様において、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、またはこれらより長い。一部の態様において、tracr配列およびtracrメイト配列は、その2つの間のハイブリダイゼーションがヘアピンなどの2次構造を有する転写産物を産生するように、単一転写産物内に含有される。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も、代替の配列になり得るよう使用されてもよい。配列は、好ましくは、ヌクレオチドトリプレット(例えば、AAA)、および追加のヌクレオチド(例えば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。本発明の態様において、転写産物または転写されたポリヌクレオチド配列は、少なくとも2つの、またはそれより多くのヘアピンを有する。好ましい態様において、転写産物は、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、転写産物は、最大でも5つのヘアピンを有する。一部の態様において、単一の転写産物はさらに、転写終止配列を包含する;好ましくは、これは、ポリT配列、例えば6つのTヌクレオチドを包含する。ガイド配列、tracrメイト配列、およびtracr配列を含む単一ポリヌクレオチドのさらなる非限定例は、以下の通りであるが(5'から3'に列挙)、ここで「N」は、ガイド配列の塩基を表し、第1ブロックの小文字は、tracrブロック配列を表し、および第2ブロックの小文字は、tracr配列を表し、および最後のポリT配列は、転写ターミネーターを表す:

(1)NNNNNNNNNGTTTTTGTACTCTCAAGATTTAGAAATAAATCTTGCAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTTATGGCAGGGTGTTTTCGTTATTTAATTTTTTT(配列番号137);

(2)NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTTGTACTCTCAGAAATGCAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTTATGGCAGGGTGTTTTTCGTATTTAATTTTTTT(配列番号138);

(3)NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTTGTACTCTCAGAAATGCAGAAGCTACAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTTATGGCAGGGTGTTTTTT(配列番号139);

(4)NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGCCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT(配列番号140);

(5)NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGTTTTTTTT(配列番号141);および

(6)NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCATTTTTTTTTT(配列番号142)。

【0476】

一部の態様において、配列(1)~(3)は、*S.thermophilus* CRISPR1からのCas9と組み合わせて使用される。一部の態様において、配列(4)~(6)は、*S.pyogenes*からのCas9と組み合わせて使用される。一部の態様において、tracr配列は、tracrメイト配列を含む転写産物とは別々の転写産物である。

【0477】

Cas9ドメインと一本鎖DNA結合タンパク質を含む本明細書に開示の通りの融合タンパク質のいずれも、標的部位(例として、編集されるべき点突然変異を含む部位)に対して、標的にさせるために、典型的には、融合タンパク質をガイドRNA(例として、sgRNA)と一緒に共発現させることが必要であることは、当業者にとって明らかであろう。本明細書中、他のどこかでより詳細に説明される通り、ガイドRNAは、典型的には、Cas9結合を可能にさせるtracrRNAフレームワークと、配列特異性をCas9:核酸編集酵素/ドメイン融合タンパク質へ付与するガイド配列とを含む。

【0478】

一部の態様において、ガイドRNAは、構造5'-[ガイド配列]-GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUU-3'(配列番号143)を含み、ここでガイド配列は、標的配列に相補的な配列を含む。ガイド配列は、典型的には20ヌクレオチド長である。Cas9:核酸編集酵素/ドメイン融合タンパク質を特定のゲノム標的部位に対して標的にさせるための好適なガイドRNAの配列は、本開示に基づき当業者に明らかであろう。このような好適なガイドRNA配列は、典型的には、編集されるべき標的ヌクレオチドから50ヌクレオチド以内上流または下流の核酸配列に相補的なガイド配列を含む。提供される融合タンパク質に、特定の標的配列を標的にさせるのに好適なくつかの例示のガイドRNA配列は、本明細書において提供される。追加のガイド配列は、当技術分野において周知であり、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライムエディターと共に使用され得る。

【0479】

一部の態様において、PEgRNAは、5'から3'方向に並べられた3つの主要な構成成分エレメント、すなわち、スパーサー、gRNAコア、および3'末端の伸長アームを含む。伸長アームは、5'から3'方向の以下の構造エレメント、すなわちプライマー結合部位(A)、編集鑄型(B)、および相同アーム(C)にさらに分割され得る。さらに、PEgRNAは、任意の3'末端改変領域(e1)および任意の5'端改変領域(e2)を含んでもよい。さらに、PEgRNAは、PEgRNAの3'末端に転写終結シグナルを含んでもよい(図示せず)。これらの構造エレメントは、本明細書においてさらに定義される。PEgRNAの構造の描写は、限定することを意味するものではなく、エレメントの配置のバリエーションを包含する。例えば、任意の配列改変因子(e1)および(e2)は、3'末端および5'末端に位置することに限定されず、示されている他の領域のいずれかの中または間に配置され得る。

【0480】

一部の態様において、PEgRNAは、本明細書において企図され、例2で定義された方法に従って設計されてもよい。PEgRNAは、5'から3'方向に並べられた3つの主要な構成成分エレメント、すなわち、スパーサー、gRNAコア、および3'末端の伸長アームを含む。伸長アームは、5'から3'方向の以下の構造エレメント、すなわちプライマー結合部位(A)、編集鑄型(B)、および相同アーム(C)にさらに分割され得る。さらに、PEgRNAは、任意の3'末端改変領域(e1)および任意の5'端改変領域(e2)を含んでもよい。さらに、PEgRNAは、PEgRNAの3'末端上に転写終結シグナルを含んでもよい(図示せず)。これらの構造エレメントは、本明細書においてさらに定義される。PEgRNAの構造の描写は、限定することを意味するものではなく、エレメントの配置のバリエーションを包含する。例えば、任意の配列改変因子(e1)および(e2)は、3'末端および5'末端に位置することに限定されず、示されている他の領域のいずれかの中または間に配置され得る。

【0481】

PEgRNA改変

PEgRNAはまた、PEgRNAの特性および/または特徴を変更してもよく、それによってプライム編集の有効性を改善する追加の設計改変を包含してもよい。様々な態様において、これらの改変は、(1)面倒な配列要件なしにより長いPEgRNAの発現を可能にする、非ポリメラーゼIII(pol III)プロモーターからの機能性PEgRNAの効率的な発現を可能にする設計;(2)有効性を改善し得るコア、Cas9結合PEgRNA足場に対する改変;(3)RTプロセス性を改善し、標的ゲノム遺伝子座でのより長い配列の挿入を可能にするためのPEgRNAへの改変;(4)PEgRNAの安定性を改善し、RTプロセス性を増強し、PEgRNAのミスフォールディングを防止し、またはゲノム編集に重要な追加の因子を動員するRNAモチーフの、PEgRNAの5'または3'末端への付加を包含するがこれらに限定されない、多数の異なるカテゴリーの1つ以上に属してもよい。

10

【0482】

一態様において、より大きな伸長アームを有するより長さの長いpegRNAの発現を改善するために、pol IIIプロモーターを用いてpegRNAが設計され得た。sgRNAは、典型的には、U6 snRNAプロモーターから発現される。このプロモーターは、pol IIIを動員して関連するRNAを発現させ、核内に保持される短いRNAの発現に有用である。しかし、pol IIIは高度にプロセシブではなく、効率的なゲノム編集に必要なレベルで数百ヌクレオチド長よりも長いRNAを発現することができない。さらに、pol IIIは、Uのストレッチで失速または終結し得、PEgRNAを使用して挿入され得た配列多様性を潜在的に制限する。ポリメラーゼII(pCMVなど)またはポリメラーゼI(U1 snRNAプロモーターなど)を動員する他のプロモーターは、より長いsgRNAを発現する能力について調べられている。しかしながら、これらのプロモーターは、典型的には部分的に転写され、発現されたPEgRNA中のスペーサーの余分な配列5'をもたらす、これにより、部位依存的にCas9:sgRNA活性が著しく低下することが示されている。さらに、pol III転写されたPEgRNAは、6~7Uの連続で単純に終結し得るが、pol IIまたはpol Iから転写されたPEgRNAは、異なる終結シグナルを必要とするであろう。多くの場合、このようなシグナルはまた、核からPEgRNAの望ましくない輸送をもたらすポリアデニル化をもたらす。同様に、pCMVなどのpol IIプロモーターから発現されるRNAは、典型的には5'キャップされ、その核外輸送ももたらす。

20

【0483】

以前に、Rinnおよび共同研究者らは、長鎖非コードRNA-(lncRNA)タグ付きsgRNAの産生のために様々な発現プラットフォームをスクリーニングした¹⁸³。これらのプラットフォームは、pCMVから発現され、ヒト由来のMALAT1 ncRNA由来のENEエレメント¹⁸⁴、KSHV由来のPAN ENEエレメント¹⁸⁵、またはU1 snRNA由来の3'ボックス¹⁸⁶で終結するRNAを包含する。注意すべきことに、MALAT1 ncRNAおよびPAN ENEは、ポリAテールを保護する三重らせんを形成する^{184,187}。これらの構築物はまた、RNA安定性を高め得た。これらの発現システムは、より長いPEgRNAの発現も可能にすることが企図される。

30

【0484】

さらに、PEgRNAの一部として転写されることになるpol IIプロモーターの部分を切断するための一連の方法が設計されており、ハンマーヘッド¹⁸⁸、ピストル¹⁸⁹、ハチエット¹⁸⁹、ヘアピン¹⁹⁰、VS¹⁹¹、ツイスター¹⁹²、もしくはツイスターシスター¹⁹²リボザイムなどの自己切断リボザイム、または転写されたガイドを処理するための他の自己切断エレメント、またはCsy4¹⁹³によって認識され、ガイドの処理にもつながるヘアピンのいずれかを付加する。また、KSHV PAN RNAおよびエレメントについて以前に実証されたように、複数のENEモチーフの組み込みがPEgRNA発現および安定性の改善をもたらす得ると仮定される¹⁸⁵。環状イントロンRNA(ciRNA)の形態のPEgRNAを環状化することはまた、RNA発現および安定性の増強ならびに核局在化をもたらす得ることも予想される¹⁹⁴。

40

様々な態様において、PEgRNAは、以下の配列によって例示されるように、様々な上記エレメントを包含してもよい。

50

【0485】

非限定的な例1-pCMV、Csy4ヘアピン、PEgRNAおよびMALAT1 ENEからなるPEgRNA発現プラットフォーム

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
CGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC
AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTCTACTTGGCAGTACAT
CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATG
GGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATTTGACGTC
AATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGTTCACTGCCGTATAGGCAGGGCCAG
ACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
TATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGT
CTGTTTTAGGGTCATGAAGGTTTTTCTTTCTCTGAGAAAACAACACGTATTGTTTTT
TCAGGTTTTGCTTTTTTGGCCTTTTTCTAGCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAAAGATGC
TGGTGGTTGGCACTCCTGGTTTTCCAGGACGGGGTTCAAATCCCTGCGGCGTCTTTG
CTTTGACT(配列番号147)

10

20

【0486】

非限定的な例2-pCMV、Csy4ヘアピン、PEgRNAおよびPAN ENEからなるPEgRNA発現プラットフォーム

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
CGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC
AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTCTACTTGGCAGTACAT
CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATG
GGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATTTGACGTC
AATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGTTCACTGCCGTATAGGCAGGGCCAG
ACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
TATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGT
CTGTTTTGTTTTTGGCTGGGTTTTTCTTTGTTTCGCACCGGACACCTCCAGTGACCAGA
CGGCAAGGTTTTTATCCCAGTGTATATTGGAAAAACATGTTATACTTTTGACAATT
TAACGTGCCTAGAGCTCAAATTAACTAATAACCATAACGTAATGCAACTTACAACA
TAAATAAAGGTCAATGTTTAATCCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA(配列番号148)

30

40

【0487】

非限定的な例3-pCMV、Csy4ヘアピン、PEgRNAおよび3xPAN ENEからなるPEgRNA発現プラットフォーム

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
CGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC
AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTCTACTTGGCAGTACAT
CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATG

50

GGCGTGGATAGCGGTTTGA CTACGGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTC
AATGGGAGTTTGT TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCGTTCACTGCCGTATAGGCAGGGCCCAG
ACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
TATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGT
CTGTTTTGTTTTGGCTGGGTTTTTCTTGTTCGCACCGGACACCTCCAGTGACCAGA
CGGCAAGGTTTTTATCCCAGTGTATATTGGAAAAACATGTTATACTTTTGACAATT
TAACGTGCCTAGAGCTCAAATTAATACTAATACCATAACGTAATGCAACTTACAACA
TAAATAAAGGTCAATGTTTAATCCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAACACACTGTTT
TGGCTGGGTTTTTCTTGTTCGCACCGGACACCTCCAGTGACCAGACGGCAAGGTT
TTTATCCCAGTGTATATTGGAAAAACATGTTATACTTTTGACAATTTAACGTGCCT
AGAGCTCAAATTAATACTAATACCATAACGTAATGCAACTTACAACATAAATAAAGG
TCAATGTTTAATCCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCTCTCTGTTTTGGCTGGGTT
TTTCTTGTTCGCACCGGACACCTCCAGTGACCAGACGGCAAGGTTTTTATCCCAG
TGTATATTGGAAAAACATGTTATACTTTTGACAATTTAACGTGCCTAGAGCTCAA
TTAACTAATACCATAACGTAATGCAACTTACAACATAAATAAAGGTCAATGTTTA
ATCCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA(配列番号149)

10

【0488】

非限定的な例4-pCMV、Csy4ヘアピン、PEgRNAおよび3'boxからなるPEgRNA発現プラットフォーム

20

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
CGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC
AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACAT
CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATG
GGCGTGGATAGCGGTTTGA CTACGGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTC
AATGGGAGTTTGT TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCGTTCACTGCCGTATAGGCAGGGCCCAG
ACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
TATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGT
CTGTTTTGTTTCAAAGTAGACTGTACGCTAAGGGTCATATCTTTTTTTGTTTGGTTT
GTGTCTTGGTTGGCGTCTTAAA(配列番号150)

30

【0489】

非限定的な例5-pU1、Csy4ヘアピン、PEgRNAおよび3'boxからなるPEgRNA発現プラットフォーム

40

CTAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGGCGGGAGGGGAAAAAGGGA
GAGGCAGACGTCACCTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTTGAGTGG
CAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCACGGACAGGGCG
ACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGCTGCTTCGCCACTTGCTGCTTCAC
CACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTTCAGGACCGCTGATCGGAAGTGAG
AATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGGGAGTGCGCGGGGCAAGTGAC
CGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTGTGTGCGGGGCAGAGGCCCAAGATCT
CAGTTCACTGCCGTATAGGCAGGGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGA
AATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGT
CGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTGTTTTCAGCAAGTTCAGAGAAATCTG
AACTTGCTGGATTTTTTGGAGCAGGGAGATGGAATAGGAGCTTGCTCCGTCCACTCC

50

ACGCATCGACCTGGTATTGCAGTACCTCCAGGAACGGTGCACCCACTTTCTGGAGT
TTCAAAAGTAGACTGTACGCTAAGGGTCATATCTTTTTTTGTTTGGTTTGTGTCTTG
GTTGGCGTCTTAAA(配列番号151)。

【0490】

様々な他の態様において、足場またはコア配列に改変を導入することによって、PEgRNAが改善されてもよい。これは、既知の導入によって行われ得る。

コアであるCas9結合PEgRNA足場は、PE活性を増強するために改善され得る可能性が高い。いくつかのこのようなアプローチがすでに実証されている。例えば、足場(P1)の第1の対合エレメントは、GTTTT-AAAAC(配列番号146)対合エレメントを含有する。このようなTsの実行は、pol IIIの休止およびRNA転写物の早期終結をもたらすことが示されている。P1のこの部分におけるT-A対の1つのG-C対への合理的突然変異は、sgRNA活性を増強することが示されており、このアプローチがPEgRNAにも実行可能であることを示唆している¹⁹⁵。追加的に、P1の長さを増加させると、sgRNAフォールディングを増強し、活性を改善することも示されており¹⁹⁵、PEgRNA活性を改変するための別の手段を示唆している。コアの改変例としては、以下を包含し得る。

P1に対する6nt伸長を含有するPEgRNA

GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGCTCATGAAAATGAGCTAGCAAGT
TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTG
CCATCAAAGCGTGCTCAGTCTGTTTTTTT(配列番号152)

P1内のT-AからG-Cの突然変異を含有するPEgRNA

GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTGAGAGCTAGAAATAGCAAGTTTAAATAAGGCT
AGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGT
GCTCAGTCTGTTTTTTT(配列番号153)

【0491】

様々な他の態様において、PEgRNAは、編集テンプレート領域で改変され得る。PEgRNAによって鑄型化される挿入のサイズが増加するにつれて、それはエンドヌクレアーゼによって分解され、自発的加水分解を受け、またはRTによって逆転写され得ないかもしくはPEgRNA足場の折り畳みおよびその後のCas9-RT結合を破壊する二次構造に折り畳まれる可能性がより高い。したがって、遺伝子全体の挿入などの大きな挿入に影響を及ぼすために、PEgRNAの鑄型の改変が必要である可能性がある。そうするためのいくつかの戦略は、RNAを分解または加水分解に対してより耐性にするか、または阻害性二次構造を採用する可能性を低くする、合成または半合成PEgRNA内への改変ヌクレオチドの組み込みを包含する¹⁹⁶。このような改変は、グリッチ配列中のRNA二次構造を減少させる8-アザ-7-デアザグアノシン;分解を低減し、ある種のRNA二次構造を増強するロックド核酸(LNA);RNA安定性を高める2'-O-メチル、2'-フルオロまたは2'-O-メトキシエトキシ改変を包含し得た。このような改変はまた、安定性および活性を高めるために、PEgRNAの他の箇所に包含され得た。代替的または追加的に、PEgRNAの鑄型は、それが所望のタンパク質産物をコードし、RTによって展開されることができる単純な二次構造を採用する可能性も高くなるように設計され得る。このような単純な構造は熱力学的シンクとして作用し、逆転写を妨げるより複雑な構造が生じる可能性を低くする。最後に、鑄型を2つの別々のPEgRNAに分裂し得た。このような設計では、PEが使用されて転写を開始し、Cas9に融合したRNA結合タンパク質またはMS2アプタマーなどのPEgRNA自体のRNA認識エレメントを介して別個の鑄型RNAを標的部位に動員する。RTは、この別個の鑄型RNAに直接結合するか、または第2の鑄型に交換する前に元のPEgRNA上で逆転写を開始し得た。このようなアプローチは、長い鑄型の添加時のPEgRNAのミスフォールディングを防止すること、および、おそらくPEに基づく長い挿入を阻害し得る長い挿入が起こるためにゲノムからのCas9の解離を必要としないことの両方によって、長い挿入を可能にし得た。

【0492】

さらに他の態様において、PEgRNAは、PEgRNAの5'および3'末端に、またはさらに

はその間の位置(例として、gRNAコア領域、またはスパーサー)に追加のRNAモチーフを導入することによって改変されてもよい。KSHV由来のPAN ENEおよびMALAT1由来のENEなどのいくつかのこのようなモチーフは、非pol IIIプロモーター由来のより長いPEgRNAの発現を終結させる可能な手段として上に論じられた。これらのエレメントは、ポリAテールを包み込むRNA三重らせんを形成し、その結果、それらは核内に保持される^{184,187}。しかしながら、末端ヌクレオチドを閉塞するPEgRNAの3'末端に複雑な構造を形成することによって、これらの構造は、おそらく、PEgRNAのエキソヌクレアーゼ媒介性分解の防止にも役立つだろう。

【0493】

非pol IIIプロモーターからの終結を可能にすることなく、3'末端に挿入された他の構造エレメントもRNA安定性を高め得た。このようなモチーフは、3'末端を閉塞するヘアピンもしくはRNA四重鎖¹⁹⁷、または3'末端に2'-3'-環状リン酸の形成をもたらし、またPEgRNAをエキソヌクレアーゼによって分解されにくくする可能性があるHDVなどの自己切断リボザイムを包含し得た。¹⁹⁸不完全なスプライシングを介して環状化するように(circRNAを形成するように)PEgRNAを誘導することはまた、PEgRNAの安定性を高め、PEgRNAが核内に保持されるようにすることもできる¹⁹⁴。

追加のRNAモチーフはまた、RTプロセス性を改善するか、またはDNA-RNA二重鎖へのRT結合を増強することによってPEgRNA活性を増強し得た。RTによって結合された天然配列をその同族レトロウイルスゲノムに追加すると、RT活性を増強し得た¹⁹⁹。これには、天然プライマー結合部位(PBS)、ポリプリントラクト(PPT)、またはレトロウイルスゲノム二量体化および転写の開始を伴うキスループを包含し得た¹⁹⁹。

【0494】

PEgRNAの5'および3'末端に、キスループまたはGNRAテトラループ/テトラループ受容体ペアなどの二量体化モチーフを付加することも、PEgRNAの効果的な環状化をもたらし、安定性を改善し得た。追加的に、これらのモチーフの付加は、pegRNAスパーサーおよびプライマーの物理的分離、PE活性を妨げる可能性があるスパーサーの閉塞の防止を可能にし得ることが想定される。スパーサー領域またはプライマー結合部位に沿って小さな足がかりヘアピンを形成する、PEgRNAに対する短い5'伸長または3'伸長もまた、PEgRNAの長さに沿った、例としてスパーサーとプライマー結合部位との間の起こり得る相互作用に沿った、相補内領域のアニーリングに対して有利に競合し得た。最後に、また、キスループが使用されて、他の鋳型RNAをゲノム部位に動員し、一方のRNAから他方のRNAへのRT活性の交換を可能にし得た。示されているように、伸長アーム(すなわち、e1およびe2)の末端部分を包含する、PEgRNAのいずれかの領域に操作されてもよいいくつかの二次RNA構造。

例示的な改変は、以下に限定されないが、以下を包含する:

【0495】

PEgRNA-HDV融合

GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTGGGCCGGCATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATGCTTCGGCATGGCGAATGGGACTTTTTTTT(配列番号154)

【0496】

PEgRNA-MMLVキスループ

GGTGGGAGACGTCCCACCGGCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCTTCGACCGTGCTCAGTCTGGTGGGAGACGTCCCACCTTTT(配列番号155)

【0497】

PEgRNA-VSリボザイムのキスループ

GAGCAGCATGGCGTCGCTGCTCACGGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTA

GAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGA
GTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCTTCGACCGTGCTCAGTCTCCATCAGTTGACACCCT
GAGGTTTTTTTT(配列番号156)

【0498】

PEgRNA-GNRAテトラループ/テトラループ受容体

GCAGACCTAAGTGGUGACATATGGTCTGGGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGA
GCTAUACGTAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTUACGAAGTGGGA
CCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCTTCGACCGTGCTCAGTCTGCATGCGATTAG
AAATAATCGCATGTTTTTTTT(配列番号157)

【0499】

二次RNA-HDV融合を切り替えるPEgRNA鋳型

TCTGCCATCAAAGCTGCGACCGTGCTCAGTCTGGTGGGAGACGTCCCACCGGCCGG
CATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATGCTTCGGCATGGCGAA
TGGGACTTTTTTTT(配列番号158)

【0500】

SpCas9およびプライムエディター(PE)が改善された方法と類似の様式で、指向性進化によってPEgRNA足場がさらに改善され得た。指向性進化は、Cas9または進化したCas9バリエーションによるPEgRNA認識を増強し得た。追加的に、異なるPEgRNA足場配列が異なるゲノム遺伝子座で最適であり、問題の部位でPE活性を増強するか、オフターゲット活性を減少させるか、またはその両方である可能性が高い。最後に、他のRNAモチーフが付加されたPEgRNA足場の進化は、未進化の融合RNAと比較して、融合PEgRNAの活性をほぼ確実に改善するであろう。例えば、c-ジ-GMP-Iアプタマーおよびハンマーヘッド型リボザイムから構成されるアロステリックリボザイムの進化は、劇的に改善された活性をもたらした²⁰²、進化がハンマーヘッド-PEgRNA融合の活性も改善することを示唆した。加えて、Cas9は現在、sgRNAの5'伸長を一般に許容しないが、指向性進化は、この不耐性を緩和し、追加のRNAモチーフが利用されることを可能にする可能性のある突然変異を生成する可能性が高い。

本開示は、本明細書に開示される方法および組成物において利用されるプライム編集システムの有効性をさらに改善するためのいずれかのこのような方法を企図する。

【0501】

様々な態様において、Tの連続システム列は転写されるべきPEgRNAの能力を制限することもあるため、伸長アームからのTsの連続配列の出現を制限することが有利であってもよい。例えば、少なくとも連続した3つのT、少なくとも連続した4つのT、少なくとも連続した5つのT、少なくとも連続した6つのT、少なくとも連続した7つのT、少なくとも連続した8つのT、少なくとも連続した9つのT、少なくとも連続した10のT、少なくとも連続した11のT、少なくとも連続した12のT、少なくとも連続した13のT、少なくとも連続した14のT、または少なくとも連続した15のTのストリングは、PEgRNAを設計する場合に回避されるべきであり、または最終設計配列から少なくとも除去されるべきである。一態様において、連続するA:T核酸塩基対が豊富な標的部位を回避しながら、連続するTの望ましくないストリングがPEgRNA伸長アームに包含されることを回避し得る。

【0502】

キット、細胞、ベクター、および送達

キット

本開示の組成物は、キット中へ集められ得る。一部の態様において、キットは、本明細書に記載のプライムエディターの発現のための核酸ベクターを含む。他の態様において、キットはさらに、適切なガイドヌクレオチド配列(例として、PEgRNAおよび第2部位gRNA)、またはこのようなガイドヌクレオチド配列(Cas9タンパク質またはプライムエディターに所望の標的配列を標的にさせる)の発現のための核酸ベクターを含む。

【0503】

本明細書に記載のキットは、本明細書に記載の方法を実施するための構成要素および任

10

20

30

40

50

意に、使用のための指示を収納する1以上の容器を包含していてもよい。本明細書に記載のキットのいずれも、アッセイ方法を実施するのに必要とされる構成要素をさらに含んでもよい。キットの各構成要素は、適用可能であれば、液体形態(例として、溶液中)で、または固体形態(例として、乾燥粉末)で提供されてもよい。あるケースにおいて、構成要素のいくつかは、例えば、好適な溶媒または他の種(例えば、水)(これらはキットと共に提供されてもまたはされなくてもよい)の添加によって、再構成可能または別様に(例として、活性形態へ)処理可能であってもよい。

【0504】

一部の態様において、キットは、提供される構成要素の使用のための指示および/または促進(promotion)を任意に包含していてもよい。本明細書において使用される場合、「指示」は、指示および/または促進の構成要素を定義し得るものであって、典型的には、本開示のパッケージング上にまたはこれに関連して書面の指示を伴い得る。説明書はまた、説明書がキットに関連付けられるべきであることをユーザが明確に認識するようにいずれかの方法で提供されるいずれかの口頭または電子の説明書、例えば、視聴覚(例として、ビデオテープ、DVDなど)、インターネット、および/またはウェブベースの通信などを包含し得る。書面による説明書は、医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形態であってもよく、これはまた、動物投与のための製造、使用または販売の機関による承認を反映し得る。本明細書において使用される場合、「促進された」は、本開示に関連する、教育方法、病院のおよび他の臨床の指示、科学研究、薬物の発見または開発、学術研究、医薬産業活動(医薬販売を包含する)、ならびにいずれの広告活動または他の宣伝活動(いずれの形態の書面の、口述の、および電子的な連絡を包含する)を包含する、営業行為のすべての方法を包含する。追加的に、キットは、本明細書に記載の通りの特定の用途に応じて、他の構成要素も包含していてもよい。

【0505】

キットは、1以上の容器中に、本明細書に記載のいずれの構成要素の1以上を含有していてもよい。構成要素は、滅菌的に調製され、シリンジ中にパッケージされ、および冷凍保存されて出荷されてもよい。代替的に、これは、バイアルまたは保管のための他の容器に収納されてもよい。第2容器は、滅菌的に調製された他の構成要素も有していてもよい。代替的に、キットは、予め混合されて、バイアル、管、または他の容器中で出荷される活性剤を包含していてもよい。

【0506】

キットは、パウチ、1以上の管、容器、箱、または袋内に緩くパックされた付属物と共に、ブリスターパウチ(blister pouch)、収縮包装パウチ、真空シール可能なパウチ、シール可能な熱成形トレイ、または同様のパウチもしくはトレイの形態などの様々な形態を有してもよい。キットは、付属物が加えられた後に滅菌されてもよく、これによって容器中の個々の付属物が別様に開封され得る。キットは、放射線滅菌、加熱滅菌、または当技術分野において知られている他の滅菌方法などの、いずれの適切な滅菌技法も使用して滅菌され得る。キットはまた、特定の用途に応じて、他の成分、例えば、容器、細胞培地、塩、緩衝液、試薬、注射器、針、消毒剤を適用または除去するためのガーゼなどの布地、使い捨て手袋、投与前の薬剤の支持体などを包含してもよい。本開示のいくつかの側面は、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライム編集システムの様々な構成成分(例として、napDNAbp、逆転写酵素、ポリメラーゼ、融合タンパク質(例として、napDNAbpおよび逆転写酵素(またはより広義には、ポリメラーゼ)を包含する)、伸長ガイドRNA、ならびに融合タンパク質および伸長ガイドRNA、ならびに第2鎖ニッキング成分(例として、第2鎖ニッキングgRNA)および編集された生成物形成に向けてプライム編集プロセスを推進するのを助けるための5'内在性DNAフラップ除去エンドヌクレアーゼなどの補助エレメントを含む複合体を含むがこれらに限定されない)をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を含むキットを提供する。一部の態様において、ヌクレオチド配列(単数または複数)は、プライム編集システム構成要素の発現を推進する異

種プロモーター(または単一のプロモーターより多く)を含む。

【0507】

本開示の他の側面は、本明細書に記載の方法および組成物において利用されるプライム編集システムの様々な構成要素(例として、標的DNA配列を改変することが可能なプライム編集システムの構成要素をコードするヌクレオチド配列を含む)をコードする1つ以上の核酸構築物を含むキットを提供する。一部の態様において、ヌクレオチド配列は、プライム編集システム構成要素の発現を推進する異種プロモーターを含む。

【0508】

本開示の一部の側面は、(a)逆転写酵素に融合したnapDNAbp(例として、Cas9ドメイン)をコードするヌクレオチド配列と、(b)(a)の配列の発現を推進する異種プロモーターを含む核酸構築物を含むキットを提供する。

【0509】

細胞

本明細書に記載の組成物のいずれも含有していてもよい細胞は、原核細胞および真核細胞を包含する。

【0510】

本開示の哺乳動物の細胞は、ヒト細胞、霊長目の動物細胞(例として、ベロ細胞)、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細胞)を包含する。様々なヒト細胞株には、限定せずに、ヒト胚性腎臓(HEK)細胞、HeLa細胞、国立がん研究所の60のがん細胞株(NCI60)からのがん細胞、DU145(前立腺がん)細胞、Lncap(前立腺がん)細胞、MCF-7(乳がん)細胞、MDA-MB-438(乳がん)細胞、PC3(前立腺がん)細胞、T47D(乳がん)細胞、THP-1(急性骨髄性白血病)細胞、U87(膠芽腫)細胞、SHSY5Yヒト神経芽細胞腫細胞(骨髄腫からクローン化)、およびSaos-2(骨がん)細胞が包含される。一部の態様において、rAAVベクターは、ヒト胚性腎臓(HEK)細胞(例として、HEK293またはHEK293T細胞)中へ送達される。一部の態様において、rAAVベクターは、例えば、多能性幹細胞(例として、ヒト人工(induced)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)中へ送達される。幹細胞は培養中、無期限に分裂して、特化された細胞を生じさせる能力を持つ細胞を指す。多能性幹細胞は、分化して生物のすべての組織になることが可能であるが、完全な生物の発生を単独では支えることが可能でないある種の幹細胞を指す。ヒト人工多能性幹細胞は、胚性幹細胞を定義する特性を維持するのに重要な遺伝子および因子の発現が強いられることによって胚性幹細胞様状態へ再プログラムされる体細胞(例として、成熟した(mature)細胞または成熟(adult)細胞)を指す(例として、Takahashi and Yamanaka, Cell 126(4):663-76, 2006を参照(参照により本明細書に組み込まれる))。ヒト人工多能性幹細胞は、幹細胞マーカーを発現しており、全3種の胚葉(外胚葉、中胚葉、内胚葉)の細胞特徴を生成するのが可能である。

【0511】

本開示に従って使用されてもよい追加の細胞株の非限定例は、293-T、293-T、3T3、4T1、721、9L、A-549、A172、A20、A253、A2780、A2780ADR、A2780cis、A431、ALC、B16、B35、BCP-1、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR293、BxPC3、C2C12、C3H-10T1/2、C6、C6/36、Cal-27、CGR8、CHO、CMLT1、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/AR1、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-3T3、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。

【0512】

本開示のいくつかの側面は、本明細書において開示される構築物のいずれも含む細胞を提供する。一部の態様において、宿主細胞は、本明細書に記載の1以上のベクターで一過的または非一過的にトランスフェクトされている。一部の態様において、細胞は、対象中に天然に存在するとき、トランスフェクトされる。一部の態様において、トランスフェクトされる細胞は、対象から採られる。一部の態様において、細胞は、細胞株などの、対象から採られた細胞に由来される。組織培養のための多種多様の細胞株が当技術分野において知られている。細胞株の例は、これらに限定されないが、C8161、CCRF-CEM、MOLT、mIMCD-3、NHDF、HeLa-S3、Huh1、Huh4、Huh7、HUVEC、HASC、HEKn、HEKa、MiaPaCell、Panc1、PC-3、TF1、CTLL-2、C1R、Rat6、CV1、RPT E、A10、T24、J82、A375、ARH-77、Calu1、SW480、SW620、SKOV3、SK-UT、CaCo2、P388D1、SEM-K2、WEHI-231、HB56、TIB55、Jurkat、J45.01、LRMB、Bcl-1、BC-3、IC21、DLD2、Raw264.7、NRK、NRK-52E、MRC5、MEF、Hep G2、HeLa B、HeLa T4、COS、COS-1、COS-6、COS-M6A、BS-C-1サル腎臓上皮、BALB/3T3マウス胚線維芽細胞、3T3 Swiss、3T3-L1、132-d5ヒト胎児線維芽細胞;10.1マウス線維芽細胞、293-T、3T3、721、9L、A2780、A2780ADR、A2780cis、A172、A20、A253、A431、A-549、ALC、B16、B35、BCP-1細胞、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR293.BxPC3、C3H-10T1/2、C6/36、Cal-27、CHO、CHO-7、CHO-IR、CHO-K1、CHO-K2、CHO-T、CHO Dhfr-/-、COR-L23、COR-L23/CPR、COR-L23/5010、COR-L23/R23、COS-7、COV-434、CMLT1、CMT、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、EL4、EM2、EM3、EMT6/AR1、EMT6/AR10.0、FM3、H1299、H69、HB54、HB55、HCA2、HEK-293、HeLa、Hepa1c1c7、HL-60、HMEC、HT-29、Jurkat、JY細胞、K562細胞、Ku812、KCL22、KG1、KYO1、LNCap、Ma-Mel1-48、MC-38、MCF-7、MCF-10A、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MDCK II、MDCK11、MOR/0.2R、MONO-MAC6、MTD-1A、MyEnd、NCI-H69/CPR、NCI-H69/LX10、NCI-H69/LX20、NCI-H69/LX4、NIH-3T3、NALM-1、NW-145、OPCN/OPCT細胞株、Peer、PNT-1A/PNT2、RenCa、RIN-5F、RMA/RMAS、Saos-2細胞、Sf-9、SkBr3、T2、T-47D、T84、THP1細胞株、U373、U87、U937、VCaP、Vero細胞、WM39、WT-49、X63、YAC-1、YAR、およびそれらのトランスジェニック種を包含する。

【0513】

細胞株は、当業者に知られている様々な供給源から利用可能である(例として、American Type Culture Collection(ATCC)(Manassus, Va.)を参照)。一部の態様において、本明細書に記載の1以上のベクターでトランスフェクトされた細胞は、1以上のベクター由来配列を含む新しい細胞株を確立するのに使用される。一部の態様において、本明細書に記載の通りのCRISPRシステムの構成要素で(1以上のベクターの一過的なトランスフェクション、またはRNAでのトランスフェクションなどによって)一過的にトランスフェクトされて、CRISPR複合体の活性を通して改変された細胞は、改変は含有するが他の外来配列のいずれも欠く細胞を含む新しい細胞株を確立するのに使用される。一部の態様において、本明細書に記載の1以上のベクターで一過的もしくは非一過的にトランスフェクトされた細胞、またはこのような細胞に由来する細胞株は、1以上の試験化合物を査定するのに使用される。

【0514】

ベクター

本開示のいくつかの側面は、本明細書に記載の改変されたプライムエディターを細胞に送達するための組換えウイルスベクター(例として、アデノ随伴ウイルスベクター、アデ

10

20

30

40

50

ノウイルスベクター、または単純ヘルペスウイルスベクター)の使用に関する。分裂-PEアプローチのケースにおいて、全長Cas9タンパク質またはプライムエディターが様々なウイルスベクター(例として、rAAV(約4.9kb))のパッケージング限界を超えることから、PE融合タンパク質のN末端部分およびPE融合のC末端部分は、別々の組換えウイルスベクター(例として、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、または単純ヘルペスウイルスベクター)によって同じ細胞中へ送達される。

【0515】

一部の態様において、本明細書において使用されるベクターは、プライムエディター、またはそれら構成要素(例として、napDNAbp、リンカー、もしくはポリメラーゼ)のいずれもコードしていてもよい。加えて、本明細書において使用されるベクターは、PEgRNA、および/または第2鎖ヘニックを入れるための付属(accessory)gRNAをコードしていてもよい。ベクターは、細胞中の1以上のコード配列の発現を推進するのが可能であってもよい。一部の態様において、細胞は、例として細菌性細胞などの、原核細胞であってもよい。一部の態様において、細胞は、例として、酵母、植物、昆虫、または哺乳動物の細胞などの、真核細胞であってもよい。一部の態様において、真核細胞は、哺乳動物の細胞であってもよい。一部の態様において、真核細胞は、齧歯類の動物の細胞であってもよい。一部の態様において、真核細胞は、ヒトの細胞であってもよい。種々の型の細胞中の発現を推進する好適なプロモーターは当技術分野において知られている。一部の態様において、プロモーターは、野生型であってもよい。他の態様において、プロモーターは、より効率的またはより効果的な発現のために改変されていてもよい。また他の態様において、プロモーターは、トランケートされていてもよいが、依然としてその機能を保持する。例えば、プロモーターは、正常なサイズ、またはベクターのウイルス中への正しいパッケージングに好適な低減されたサイズを有していてもよい。

【0516】

一部の態様において、プライムエディターベクターに使用されてもよいプロモーターは、構成的、誘導的、または組織特異的であってもよい。一部の態様において、プロモーターは、構成的プロモーターであってもよい。非限定的な例示の構成的プロモーターは、サイトメガロウイルス前初期プロモーター(CMV)、サルウイルス(SV40)プロモーター、アデノウイルス主要後期(MLP)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーター、伸長(elongation)因子-アルファ(EFla)プロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、チューブリンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、それらの機能的断片、または上記のいずれの組合せを包含する。一部の態様において、プロモーターは、CMVプロモーターであってもよい。一部の態様において、プロモーターは、トランケートされたCMVプロモーターであってもよい。他の態様において、プロモーターは、EFlaプロモーターであってもよい。一部の態様において、プロモーターは、誘導性プロモーターであってもよい。非限定的な例示の誘導性プロモーターは、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、またはアルコールによって誘導可能なものを包含する。一部の態様において、誘導性プロモーターは、基底(非誘導)発現レベルが低いもの、例として、Tet-On(登録商標)プロモーター(Clontech)などであってもよい。一部の態様において、プロモーターは、組織特異的プロモーターであってもよい。一部の態様において、組織特異的プロモーターは、専らまたは主として、肝臓組織に発現される。非限定的な例示の組織特異的プロモーターは、B29プロモーター、CD14プロモーター、CD43プロモーター、CD45プロモーター、CD68プロモーター、デスミンプロモーター、エラスターゼ-1プロモーター、エンドグリンプロモーター、フィブネクチンプロモーター、Flt-1プロモーター、GFAPプロモーター、GPIIbプロモーター、ICAM-2プロモーター、INF- β プロモーター、Mbプロモーター、Nphs1プロモーター、OG-2プロモーター、SP-Bプロモーター、SYN1プロモーター、およびWASPプロモーターを包含する。

【0517】

一部の態様において、プライムエディターベクター(例として、プライムエディターシステムおよび/または融合タンパク質および/またはPEgRNA、および/または付属の第2鎖ニッキングgRNAをコードするいずれかのベクターを包含する)は、標的細胞へ送達された後にしか発現を開始しない誘導性プロモーターを含んでもよい。非限定的な例示の誘導性プロモーターは、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、またはアルコールによって誘導可能なものを包含する。一部の態様において、誘導性プロモーターは、基底(非誘導)発現レベルが低いもの、例として、Tet-On(登録商標)プロモーター(Clontech)などであってもよい。

【0518】

追加の態様において、プライムエディターベクター(例として、プライムエディターおよび/またはプライムエディター融合タンパク質および/またはPEgRNA、および/または付属の第2鎖ニッキングgRNAをコードするいずれかのベクターを包含する)は、特定の組織へ送達された後にしか発現を開始しない組織特異的なプロモーターを含んでもよい。非限定的な例示の組織特異的なプロモーターは、B29プロモーター、CD14プロモーター、CD43プロモーター、CD45プロモーター、CD68プロモーター、デスミンプロモーター、エラスターゼ-1プロモーター、エンドグリンプロモーター、フィブロネクチンプロモーター、Flt-1プロモーター、GFAPプロモーター、GPIIbプロモーター、ICAM-2プロモーター、INF- β プロモーター、Mbプロモーター、Nphs1プロモーター、OG-2プロモーター、SP-Bプロモーター、SYN1プロモーター、およびWASPプロモーターを包含する。

【0519】

一部の態様において、PEgRNA(またはプライム編集に関係して使用されるいずれのガイドRNA)をコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1の転写または翻訳制御配列へ作動可能に連結されていてもよい。一部の態様において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1のプロモーターへ作動可能に連結されていてもよい。一部の態様において、プロモーターは、RNAポリメラーゼ III(Pol III)によって認識されてもよい。Pol IIIプロモーターの非限定例は、U6、H1、およびtRNAプロモーターを包含する。一部の態様において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトU6プロモーターへ作動可能に連結されていてもよい。他の態様において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトH1プロモーターへ作動可能に連結されていてもよい。一部の態様において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトtRNAプロモーターへ作動可能に連結されていてもよい。1より多くのガイドRNAを用いる態様において、発現を推進するのに使用されるプロモーターは、同じであっても、または異なってもよい。一部の態様において、ガイドRNAのcrRNAをコードするヌクレオチド、およびガイドRNAのtracrRNAをコードするヌクレオチドは、同じベクター上に提供されていてもよい。一部の態様において、crRNAをコードするヌクレオチド、およびtracrRNAをコードするヌクレオチドは、同じプロモーターによって推進されてもよい。一部の態様において、crRNAおよびtracrRNAは、転写されて単一の転写産物になってもよい。例えば、crRNAおよびtracrRNAは、単一の転写産物からプロセシングされて二本鎖分子(double-molecule)ガイドRNAを形成してもよい。代替的に、crRNAおよびtracrRNAは、転写されて単一分子ガイドRNAになってもよい。

【0520】

一部の態様において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、PE融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む同じベクター上に位置付けされていてもよい。一部の態様において、ガイドRNAの発現およびPE融合タンパク質の発現は、それらの対応するプロモーターによって推進されてもよい。一部の態様において、ガイドRNAの発現は、PE融合タンパク質の発現を推進する同じプロモーターによって推進されてもよい。一部の態様において、ガイドRNAおよびPE融合タンパク質の転写産物は、単一の転写産物内に含有されていてもよい。例えば、ガイドRNAは、Cas9タンパク質転写産物の非翻訳領域(UTR)内にあってもよい。一部の態様において、ガイドRNAは、PE融合タンパク

質転写物の5'UTR内にあってもよい。他の態様において、ガイドRNAは、PE融合タンパク質転写物の3'UTR内にあってもよい。一部の態様において、PE融合タンパク質転写産物の細胞内半減期は、ガイドRNAをその3'UTR内に含有することによって低減されてもよく、これによってその3'UTRの長さを短縮し得る。追加の態様において、ガイドRNAは、PE融合タンパク質転写産物のイントロン内にあってもよい。一部の態様において、好適なスプライシング部位は、ガイドRNAが転写産物から正しくスプライシングされるように、ガイドRNAが位置付けられるイントロンに付加されてもよい。一部の態様において、同じベクター上の極めて近いところにあるCas9タンパク質およびガイドRNAの発現は、CRISPR複合体のより効率的な形成を容易にさせてもよい。

【0521】

ベクターシステムは、1つのベクター、もしくは2つのベクター、もしくは3つのベクター、もしくは4つのベクター、もしくは5つのベクター、またはそれ以上を含んでもよい。一部の態様において、ベクターシステムは、PE融合タンパク質、PEgRNAの両方をコードする1つの単一ベクターを含んでもよい。他の態様において、ベクターシステムは2つのベクターを含んでもよいが、ここで一方のベクターはPE融合タンパク質をコードし、他方はPEgRNAをコードする。

【0522】

薬学的に許容し得る担体として働き得る材料のいくつかの例は以下を包含する:(1)ラクトース、グルコース、およびスクロースなどの、糖;(2)コーンスターチおよびジャガイモデンプンなどの、デンプン;(3)ナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶性セルロース、および酢酸セルロースなどの、セルロースおよびその誘導体;(4)粉末状トラガカント;(5)麦芽;(6)ゼラチン;(7)ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、およびタルクなどの、平滑剤;(8)カカオバターおよび坐薬蠟などの、賦形剤;(9)落花生油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、および大豆油などの、油;(10)プロピレングリコールなどの、グリコール;(11)グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール(PEG)などの、ポリオール;(12)オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどの、エステル;(13)寒天;(14)水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの、緩衝剤;(15)アルギン酸;(16)パイロジェンフリー水;(17)等浸透圧の生理食塩水;(18)リンガー溶液;(19)エチルアルコール;(20)pH緩衝溶液;(21)ポリエステル、ポリカーボネート、および/またはポリ酸無水物;(22)ポリペプチドおよびアミノ酸などの、増量剤;(23)血清アルブミン、HDL、およびLDLなどの、血清構成要素;(22)エタノールなどの、C2~C12アルコール;ならびに(23)医薬製剤に採用される、相溶性のある他の非毒性物質。湿潤剤、着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、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」、「薬学的に許容し得る担体」または同種のものなどの用語は本明細書中、互換的に使用される。

【0523】

送達方法

いくつかの側面では、本発明は、本明細書に記載の1つ以上のベクター、その1つ以上の転写物、および/またはそれから転写された1つ以上のタンパク質などの1つ以上のポリヌクレオチドを宿主細胞に送達することを含む方法を提供する。いくつかの側面では、本発明は、さらに、このような方法によって産生される細胞、およびこのような細胞を含むかまたは次いで産生される生物(例えば動物、植物、または真菌)を提供する。一部の態様において、本明細書に記載されているプライムエディターは、ガイド配列との組合せで(任意に、それと複合体化されて)、細胞に送達される。本明細書に記載のいずれかの送達方法において、プライムエディターと共に送達することもできる。一部の態様において、阻害剤は、プライムエディターと同じベクター上にコードされる。ある特定の態様において、阻害剤は、プライムエディターに融合される。一部の態様において、阻害剤は、第2のベクター上にコードされ、第2のベクターは、プライムエディターをコードするベクターと共に送達される。一部の態様において、プライムエディターはタンパク質として細胞

に直接送達される。ある特定の態様において、融合タンパク質は、細胞内に直接送達される。

【0524】

例示的な送達戦略は、ベクターベースの戦略、PEリボ核タンパク質複合体送達、およびmRNA法によるPEの送達を包含する。一部の態様において、提供される送達方法は、ヌクレオフェクション、マイクロ注射、微粒子銃(biolistics)、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:核酸コンジュゲーション体、裸のDNA、人工ビリオン、およびDNAの取り込みを増強する剤を包含する。

【0525】

例示の核酸送達方法は、リポフェクション、ヌクレオフェクション、エレクトロポレーション、安定したゲノム組み入れ(例として、piggybac)、マイクロ注射、微粒子銃(biolistics)、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:核酸コンジュゲーション体、裸のDNA、人工ビリオン、およびDNAの取り込みを増強する剤を包含する。リポフェクションは、例として、米国特許第5,049,386号、第4,946,787号;および第4,897,355号)に記載されており、リポフェクション試薬は商業的に販売されている(例として、Transfectam(商標)、Lipofectin(商標)、およびSF細胞株4D-Nucleofector X Kit(商標)(Lonza))。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とって好適であるカチオン性および中性脂質は、FeignerのW091/17424;W091/16024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)に対するものであってもよい。送達は、RNP複合体の使用を通して達成されてもよい。

【0526】

イムノ脂質複合体などの標的化リポソームを包含する脂質:核酸複合体の調製は当業者に周知である(例として、Crystal, Science 270:404-410(1995);Blaese et al., Cancer Gene Ther.2:291-297(1995);Behr et al., Bioconjugate Chem.5:382-389(1994);Remy et al., Bioconjugate Chem.5:647-654(1994);Gao et al., Gene Therapy 2:710-722(1995);Ahmad et al., Cancer Res.52:4817-4820(1992);米国特許第4,186,183号、第4,217,344号、第4,235,871号、第4,261,975号、第4,485,054号、第4,501,728号、第4,774,085号、第4,837,028号、および第4,946,787を参照されたい)。

【0527】

他の態様において、本明細書において提供される送達方法およびベクターは、RNP複合体である。融合タンパク質のRNP送達は、プライム編集のDNA特異性を著しく増大させる。融合タンパク質のRNP送達は、オン-およびオフ-ターゲットDNA編集の分断(decoupling)へつながる。RNP送達は、プラスミド送達に匹敵するオン-ターゲット編集を維持しながら、非反復部位にてオフターゲット編集を小さくし(ablates)、高度に反復したVEGFA部位2でさえもオフ-ターゲットDNA編集を大いに低減させる。Rees, H.A. et al., Improving the DNA specificity and applicability of prime editing through protein engineering and protein delivery, Nat. Commun.8, 15790(2017)、2016年12月27日に発行された米国特許第9,526,784号、および2017年8月22日に発行された米国特許第9,737,604号を参照されたい(それらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)。

【0528】

細胞への核酸の送達のための追加の方法は当業者に公知である。例えば、US2003/0087817を参照(参照により本明細書に組み込まれる)。

【0529】

他の本開示の側面は、プライムエディター構築物を細胞中へ送達して、完全かつ機能的なプライムエディターを細胞内に形成する方法を提供する。例えば、一部の態様において、細胞は、本明細書に記載の組成物(例として、分裂Cas9もしくは分裂プライムエディターをコードするヌクレオチド配列、またはこのようなヌクレオチド配列を含む核酸ベク

ターを含有するAAV粒子を含む組成物)と接触させられる。一部の態様において、接触させることは、このようなヌクレオチド配列の細胞中への送達をもたらすが、ここでCas9タンパク質またはプライムエディターのN末端部分、およびCas9タンパク質またはプライムエディターのC末端部分は、細胞中で発現され結び合わされて、完全なCas9タンパク質または完全なプライムエディターを形成する。

本明細書において提供されるいずれのrAAV粒子、核酸分子、または組成物も、安定的または一過的のいずれかのいずれか好適なやり方で、細胞中へ導入されてもよいことが認識されるべきである。一部の態様において、開示されたタンパク質は、細胞中へトランスフェクトされてもよい。一部の態様において、細胞は、核酸分子で形質導入またはトランスフェクトされてもよい。例えば、細胞は、分裂タンパク質をコードする核酸分子、もしくは1つ以上の核酸分子をコードするウイルスのゲノムを含有するrAAV粒子で、形質導入されても(例として、分裂タンパク質をコードするウイルスで)、またはトランスフェクトされてもよい(例として、分裂タンパク質をコードするプラスミドで)。このような形質導入は、安定的な形質導入または一過的な形質導入であってもよい。一部の態様において、分裂タンパク質を発現するかまたは分裂タンパク質を含有する細胞は、例えば、分裂Cas9(例として、nCas9)タンパク質の送達において、1以上のガイドRNA配列で形質導入またはトランスフェクトされてもよい。一部の態様において、分裂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、一過的な(例として、リポフェクション)および安定したゲノム組み込み(例として、piggybac)、およびウイルスの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、細胞中へ導入されてもよい。

10

20

【0530】

例

例1:PEmaxと呼ばれる改変PE2プライムエディターの開発

プライム編集をさらに改善するために、逆転写酵素(RT)コドン使用頻度、nCas9と逆転写酵素との間のペプチドリンカーの長さおよび組成、NLS配列の位置、組成および数、ならびにSpCas9ドメイン内の突然変異を変化させることによって、PE2タンパク質を最適化した(図8Aおよび8B)。試験した20のこのようなバリエーションの中で、編集効率の最大の向上は、Genscriptヒトコドン最適化RT、二部分SV40 NLS(Wu et al.,2009)を含有する34aaリンカー、追加のC末端c-Myc NLS(Dang and Lee,1988)、ならびにCas9ヌクレアーゼ活性を改善することが以前に示されたSpCas9中のR221KおよびN394K突然変異(Spencer and Zhang,2017)を使用するプライムエディター構成で観察された(図9および図8A)。この最適化されたプライムエディター構成は、PEmaxと命名された。異なる遺伝子座を標的とする7つの置換編集にわたって、PE2システムを用いたPEmax構成(PE2max)を使用すると、意図した編集の平均頻度が、元のPE2構成よりもHeLa細胞で2.3倍およびHEK293T細胞で1.2倍増加した(図9B)。同様に、PEmax構成を使用したPE3(PE3max)は、製品純度を実質的に変化させることなく、平均編集効率をPE3よりもHeLa細胞で3.2倍およびHEK293T細胞で1.2倍増加させた(図9および図8A)。

30

【0531】

例2:新規および増強されたプライムエディターの操作および進化

背景

プライム編集は、生細胞へのSNPのプログラム型インストール、挿入、および欠失を可能にする、最近開発されたゲノム編集技術である。プライムエディターは、逆転写酵素(RT)酵素に融合したCas9(H840A)ニッカーゼから構成される:Cas9によるゲノムのニッキング時に、融合RTは、pegRNAと呼ばれる3倍伸長sgRNAを使用して、ニックを有するゲノムの末端にDNA配列を逆転写することができる。これらの新しく合成された塩基はゲノムに組み込まれ、永久的な編集をもたらす。プライムエディターの2つの元のバージョンは、PE1およびPE2¹である。PE1(配列番号3)は、野生型(WT)モロニー Maus 白血病ウイルス(M-MLV)RTを利用する;およびPE2(配列番号4)は、ヒト細胞の多種多様な部位にわたって編集効率を高めるM-MLV RT(D200N、T330P、L603W、T306

40

50

K、およびW313F置換を伴うMMLV_RT)の配列番号33に対して操作された五変異体を利用する。

【0532】

図27Aに例示されているように、本開示は、部分的には、プライム編集のための操作されたおよびPACE²進化型RTバリエーションを提供する。これまで、哺乳動物細胞においてプライム編集のために利用されてきた唯一のRT酵素は、M-MLV RTである。M-MLV RTは大きな酵素(2.2kB)であり、アデノ随伴ウイルス(AAV)などの多くのin vivo送達方法に障壁をもたらす。RT酵素はそれらのサイズおよび酵素活性が大きく異なるので、ここで報告された代替酵素は、プライム編集(より小さいサイズまたは改善された編集)に固有の利点をもたらす。加えて、この例は、哺乳動物細胞においてプライム編集効率を高めるCas9の突然変異体を提供する。これらの改善は、より効率的であり、治療用途のためにより容易に送達されるプライムエディターをもたらす。

10

【0533】

アプローチおよび結果

PEに対するレトロウイルスRTのスクリーニング

本発明者らは、編集効率を改善するため、またはエディターのサイズを減少させるために、M-MLV RTの代わりに他のRT酵素を使用することができると仮定した。M-MLV RTはレトロウイルスに由来するので、本発明者らは、哺乳動物細胞における様々なレトロウイルスRT酵素の活性を同定および試験した。2つの遺伝子座(FANCFおよびHEK3)でHEK293T細胞において活性を示す、M-MLV RT以外の12個のレトロウイルスRTが同定された(図1)。MMTV³、ASLV(アルファサブユニット)⁴、PERV⁵およびHIV_MMLV⁶は文献から同定された;AVIRE、BAEMV、GALV、KORV、MPMV、POK11ERV、SRV2およびWMSVは、BLAST-Pアルゴリズムを使用してUniProtデータベースから得た。MMTV-RT³、PERV-RT⁵、AVIRE-RT、KORV-RTおよびWMSV-RTは、WT M-MLVよりも高い編集を有した。これらの代替RTのアミノ酸配列を以下に提供する。

20

【0534】

性能を改善するためのレトロウイルスRTの操作

プライムエディターの開発中に、5つの突然変異(D200N、T306K、W313F、E330PおよびL603W)を酵素に組み込んでPE2¹を生成することによって活性を改善するために、WT M-MLV RT酵素をさらに操作した。PERV-RT、AVIRE-RT、KORV-RTおよびWMSV-RTはM-MLV RTと高度に相同であるため(それぞれ配列が68%、57%、67%、68%類似)、性能を改善するために類似の突然変異(すなわち、PE2におけるM-MLV RTのD200N、T306K、W313F、E330PおよびL603Wに対応する突然変異)をこれらのRT酵素に組み込むことができると仮定された。平均して、4つすべてのRT酵素について、各突然変異の組み込みは、4つの異なる遺伝子座(HEK3、EMX1、FANCF、RNF2)でWTと比較してプライム編集結果を増加させた(図29を参照されたい)。

30

【0535】

5つすべての個々の類似の突然変異がプライム編集活性を改善したので、本発明者らはpRT21.6の五変異体バリエーション(D199N+T305K+W312F+E329P+L603W置換を有するPERV)を生成した。このバリエーションは、試験した9つの異なる編集にわたってWT酵素よりも約6.6倍優れていた(図30)。しかし、pRT21.6のプライム編集活性は、平均してPE2よりもやや低かった(図18参照)。

40

【0536】

PEのための酵母レトロトランスポゾンTf1 RT

次に、本発明者らは、PEをin vivo送達により適したものにするために、より小さなRT酵素をスクリーニングおよび操作することに集中した。初期スクリーニングから、酵母レトロトランスポゾン由来のRT酵素Tf1は、M-MLV RT⁷よりも0.5kB小さいことが特定された。Tf1は、WT M-MLV RT(PE1)と比較して哺乳動物細胞において有意に高い編集を有していたが、HEK293T細胞において試験された3つの部位においてPE2よりも低い編集を有していた(図19を参照されたい)。

50

【0537】

PEを改善するためのTf1の構造誘導型操作

本発明者らはさらに、その性能を改善するためにTf1 RTを設計することを目的とした。Tf1は、レトロトランスポゾンのTy3/Gypsyファミリーに属する。そのRNA-DNA基質⁸(PDB:4OL8)に結合したTy3逆転写酵素の三次元タンパク質構造を使用して、Tf1 RTとその基質との相互作用を増加させると予測される一連の突然変異を設計した。2つの突然変異、K118RおよびS297Qは、WT酵素と比較してプライム編集活性を改善した(図20を参照されたい)。Tf1二重突然変異体(K118R+S297Q)突然変異体は、HEK293T細胞において試験された5つの部位にわたる単一の突然変異体と比較して、編集をさらに改善した。

10

【0538】

理論に拘束されるものではないが、2つの突然変異、K118RおよびS297Qは、それぞれRNAおよびDNA基質との相互作用を増加させると予測された。

【0539】

PE-PACE回路の作成および検証

次に、多くの異なるRTにおけるPE増強突然変異をより迅速に選択するためのPE-PACE回路を開発した。シトシンおよびアデニンベースエディターを進化させるためのPACE回路設計を参照する⁹、¹⁰。回路を設計する最初のステップとして、gIIIをM13バクテリオファージゲノムから除去し、宿主E.coliのプラスミド上のT7プロモーターの制御下に置いた。T7 RNAPをフレームシフトおよび不活性化する1bp欠失を有するT7 RNAポリメラーゼ(T7 RNAP)をコードする第2のプラスミドを調製した。したがって、成功したプライム編集によるこのフレームシフトの補正は、WT T7 RNAP産生を可能にし、次いでgIII転写およびファージ増殖を駆動することができる。PE-PACE回路の最初の反復では、プライムエディタータンパク質の様々な成分が宿主大腸菌と選択ファージとの間に分配された。所望のT7編集をコードするpegRNAをgIIIプラスミドに包含させ、エディターのタンパク質成分を宿主とファージとの間で分裂させた。N末端Npuインテインに融合したSpCas9(H840A)は、宿主E.coli中の3番目および最後のプラスミドに包含された。PE2逆転写酵素を、C末端Npuインテインに融合したファージゲノム上に配置した。ファージ感染後、インテインスプライシングは完全長プライムエディターを再構成する。この回路の概略図を図10に示す。

20

30

【0540】

回路を一晩増殖アッセイによって評価した。PE2 RTファージ増殖は、強力に脱濃縮された空ファージ陰性対照の増殖を超えたが、PE2 RTファージの一晩増殖レベルは予想ほど強固ではなかった(図31A)。哺乳動物細胞におけるプライム編集効率は、pegRNAのPBSおよびRT鑄型長によって大きく影響されるので、本発明者らは、pegRNA最適化も本発明者らのPACE回路にとって重要であると推測した。したがって、プライム編集およびひいてはPE2 RTファージ増殖を増強するために、本発明者らは、合計36個のpegRNAについてPBS鑄型長およびRT鑄型長のマトリックスを試験した。驚くべきことに、PE2 RTファージの増殖は、使用したpegRNAに応じて1万倍変化した(図31B)。この結果は、pegRNA最適化の重要性を強調するだけでなく、一晩の増殖で約100倍の強固なファージ増殖を可能にした。

40

【0541】

本発明者らのPE-PACE回路におけるファージ増殖が逆転写酵素活性と相関することを確認するために、本発明者らは、WT M-MLV逆転写酵素をコードするファージを使用してファージ増殖を評価した。PE2で使用される逆転写酵素は、文献からの5つの突然変異:(D200N、T306K、313,330,603)を有する突然変異体M-MLV逆転写酵素からなる。WT M-MLV逆転写酵素を使用するプライムエディターPE1は、哺乳動物細胞におけるプライム編集を測定する場合、PE2よりもはるかに効率が悪い。このため、PE1は、本発明者らのPACE回路における活性が哺乳動物編集で追跡されることを確実にするための貴重なツールであった。PE1ファージは、PE2ファージよりも約2,600分の1増殖が少な

50

く、より活性な哺乳動物プライムエディターである逆転写酵素がPACE回路においてより良好に増殖することを示している(図31C)。最後に、回路検証を完了するために、本発明者らは、ファージ支援非連続進化(PANCE)を使用してPE1 RTファージを進化させた。有望なことに、12回の選択の後、PE1ファージは、PANCEにおいて強固に増殖し始めた(図31D)。

【0542】

これらのファージのシーケンシングにより、いくつかの突然変異体の収束が明らかになった(図32)。PANCEに収束した6つの突然変異のうちの2つは、PE2に見られる突然変異であった。これは、PANCEがプライム編集活性を改善することが知られている突然変異を選択することができることを実証し、この新規PACE回路を検証した。見出された他の突然変異(D200Y、V223A、V223M、E302A、E302K、M457IおよびA462S)はPE2には存在しない;E302Kを除き、プライム編集の元の報告書では試験されなかった。

【0543】

PE-PACE回路の改変

PE-PACE回路にもいくつかの改変を加えた。最初に、T7 RNAPの発現を調節することによって回路ストリンジェンシーを調整した:T7 RNAPのプロモーターおよびRBSが弱いほど、回路ストリンジェンシーは高くなった(図33A)。しかしながら、以前のベース編集回路とは異なり、回路ターンオンに必要な編集を変更することによって回路を操作することも可能であった。例えば、上記のPE-PACE回路では、所望のプライム編集は1bp挿入であった。所望のプライム編集を20bp挿入に変更することによって、選択の特性を変化させることができた。特に、この変化は、より高い加工性を有するRTを選択すると予測された(図33B)。回路に対するこれらの変更は、以下の発展のいくつかに組み込まれた。

【0544】

PACEを使用するTf1 RTの指向性進化

Tf1の二重突然変異体はWT酵素と比較して有意な改善を示したが、Tf1 RTによるPEの編集は依然としてPE2よりも低かった。そこで、Tf1をさらに改善するために、上述したPACE回路を利用することにした。1bp欠失および20bp欠失回路を使用して、以下のバリエーションを生成した:

- ・ 5.27-(V14A+L158Q+F269L+K356E)(配列番号197)

- ・ 5.59-(E22K+P70T+G72V+M102I+K106R+A139T+L158Q+F269L+A363V+

- ・ K413E+S492N)(配列番号199)、および

- ・ 5.60-(P70T+G72V+M102I+K106R+L158Q+F269L+A363V+K413E+S492N)(配列番号200)、

【0545】

バリエーション5.60、5.27および5.59は、WT Tf1 RT酵素と比較して改善された編集を示した。バリエーション5.59および5.60は、HEK293T細胞において試験した5つの部位においてPE2と同等な編集を有する(図34を参照されたい)。

【0546】

PEに対する他の小型細菌RT酵素のスクリーニング

次に、PEについてさらに小さい酵素をスクリーニングすることにした。2つの異なる遺伝子座(RNF2およびHEK3)でHEK293T細胞において活性を示す7つのさらなるRT酵素が特定された。7つの酵素は、CRISPR_RT、Vp96、Vc95、Ec48、Gs、Er、およびNe144であり、そのアミノ酸配列を以下に提供する。7つのRT酵素はすべて、M-MLV RT(667アミノ酸長)よりも小さい(図24)。Vp96、Vc95、Ec48およびNe144は、その機能が実験的に検証された細菌レトロウイルスRTである¹¹。Er RTは高度に進行性のメタゾアン基IIイントロンRT¹²であるが、CRISPR-RTは、細菌逆転写酵素の系統発生分析中にToroらによって特徴付けられた最小RT酵素の1つであった¹³。これらの酵素をさらに以下のように進化させた。

10

20

30

40

50

【0547】

サイクロトロンEc48 RTの進化

Ec48は、低い開始活性(図35)を有する小さな細菌RT酵素(M-MLV RTよりも約0.8kB小さい)である。1bp欠失および20bp欠失回路を使用して、バリエーションを生成した:

- ・ 3.8-(R267I+K318E+K326E+E328K+R372K)(配列番号195)(Ec48-evo1)
- ・ 3.35-(E54K+K87E+D243N+R267I+E279K+K318E)(配列番号189)(Ec48-evo2)
- ・ 3.36-(A36V+K87E+R205K+D243N+R267I+E279K+K318E)(配列番号190)
- ・ 3.38-(E54K+K87E+D243N+R267I+S277F+E279K+K318E)(配列番号192)。

10

【0548】

これらのバリエーションはすべて、WT Ec48酵素よりも改善された活性を示す(図24)。

【0549】

レトロンNe144 RTの進化

Ne144は、非常に低い開始活性(図35)を有する別の小型細菌RT酵素である(M-MLV RTよりも約0.5kB小さい)。20bp欠失回路を使用して、4つの遺伝子座(図36)にわたってWT酵素より平均で23倍優れている38.14個のNe144バリエーション(A157T+A165T+G288V)(配列番号240)を生成した。

【0550】

20

レトロンVc95の進化

Vc95は、非常に低い開始活性(図35)を有する別の小さな細菌RT酵素(M-MLV RTよりも約1.1kB小さい)である。1bp欠失回路を使用して、

【0551】

4つの遺伝子座にわたってWT酵素より平均7倍優れている25.8 Vc95バリエーション(L11M+S75A+V97M+N146D+N245T)(配列番号242)を生成した(図37)。

【0552】

Geobacillus stearothermophilus由来の逆転写酵素の進化

図35の初期スクリーニングに含まれるRTに加えて、好熱性生物Geobacillus stearothermophilus(Gs RT)¹⁴由来のグループIIイントロン逆転写酵素を使用して追加の最終RTを進化させた。このRTは、M-MLV RTよりも約800bp小さいが、哺乳動物細胞プライム編集において最初に低いWT活性を示した。ストリンジェンシーが増加した回路におけるPANCE(図38A)およびPACE(図38B)のラウンド後、突然変異体は、WT酵素と比較した場合、哺乳動物細胞において劇的に改善されたプライム編集活性を示した。

30

【0553】

プライム編集のためのSpCas9バリエーションの進化

作製された回路の1つの追加のバージョンは、RTのみが進化した他のすべての取り組みとは対照的に、ファージ上のプライムエディタータンパク質(図13に示すCas9ニッカーゼとM-MLV逆転写酵素の両方)全体をコードするためのものである。PE-PACE回路の以前の反復と同様に、ストリンジェンシーをT7発現によって調整し、複数の異なる編集を調べることができる。1bp選択と20bp選択の両方で漸増的にストリンジェントなPANCEおよびその後のPACEのラウンドの後、プライムエディターのCas9ドメインにおける多くの収束突然変異が見出された。しかし、これらの突然変異のサブセットのみが哺乳動物細胞プライム編集に有用であった:それらの突然変異体の哺乳動物活性を図39に示す。

40

【0554】

考察

この例では、哺乳動物細胞において効率的なプライム編集が可能な一連の逆転写酵素が操作され、進化している。

【0555】

これらの操作および進化したバリエーションは、それらの野生型対応物と比較して劇的に増

50

加したプライム編集活性を示す。本明細書に記載のバリエーションはまた、PE2に記載の元のM-MLV突然変異体RTと比較した場合に独特の利点を提供する。

【0556】

第1に、ここで説明するRTの多くは、M-MLV RTよりも著しく小さい。これは、エディタータンパク質のサイズが制限的である最終的な送達用途にとって重要である(例えば、完全長エディター全体のAAV送達とレンチウイルス送達の両方が、プライムエディターのサイズが大きいために現在不可能である)。

【0557】

エディターサイズの減少に加えて、これらのRTの多くは、M-MLVとは異なり、哺乳動物ウイルスに由来しないという点で有益である。これは、(1)研究に使用される一部のマウスが抗M-MLV抗体を有することが知られており、(2)M-MLVおよびその近縁構造の近縁種が哺乳動物タンパク質と相互作用することが知られているため、下流用途にとって重要である。これらの意図しない相互作用を最小限に抑えるために、細菌由来RTは独自に可能になるであろう。

【0558】

この例では、プライムエディターのCas9ドメインもまた、有用なバリエーションを生成するように進化している。Cas9タンパク質とそのガイドRNAとの間の相互作用に影響を及ぼす突然変異は、おそらくpegRNAの固有の性質のために、哺乳動物細胞プライム編集にわずかな利益を与えるようである。プライムエディターのCas9ドメインを増強することもまた、本技術の治療用途に必要な高効率プライム編集を達成するために重要である。

【0559】

試験したRTのタンパク質配列:

MMTV-RT:

VFTLWGRDIMKDIKVRMLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSQDPVWLNQW
PLKQEKQLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLQLDLRAVNAT
MHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRP
YQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSI
VDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHTHIQGDVSYSYQKLQIRTDKLRTL
NDFQKLLGNINWIRPFLKLTGTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERL
STARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQ
LIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDP
LLTFTLQTAIIFPHMTSTTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPIIKENTQNTAQQA
EIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHQLRIHKRQE
KFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRILT (配列番号43)

【0560】

ASLV-RT:

【0561】

TVALHLAIPKWKPDHTPVWIDQWPLPEGKLVALTQLVEKELQLGHIEPSLSCWNT
PVFVIRKASGSYRLLHDLRAVNAKLVPFGAVQQGAPVLSALPRGWPLMVLDLKDCF
FSIPLAEQDREAFAFTLPSVNNQAPARRFQWKVLPQGMTCSP TICQLVVGQVLEPLR
LKHPSLRMLHYMDDL LLAASSHDGLEAAGEEVISTLERAGFTISPDKIQREPGVQYL
GYKLGSTYVAPVGLVAEPRIATLWDVQKLVGSLQWLRPALGIPPRLMGPFYEQLRG
SDPNEAREWNLDMMKMAWREIVQLSTTAALERWDPALPLEGAVARCEQGAIGVLGQ
GLSTHPRPCLWLFSTQPTKAFTAWLEVLTLLITKLRSASAVRTFGKEVDILLLPACFRE
DLPLPEGILLALKGFAGKIRSSDTPSIFDIARPLHVSLKVRVTDHPVPGPTVFTDASSS
THKGVVVWREGPRWEIKEIADSGASVQQLEARAVAMALLLWPTTPTNVVTDSAFVA
KMLLKMGQEGVPSTAAAFILEDALSQRSAMA AVLHVRSHSEVP GFFTEGNDVADSQ
ATFQAY (配列番号44)

【0562】

PERV-RT:

【0563】

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVDIHP TVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYS LRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLG TAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQMADRVAKQAAQAVNLLPI (配列番号45)

10

【0564】

HIV_MMLV:

【0565】

PISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNT
PVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGD
YFSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFK
KQNPDIVIYQYMDDL YVGS DLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPPFL
WMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLL
RGTKALTEVIPLTEEA ELELAENREILKEPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGW TYQI
YQEPFKNLKTGKYARMRG AHTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKF KLP IQKET
WETWWTEYWQATWIPEWEFVNT PPLVKLVVALNPATLLPLPEEGLQHNC LDILAE
AHGTRPD LTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTS
AQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTD SRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNK
DEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLI
EN (配列番号46)

20

【0566】

AVIRE-RT:

【0567】

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLL PVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHP TVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDL KDAFFC IPLAPESQLIFAFEWA
DAEEGESGQLTWTRLPQGFKNSTL FDEALNRDLQGFRLDHP SVSLLQYVDDL LIAA
DTQAACLSATRDL LMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLG TIGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEA
FQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRLD
PVAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPDPKWL TNARIT
QYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHC LD TLD SLTSTRPD LTDQPL
AQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLD SVIWAEPLPIGTS AQKAELIALTKALE
WSKDKSVNIYTD SRYAFATLHVHGM IYRERGLLTAGGKA IKNAP EILALLTAVWLPK
RVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQY
SNVEEALG (配列番号216)

40

【0568】

BAEMV-RT:

【0569】

VSLQDEHRLFDIPVTTSLPDVWLQDFPQAWAETGGLGRAKCQAPIIIDLKPTAVPVS
IKQYPMSLEAHMGIRQHIIKFLELGVLRPCRSPWNTPLL PVKKPGTQDYRPVQDLRE
INKRTVDIHP TVPNPYNLLSTLKP DYSWYTVL DLKDAFFCLPLAPQSQELFAFEWKD

50

PERGISGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFDEALHRDLTDFRTQHPEVTLLQYVDDLLLAAP
TKKACTQGTRHLLQELGEKGYRASAKKAQICQTKVTYLGYILSEGKRWLTPGRIETV
ARIPPPRNPREVREFLGTAGFCRLWIPGFAELAAPLYALTKESTPFTWQTEHQLAFE
ALKKALLSAPALGLPDTSKPFTLFLDERQGIAGVLTQKLGPWKRVPVAYLSKKLDPV
AAGWPPCLRIMAATAMLVKDSAKLTLGQPLTVITPHTLEAIVRQPPDRWITNARLT
HYQALLLDTRVQFGPPVTLPNATLLPVPENQPSPHDCRQVLAETHGTREDLKDQE
LPDADHTWYTDGSSYLDGSTRRAGA AVVDGHNTIWAQSLPPGTSQAQKAELIALTKA
LELSKGKKANIYTD SRYAFATAHTHGS IYERRGLTSEGKEIKNKA EIALLKALFLPQ
EVAIIHCPGHQKGQDPVAVGNRQADRVARQAAMAEVLT LATEPDNTSHITIEHTYTS
EDQEEA(配列番号48)

10

【0570】

GALV-RT:

【0571】

LNLEEEYRLHEKPVPSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQKFLDLGVLVPCRSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSYTWYSVLDLKDAFFCLRLHPNSQPLFAFEW
KDPEKGNTGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLV
AAPTIEDCKKGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQREV TYLGYLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPVPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQ
QAFDHIKKALLSAPALALPDLTKPFTLYIDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKK
LDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTN
ARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLED
QPLPGVPTWYTDGSSFITEGKRRAGAPIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQA
LRLAEGKNINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEIAIHLPR
RVAIHCPGHQRGSNPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAGTTKPQEPIEPAQEK(配
列番号49)

20

【0572】

KORV-RT:

【0573】

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVDIHTPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGNTGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFALNPQVVMLQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRLQELSKLGYRVS AKKAQLCREEV TYLGYLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAH
QEAFGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNVLVIAHPNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLP EGTSQAQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEIAIHLPR
KRVAIHCPGHQRGTD PVATGNRKAD EAAKQAAQSTRILTETTKNQE HFEPTRGK(配
列番号222)

30

40

【0574】

MPMV-RT:

【0575】

MWGRDLLSQMKIMMCSPNDIVTAQMLAQGYSPGKGLGKKENGILHPIPNQGQSNK
KGFGNFLTA AIDILAPQQCAEPITWKSDEPVWVDQWPLTNDKLAAAQQLVQEQLA
GHITESSPWNTPIFVIKKKSGKWRLQLDLRAVNATMVL MGALQPGLPSPVAIPQGY
LKIIIDLKDCFFSIPLHPSDQKRFAFSLPSTNFKEPMQRFQWKVLPQGMANSPTLCQ
KYVATAIHKVRHAWKQMYIIHYMDDILIAGKDGQQLVLCFDQLKQELTAAGLHIAP

50

EKVQLQDPYTYLGFELNGPKITNQKAVIRKDKLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLKLTT
GDLKPLFDTLKGSDPNSHRSLSEALASLEKVETAIAEQFVTHINYSPLIFLIFNTA
LTPTGLFWQDNPIMWIHLPASPKKVLLPYDAIADLIILGRDHSSKKYFGIEPSTIIQP
YSKSQIDWLMQNTMWPACASFVGILDNHYPNKNLIQFCKLHTFVFPQIISKTPLN
NALLVFTDGSSTGMAAYTLTDTTIKFQTNLNSAQLVELQALIAVLSAFPQNQPLNIYT
DSAYLAHSIPLLETVAQIKHISETAKLFLQCQQLIYNRSIPFYIGHVRAHSGLPGPPIAQ
GNQRADLATKIVA(配列番号51)

【0576】

POL11ERV-RT:

【0577】

ATVEPPKPIPLTWKTEKPVWVNQWPLPKQKLEALHLLANEQLEKGHIEPSFSPWNS
PVFVIQKKSGKWRMLTDLRAVNAVIQPMGPLQPGLPSPAMIPKDWPLIIDLKDCFF
TIPLAEQDCEKFAFTIPAINNKEPATRFQWKVLPQGMLNSPTICQTFVGRALQPVRE
KFSDCYIIHYIDDILCAAETKDKLIDCYTFLQAEVANAGLAIASDKIQTSTPFHYLGM
QIENRKIKPQKIEIRKDTLKTNLNDFQKLLGDINWIRPTLGIPTYAMSNLFSILRGDSDL
NSKRILTPEATKEIKLVEEKIQSAQINRIDPLAPLQLLIFATAHSPTGIIIQNTDLVEW
SFLPHSTVKTFTLYLDQIATLIGQTRLRIIKLCGNPDKIVVPLTKEQVRQAFINSGA
WQIGLANFVGIIDNHYPKTKIFQFLKMTTWILPKITRREPLENALTVFTDGSNGKA
AYTGPKERVIKTPYQSAQRAELVAVITVLQDFDQPINIISDSAYVVQATRDVETALIK
YSMDDQLNQLFNLLQQTVRKRNFPPFYITHIRAHTNLPGLPTKANEEADLLVS(配列番
号52)

【0578】

SRV2-RT:

【0579】

MWGRDLLSQMKIMMCSPNDIVTAQMLAQQGYSPGKGLGKREDGILQPIPNSGQLDRK
GFGNFLATAVDILAPQRYADPITWKSDEPVWVDQWPLTQEKLAAAQQLVQEQLQA
GHIESNSPWNTPIFVIKKKSGKWRLQLDLRAVNATMVLMGALQPGLPSPVAIPQGY
FKIVIDLKDCFFTIPLQPVQKRFASFSLPSTNFKQPMKRYQWKVLPQGMANSPTLCQ
KYVAAAIEPVRSWAQMYIIHYMDDILIAGKLGEQVLQCFAQLKQALTTTGLQIAPE
KVQLQDPYTYLGFQINGPKITNQKAVIRRDKLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLHLTTG
DLKPLFDILKGDSNPNSPRSLSEALASLQKVETAIAEQFVTQIDYTQPLTFLIFNTTL
TPTGLFWQNNPVMWVHLPASPKKVLLPYDAIADLIILGRDNSKKYFGLEPSTIIQP
YSKSQIHWLMQNTETWPIACASYAGNIDNHYPNKNLIQFCKLHAVVFPRIISKTPLD
NALLVFTDGSSTGIAAYTFEKTTVRFKTSHTSAQLVELQALIAVLSAFPHRALNVYTD
SAYLAHSIPLLETVSHIKHISDTAKFFLQCQQLIYNRSIPFYLGHIRAHSGLPGLSQG
NHITDLATKVVA(配列番号53)

【0580】

WMSV-RT:

【0581】

LNLEEEYRLHEKVPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGLVLPVCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGNLTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLIV
AAPT YRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKAVAAVALLK DADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLN PATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVD GKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQ RGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKR

VAIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号228)
【0582】

Tf1-RT:

【0583】

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMAMNDEINQGLKSGIRESKAINACPVMFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDHKLAFRC
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDLILHSKSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFSKKILLETDAVDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号55)

10

【0584】

CRISPR-RT:

【0585】

NSQAQSACCAGANQIVEGATLEKVVAPACLQQAWTRVRKNKGGPGGDGVTIEIFAQ
NAEVELEKLRAETLAGIYRPRKVRHAIVPKPKGGERKLTIPSVVDRIQTATMLSLGQ
TVDHHFSSASWAYREGRGVDDALADLRRLRNSGLFWTFDADIMQYFDRILHKRLID
DLFIWVDDLRIVRLIQLWLRFSYSWGRGIAQGAPISPLLANLFLHPMDRLLELEGLA
SVRYADDFVVLCSRKALAQAQLIVASHLAARGLKLNMSKTRILAPSEAFIFLGQTV
PVWDTQP(配列番号56)

20

【0586】

Vp96-RT:

【0587】

NLVKRLAHLGKSEPEVIHFLADAPNKYRVYKIPKRSYGHRVIAQPTRELKLYQKAF
LELYSFPVHSSATAYCKGKSIKDNALSHVKNHYLLKTDLENFFNSITPNIFWKSIND
SIATPKFSTSEIALVERLIFWRPSKLQGGKLVLSVGAPSSPTISNFCLYQFDEYLSICK
EQNISYTRYADDLTFTSTCDKDVLTHTVIPLIQSLLDYFFASELKLNHSKTVFSSKAHNR
HVTGITLNNEGKLSLGRERKRYIKHLVHSFKYGKLDNTEIRHLQGMLSFAKHIEPIFI
DRLKEYTDELIKIIYEAGHE(配列番号57)

30

【0588】

Vc95-RT:

【0589】

NILTTLREQLLTNNVIMPQEFERLEVRGSHAYKVYSIPKRKAGRRTIAHPSSKLKICQ
RHLNAILNPLLKVHDSSYAYVKGRSIKDNALVHSHSAYVLKMDFQNFNSITPTILR
QCLIQNDILLSVNELEKLEQLIFWNPSKKRNGKLILSVGSPISPLISNAIMYPFDKIIN
DICTKHGINYTRYADDITFSTNIKNTLNKLPEIVEQLIIQTYAGRIIINKRKTVFSSKKH
NRHVTGITLTNDSKISIGRSRKRYISSLVFKYINKNLDIDEINHMKGMLAFAYNIEPIY
IHRLSHKYKVNIKEILRGSN(配列番号241)

40

【0590】

Ec48-RT:

【0591】

GRPYVTNLNMGFMDFKPKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINKRIFKELVVFPSPFLGSPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHDLPIKHKTKIFHCSSEPIKVHGLRVDYDSPRLPSDEVKRIRASIHN
KLLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVKNLGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKRDV
AVIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASL

50

KPL(配列番号59)

【0592】

Gs-RT:

【0593】

ALLERILARDNLITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQLRDYIRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNA
HDAVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDLMSRVARKVKDKRVLKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPR
SIQRLKQRIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRR
RLRLCQWLQWKRVRTRIRELRLALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKT
YWTAQGLKSLTQRYFELRQG(配列番号60)

10

【0594】

Er-RT:

【0595】

DTSNLMEQILSSDNLNRAYLQVVRNKGAEVDGMKYTELKEHLAKNGETIKGQLRT
RKYKPQPARRVEIPKPDGGVRNLGVPTVTDRFIQQAIAQVLTPIYEEQFHDHSYGFR
PNRCAQQAILTALNIMNDGNDWIVDIDLEKFFDTVNHDKLMTLIGRTIKDGDVISIV
RKYLVSIGIMIDDEYEDSIVGTPQGGNLSPLLANIMLNELDKEMEKRGLNFVRYADDC
IIMVGSEMSANRVMRNISRFIGEKLGLKVNMTKSKVDRPSGLKYLGFYFDPRAHQ
FKAHPHAKSVAKFKKRMKELTCRSWGVSNYSYKVEKLNQLIRGWINYFKIGSMKTL
KELDSRIRYRLRMCIWKQWKTPQNQEKNLVKLGIDRNTARRVAYTGKRIAYVCNKG
AVNVAISNKRSLASFGGLISMLDYYIEKCVTC(配列番号185)

20

【0596】

Ne144-RT:

【0597】

AGQPTSREALYERIRSTSKEEVILEEMIRLGFWPAQGAVPHDPAAEIRRRGELERQLS
ELREKSRKLYNEKALIAEQRKQRLAESRRKQKETKARRERERQERAQKWAQRKAGEI
LFLGEDVSGGMSHKTCDAELIKREGVPAIASAEELARAMGIALKELRFLAYNRKVS
RVTBYRRFLLPKKTGGLRLISAPMPRLKRAQAWALEHIFNKLSFEPAAHGFVAGRSIVS
NARPHVGADVVDNLDLKDDFPTVSFPRVKGALRHLGYSESVATALALVCTEPEVDEV
GLDGTTWYVARGERFLPQGSPPCAITNLLCRRLDRRLHGLAQALGFVYTRYADDLT
FSGRGEAAESKRVGKLLRGAADIVAHEGFVVHPDKTRVMRRGRREQVTGVVVNDKT
SVPRDELKRKFRATLYQIEKDGPADKRWGNGGDVLAHAVHGYACFVAMVDPSRGQPLL
ARARALLAKHGGPSKPPGGSGPRAPTVPQPTANAPEAPKPVAPATPAAPAKKGWKL
F(配列番号239)

30

この例で操作されたRTバリエーション:

- AVIRE-D199N(すなわち、D199N置換を含有するAVIRE-RT(配列番号216))
- AVIRE-T305K(すなわち、T305K置換を含有するAVIRE-RT(配列番号216))
- AVIRE-W312F(すなわち、W312F置換を含有するAVIRE-RT(配列番号216))
- AVIRE-G329P(すなわち、G329P置換を含有するAVIRE-RT(配列番号216))
- AVIRE-L604W(すなわち、L604W置換を含有するAVIRE-RT(配列番号216))
- KORV-D197N(すなわち、D197N置換を含有するKORV-RT(配列番号222))
- KORV-T303K(すなわち、T303Kを含有するKORV-RT(配列番号222))
- KORV-W310F(すなわち、W310F置換を含有するKORV-RT(配列番号222))
- KORV-E327P(すなわち、E327P置換を含有するKORV-RT(配列番号222))
- KORV-L599W(すなわち、L599W置換を含有するKORV-RT(配列番号222))
- WMSV-D197N(すなわち、D197N置換を含有するWMSV-RT(配列番号228))
- WMSV-T303K(すなわち、T303K置換を含有するWMSV-RT(配列番号228))
- WMSV-W311F(すなわち、W311F置換を含有するWMSV-RT(配列番号228))

40

50

- ・ WMSV-E327P(すなわち、E327P置換を含有するWMSV-RT(配列番号228))
- ・ WMSV-L599W(すなわち、L599W置換を含有するWMSV-RT(配列番号228))
- ・ PERV-D199N(すなわち、D199N置換を含有するPERV-RT(配列番号45))
- ・ PERV-T305K(すなわち、305K置換を含有するPERV-RT(配列番号45))
- ・ PERV-W312F(すなわち、W312F置換を含有するPERV-RT(配列番号45))
- ・ PERV-E329P(すなわち、E329P置換を含有するPERV-RT(配列番号45))
- ・ PERV-L602W(すなわち、L602W置換を含有するPERV-RT(配列番号45))
- ・ PERV-D199N+T305K+W312F+E329P+L602W(すなわち、D199N+T305K+W312F+E329P+L602W置換を含有するPERV-RT(配列番号45))
- ・ Tf1-K118R(すなわち、K118R置換を含有するTf1-RT(配列番号55))
- ・ Tf1-S297Q(すなわち、S297Q置換を含有するTf1-RT(配列番号55))
- ・ Tf1-K118R+S297Q(すなわち、K118R+S297Q置換を含有するTf1-RT(配列番号55))

10

本研究で進化させたRTバリエーションのタンパク質配列:

- ・ 5.27-(V14A+L158Q+F269L+K356E)
- ・ 5.59-(E22K+P70T+G72V+M102I+K106R+A139T+L158Q+F269L+A363V+K413E+S492N)
- ・ 5.60-(P70T+G72V+M102I+K106R+L158Q+F269L+A363V+K413E+S492N)
- ・ 3.8-(R267I+K318E+K326E+E328K+R372K)
- ・ 3.35-(E54K+K87E+D243N+R267I+E279K+K318E)
- ・ 3.36-(A36V+K87E+R205K+D243N+R267I+E279K+K318E)
- ・ 3.38-(E54K+K87E+D243N+R267I+S277F+E279K+K318E)
- ・ 38.14:Ne144(A157T+A165T+G288V)
- ・ 25.8-Vc95(L11M+S75A+V97M+N146D+N245T)

20

突然変異体Gs-RTプライムエディター(すべての突然変異はGs-RTを指す;構成はすべてCas9(H840A)-突然変異体GsRTである)。

- ・ 809:L17P+D206V(配列番号159)
- ・ 810:N12D+L37R+G78V(配列番号160)
- ・ 811:A16E+L37P+A123V(配列番号161)
- ・ 812:A16V+R38H+W45R+Y126F+Q412H(配列番号162)
- ・ 813:A16V+R38H+W45R+R291K(配列番号163)
- ・ 814:N12D+L37R+G72E+E129G+P264S+R344S+R360S(配列番号164)
- ・ 815:N12D+Y40C+I67T+G73V+Q93R+R287I+R358S(配列番号165)
- ・ 816:N12D+Y40C+I67T+G73V+Q93R+R358S(配列番号166)
- ・ 817:N12D+I41N+P190L+A234V+K279E(配列番号167)
- ・ 818:N12D+L37R+R267M+P309T+R358S+E363G(配列番号168)
- ・ 819:A16V+V20G+I41S+R233K+P264S(配列番号169)
- ・ 820:L17P+V20G+I41S+I67R+R263G+P264S+V374A(配列番号170)
- ・ 821:L17P+V20G+I41S+I67R+K162N+R263G+P264S(配列番号55)

30

40

突然変異体M-MLVプライムエディター(すべての突然変異はWT MMLV RTを指す;すべての構成はCas9(H840A)-Mutant M-MLV RTである)。

- ・ クローン1および2:D200Y+E302A
- ・ クローン3および4:D200Y+V223A+M457I
- ・ クローン5-8:V223M+T306K+A462S
- ・ クローン9および10:D200N+E302K
- ・ クローン11および14:D220Y+E302K
- ・ クローン13および16:D200Y
- ・ クローン15:V223M

突然変異Cas9を有するプライムエディター(すべての突然変異はCas9を参照する);す

50

すべての構成は突然変異Cas9(H840A)-M-MLV RTである

- ・1043:H721Y+R753G(配列番号178)
- ・1044:E102K+R753G(配列番号179)
- ・1045:E102K+H721Y+R753G(配列番号180)

【0598】

配列(例2)

以下のアミノ酸配列は、上記の例2の結果として得られたものであり、進化したRTアミノ酸配列、進化したCas9アミノ酸配列、および進化した融合タンパク質配列を包含する。本出願はまた、いずれか1つのバリエーションの1つ以上の突然変異を別の突然変異と組み合わせるいずれかの追加のバリエーション配列(例として、バリエーションRTもしくはCas9配列またはPE融合タンパク質配列)を企図する。

10

【0599】

加えて、本出願は、以下のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも70%、または少なくとも75%、または少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも99%、または最大100%の配列同一性を有するいずれかのアミノ酸配列を企図し、好ましくは、このような配列同一性を有するアミノ酸配列は、以下の配列中に1つ以上の突然変異を保持する。

【0600】

進化したGs逆転写酵素(配列番号159~171):

L17P+D206Vを含むGsバリエーション

20

【化5】

EANQGAPGIDGVSTDQLRDYIRAHWSTIHAQLLAGTYRPAPVRRVEIPKPGGGTRQL
GIPTVVDRLIQQAAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHDAVRQAQGYIQEGYRYVV
DMDLEKFFDRVNHDLMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQAGVMIEGVKVQTEEGTP
QGGPLSPLLANILLDVLDEKLEKRGKFCRYADDCNIYVKSLRAGQRVKQSIQRFLE
KTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRSIQRLKQRIQLTNPWNS
ISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRLRLCQWLQWKRVRTRIR
ELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTYWTAQGLKSLTQRYFEL
RQG (配列番号 159)

30

【0601】

GsバリエーションN12D+L37R+G78V

【化6】

ALLERILARDLITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQRRDYIRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGGGTRQLVIPTVVDRLIQQAAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHDA
VRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDLMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQ
AGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGKFCRYADDCNIYVK
SLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRS
IQRLKQRIQLTNPWNSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRL
RLCQWLQWKRVRTRIIRLALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTY
WTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号 160)

40

【0602】

Gs A16E+L37P+A123V

50

【化 7】

ALLERILARDNLITELKRVEANQGAPGIDGVSTDQPRDYIRAHWSTIHAQLLAGTYRP
APVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHDA
VRQVQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQA
GVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYVKS
LRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRSI
QRLKQIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRL
RLCQWLQWKRVRTRIRELRLALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTY
WTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号 161)

10

【0603】

Gs バリエーション A16V + R38H + W45R + Y126F + Q412H

【化 8】

ALLERILARDNLITVLKRVEANQGAPGIDGVSTDQLHDYIRAHIRSTIHAQLLAGTYRP
APVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHDA
VRQAQGGFIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQA
GVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYVKS
LRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRSI
QRLKQIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRL
RLCQWLQWKRVRTRIRELRLALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTY
WTAQGLKSLTHRYFELRQG (配列番号 162)

20

【0604】

Gs A16V + R38H + W45R + R291K

【化 9】

ALLERILARDNLITVLKRVEANQGAPGIDGVSTDQLHDYIRAHIRSTIHAQLLAGTYRP
APVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHDA
VRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQA
GVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYVKS
LRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRSI
QKLKQIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRL
RLCQWLQWKRVRTRIRELRLALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTY
WTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号 163)

30

【0605】

Gs バリエーション 814 N12D + L37R + G72E + E129G + P264S + R344S + R360S

【化 10】

ALLERILARDDLITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQRRDYIRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGEGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHD
AVRQAQGYIQGGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQ
AGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYVK
SLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRSWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRS
IQRLKQIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRSRL
RLCQWLQWKRVRTSIRELRLALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTY
WTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号 164)

40

50

【0606】

Gsバリエーション815 N12D+Y40C+I67T+G73V+Q93R+R287I+R358S

【化11】

ALLERILARD**DL**ITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQLRDCIRAHWSTIHAQLLAGTYRP
APVRRVETPKPGGVTRQLGIPTVVDRLIQQAIL**REL**TPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHD
AVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDI**LS**RVARKVKDKRVLKLIRAYLQ
AGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLL**AN**ILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYVK
SLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAP**ISI**
QRLKQIRQLTNP**N**WSISM**PER**IHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRL
RLCQWLQWKRVSTRI**EL**RALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTY
WTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号 165)

10

【0607】

Gsバリエーション816 N12D+Y40C+I67T+G73V+Q93R+R358S

【化12】

ALLERILARD**DL**ITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQLRDCIRAHWSTIHAQLLAGTYRP
APVRRVETPKPGGVTRQLGIPTVVDRLIQQAIL**REL**TPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHD
AVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDI**LS**RVARKVKDKRVLKLIRAYLQ
AGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLL**AN**ILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYVK
SLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAP**RS**
IQRLKQIRQLTNP**N**WSISM**PER**IHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRL
RLCQWLQWKRVSTRI**EL**RALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTY
WTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号 166)

20

【0608】

Gsバリエーション817 N12D+I41N+P190L+A234V+K279E

【化13】

ALLERILARD**DL**ITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQLR**DYN**RAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHD
AVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDI**LS**RVARKVKDKRVLKLIRAYLQ
AGVMIEGVKVQTEEGTLQGGPLSPLL**AN**ILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYVK
SLR**V**GQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPER**E**ARIRLAPRS
IQRLKQIRQLTNP**N**WSISM**PER**IHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRL
RLCQWLQWKRV**TR**I**EL**RALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTY
WTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号 167)

30

【0609】

Gsバリエーション818 N12D+L37R+R267M+P309T+R358S+E363G

40

50

【化 1 4】

ALLERILARD~~DL~~ITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQ~~RR~~DYIRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHD
AVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQ
AGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYVK
SLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLVNEEKSAVDRPWKMAFLGFSFTPERKARIRLAPR
SIQRLKQIRQLTNPWNWSISMTERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRR
LRLCQWLQWKRVRTRIRGLRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKT
YWTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号 168)

10

【0 6 1 0】

Gsバリエーション 819 A16V + V20G + I41S + R233K + P264S

【化 1 5】

ALLERILARDNLITVLKRGEANQGAPGIDGVSTDQLRDYSRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHD
AVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQ
AGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYVK
SLKAGQRVKQSIQRFLEKTLKLVNEEKSAVDRSWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPR
SIQRLKQIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRR
LRLCQWLQWKRVRTRIRELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKT
YWTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号 169)

20

【0 6 1 1】

Gsバリエーション 820 L17P + V20G + I41S + I67R + R263G + P264S + V374A

【化 1 6】

ALLERILARDNLITAPKRGEANQGAPGIDGVSTDQLRDYSRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVERPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAH
DAVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLVNEEKSAVDGSKRAFLGFSFTPERKARIRLAP
RSIQRLKQIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRR
RLRLCQWLQWKRVRTRIRELRALGLKETAAEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGK
TYWTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号 170)

30

【0 6 1 2】

Gsバリエーション 821 L17P + V20G + I41S + I67R + K162N + R263G + P264S

【化 1 7】

ALLERILARDNLITAPKRGEANQGAPGIDGVSTDQLRDYSRAHWSTIHAQLLAGTYR
PAPVRRVERPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAH
DAVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKNVKLIRAYL
QAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYV
KSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLVNEEKSAVDGSKRAFLGFSFTPERKARIRLAP
RSIQRLKQIRQLTNPWNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRR
RLRLCQWLQWKRVRTRIRELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGK
TYWTAQGLKSLTQRYFELRQG (配列番号 171)

40

50

【0613】

進化したMMLV逆転写酵素(配列番号172~177):

以下の進化したMMLV RTバリエントのそれぞれは、配列番号33の野生型MMLV RTに基づくが、各バリエントMMLV RTは、RNaseHドメインに対応する約180アミノ酸のC末端切断を含む。

【0614】

比較のために、野生型MMLV RTは以下のアミノ酸配列を有する:

【0615】

野生型MMLV RTアミノ酸配列:

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATST
PVS IKQYPMSQEARLG I KPHIQRL LDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQD
LREV NKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLRLHPTSQPLFAFE
WRDPEM GISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLL
AATSELD CQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEAR
KETVMGQPTPKTPRQLREFLG TAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQ
QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLT KPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSK
KLD PVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWL
SNARMTHYQALLLD TDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC LDILAEAHGTRPD
LTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELI
ALTQALKMAEGKKLN VYTD SRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLK
ALFLPKRLSIIHCPGHQKGHS AEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP (配
列番号33)

10

20

【0616】

本出願は、(野生型MMLV RTと比較した)以下の進化したMMLV RTバリエントを企図する。

【0617】

MMLVバリエント:MMLV D200S+V223A+E346K+W388C

【化18】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTP
VSIKQYPMSQEARLG I KPHIQRL LDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLR
EVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLRLHPTSQPLFAFEWR
DPEM GISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFSEALHRDLADFRIQHPDLILLQYADDLLLAAT
SELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKE
TVMGQPTPKTPRQLREFLG KAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKA
YQKIKQALLTAPALGLPDLT KPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWCRPVAYLSKKL
DPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN
ARMTHYQALLLD TDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC LD (配列番号 172)

30

40

【0618】

MMLVバリエント:MMLV S60Y+V223A+N249S

【化 1 9】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTP
VYIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW
RDPENGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYADDLLLA
ATSELDCQQGTRALLQTLGSLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEAR
KETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQ
KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSK
KLDPAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWL
SNARMTHYQALLDTRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 173)

10

【 0 6 1 9】

MMLVバリエント:MMLV P111L+V223A+T287A+G316R

【化 2 0】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTP
VSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRLVQDL
REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW
RDPENGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYADDLLLA
ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEAR
KEAVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPRFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQ
KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSK
KLDPAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWL
SNARMTHYQALLDTRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 174)

20

30

【 0 6 2 0】

MMLVバリエント:MMLV S60Y+G138R+V223A

【化 2 1】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTP
VYIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSRLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW
RDPENGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYADDLLLA
ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEAR
KETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQ
KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSK
KLDPAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWL
SNARMTHYQALLDTRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 175)

40

【 0 6 2 1】

50

MMLVバリエント:MMLV S60Y+Y222F+V223A+K445N

【化22】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTP
VYIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW
RDPENGISGQLTWTRLPQGFKNSTLNEALHRDLADFRIQHPDLILLQFADDLLAA
TSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARK
ETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQK
AYQEIQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK
LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVNQPPDRWLS
NARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 176)

10

【0622】

MMLVバリエント:MMLV S60Y+C157F+V223A+T246I

【化23】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTP
VYIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFFLRLHPTSQPLFAFEW
RDPENGISGQLTWTRLPQGFKNSTLNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYADDLLAA
ATSELDCQQGTRALLQILGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGILLKEGQRWLTEARK
ETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQK
AYQEIQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK
LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLS
NARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLD (配列番号 177)

20

30

【0623】

進化したCas9バリエント:

進化したCas9バリエント:Cas9 H721Y+R753G

【0624】

40

50

【化 2 4】

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD
SGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDK
KHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFL
IEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLYEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGCHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF
YKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKEVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGG

10

20

30

(配列番号178)

【0 6 2 5】

進化したCas9バリエーション: Cas9 E102K + R753G

40

【0 6 2 6】

50

【化 2 5】

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD
SGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLKESFLVEEDK
KHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFL
IEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDE
LVKVMGGHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRK
VLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYS
VLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKKHYLDEIIEQISEFSKR VILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTL
TNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGG

10

20

30

(配列番号179)

【0 6 2 7】

進化したCas9バリエント:Cas9 E102K+H721Y+R753G

40

【化 2 6】

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA
EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLKESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYALAHMIKFRGHFLIEGDL
NPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGE
KKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADL
FLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKY
KEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTF
DNNGSIHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW
MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVY
NELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLYEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVK
VMGGHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQL
QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDK
NRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK
RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKV
REINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGK
ATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLMS
PQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVV
AKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLE
LENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQ
HKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGA
PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGG (配列番号 180)

10

20

30

【0 6 2 8】

MMLV RT突然変異を含む改変PE融合タンパク質アミノ酸配列:

MMLV P111L+V223A+T287A+G316Rを含むPE融合タンパク質

40

【化 2 7 - 1】

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDD
SFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRIL
YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAIL

50

【化 2 7 - 2】

SARLSKSRKLENLIAQLPGEEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDT
YDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH
HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG
TEELLVKLKREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKN
LPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR
KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI
LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD
KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAG
SPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEE
GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVP
QSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN
LTKAERGGLSELKAGFIKQQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT
LKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDY
KVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI
VWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD
KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAK
GYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHY
EKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKH
KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETR
IDLSQLGGDSGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSTLNIEDEYRLHET
SK
EPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTPVS
IKQYPMSQEARL
GIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRLVQDLREV
NKRVEDIHPTVP
NPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEM
GISGQLTWTR
LPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYADDLLAATSELD
CQQGTRALLQ
TLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKEAVMGQPT
PKTPRQL
REFLGKAGFCRLFIPRFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQ
ALLTAPAL
GLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGW
PPCLRM
VAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQ
ALLDT
DRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDSGGSKRTADGSEFESPKKKR
KVGS
GPA
AKRVKLD (配列番号 181)

10

20

30

40

【0 6 2 9】

Cas9 (R753G) および S60Y + C157F + V223A + T246I に rev. 転写酵素突然変異を含む MMLV RT を含む PE 融合タンパク質

【化 2 8】

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEFSNEMAKVDDS
FFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLLI
YLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAIL
SARLSKSRKLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDT
YDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH
HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG
TEELLVKLKREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKIL
TFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKN
LPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR
KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI
LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTIAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD
KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSHEHIANLAG
SPAIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEE
GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVP
QSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN
LTKAERGGSELKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT
LKSKLVSDFRKDFQYKVRINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDY
KVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI
VWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP
KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKLKS VKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAK
GYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHY
EKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD
KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETR
IDLSQLGGDSGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSTLNIEDEYRLHETSK
EPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTPVYIKQYPMSEQEARL
GIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVP
NPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFFRLRHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTR
LPQGFKNSTPLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYADDLLAATSELDCQQGTRALLQ
ILGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLR
EFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQKAYQEIKQALLTAPALG
LPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMV
AAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTD
RVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGSPAA
KRVKLD (配列番号 182)

10

20

30

40

【0 6 3 0】

追加の MMLV バリエント (配列番号 183 ~ 184):

MMLV バリエント: V223M + T306K + A462S

【化 2 9】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTP
VSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLR
EVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLRLHPTSQPLFAFEWR
DPEMGISGQLTWTRL PQGFKNSPTLFNEALHRDLAD FRIQHPDLILLQYMDDL LAA
TSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARK
ETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGP DQQK
AYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKK
LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLS
NARMTHYQSLLLD TDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC LD (配列番号 183)

10

【0 6 3 1】

MMLVバリエーション:D200N+E302K

【化 3 0】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIPLKATSTP
VSIKQYPMSQEARLGKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLR
EVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLRLHPTSQPLFAFEWR
DPEMGISGQLTWTRL PQGFKNSPTLFNEALHRDLAD FRIQHPDLILLQYVDDL LLAAT
SELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLG YLLKEGQRWLTEARKE
TVMGQPTPKTPRQLRKFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGP DQQK
AYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKK
LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLS
NARMTHYQALLLD TDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC LD (配列番号 184)

20

30

Er RT野生型:

DTSNLMEQILSSDNLNRAYLQVVRNKGAE GVDGMKYTELKEHLAKNGETIKGQLRT
RKYKQPQARRVEIPKPDGGVRNLGVPTVTDRFIQQAIAQVLTPIYEEQFHDHSYGFR
PNRCAQQAILTALNIMNDGNDWIVIDIDLEKFFDTVNHDKLM T LIGRTIKDGDVISIV
RKYLVS GIMIDDEYEDSIVGTPQGGNLSPLL ANIMLNELDKEMEKRGLNFVRYADDC
IIMVGSEMSANRVMRNISR FIEEKLGLKVNMTKSKVDRPSGLKYLGF GFYFD PRAHQ
FKAKPHAKSVAKFKKRMKELTCRSWGVSN SYKVEKLNQLIRGWINYFKIGSMKTLC
KELDSRIRYRLRMCIWKQWKTPQNQEKNLVKL GIDRNTARRVAYTGKRIAYVCNKG
AVNVAISNKRLASFGLISMLDYYIEKCVTC (配列番号 185)

40

Rs09415 RT(または「CRISPR-RT」)野生型:

NSQAQSACCAGANQIVEGATLEKVVAPACLQQAWTRVRKNKG GPGGDGV TIEIFAQ
NAEVELEKLRAETLAGIYRPRKVRHAIVPKPKGGERKLTIPSVVDRILQTATMLS LGQ
TVDHHFSSASWAYREGRGVDDALADLRRLRNSGLFWTFDADIMQYFDRILHKRLID
DLFIWVDDL RIVRLIQLWLR SF SYWGRGIAQGAPISPLL ANLFLHPMDRLL ELEG LA
SVRYADDFVVL CRSKALAQKAQLIVASHLAARGLKLNMSKTRILAPSEAFIFLGQTVE
PVWDTQP (配列番号 56)

HIV-MMLV:

PISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNT

50

PVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDA
YFSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFK
KQNPDIVIYQYMDDLYVGSdleIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPPFL
WMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQLVGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLL
RGTKALTEVIPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQGWTYQI
YQEPFKNLKTGKYARMRGHAHTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKET
WETWWTEYWQATWIPEWEFVNTPLVKKLVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAE
AHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTS
AQRAELIALTQALKMAEGKKLVYTDsRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNK
DEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLI
EN(配列番号46)

10

【0632】

Ec48バリエーション:3.23、3.35、3.36、3.37、3.38、3.5、3.501、3.8(配列番号188~195):

Ec48バリエーション3.23:

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPsFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQKKGLVYTRLDDITVSSKISNYDFSQMQS
HIERMLSEHNLPINKHKTKIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDEVKRIRASIHNLLK
LAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVSELGRVGQEEYESFKKQLQAIKPMPSKRDVAVI
DAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESfKEKLECFKSRLASLKPL
(配列番号188)

20

【0633】

Ec48バリエーション3.35(またはEc48-evo2):

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDKKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPsFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTKIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESfKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号189)

30

【0634】

Ec48バリエーション3.36:

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKVLsISVEELKAIAELSLDEKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPsFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQKKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTKIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESfKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号190)

40

【0635】

Ec48バリエーション3.37:

GRPYVTLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDKKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPsFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTKIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLLK

50

LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号191)

【0636】

Ec48バリエーション3.38:

GRPYVTNLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDKKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPSFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKT KIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPFDKVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号192)

10

【0637】

Ec48バリエーション3.500:

GRPYVTNLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KKIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPSFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALDYLVDDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKT KIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSNRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号193)

20

【0638】

Ec48バリエーション3.501:

GRPYVTNLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KKIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPSFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRTVFEEILHIKDEALDYLVDDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKT KIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTS MAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSNRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号194)

30

【0639】

Ec48バリエーション3.8(またはEc48-evo1):

【0640】

GRPYVTNLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINKRIFKELVVFPSFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLVDDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHDL PINKHKT KIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDEVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEEYKS FKKQLQAIKPMPSKRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKKKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号195)

40

【0641】

E60K、E165D、S151T、V303M、K343N(配列番号193~194)を含むEc48バリエーション:

Ec48バリエーション3.500:

GRPYVTNLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KKIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPSFLFGSVPSKNDVLNSNVKR

50

DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALDYLV DICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTKIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSNRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号193)

【0642】

Ec48バリエーション3.501:

GRPYVTNLNMGFMDFKFPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KKIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPSFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRTVFEEILHIKDEALDYLV DICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTKIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTSMAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSNRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号194)

【0643】

Tf1バリエーション:5.131、5.27、5.47、5.59、5.60、5.612、5.618(配列番号196
~202):

Tf1バリエーション5.131:

ISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPKLPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQE
NYRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVV
DYRPLNKYVKPNYPLPLIEQLLTKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCR
PRGVFEYLVMPY GISTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIHKSSESEHVKHV
KDLVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNR
KELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKL LKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVLRFHDFSKKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVS
DKEMLAIIKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEINYRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号196)

【0644】

Tf1バリエーション5.27:

ISSSKHTLSQMNKASNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPVMFVPRKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPY GISTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIHKSSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKL LKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFSKKILLETDA SDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号197)

【0645】

Tf1バリエーション5.47:

ISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPVMFVPRKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPY GISTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIHKSSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKL LKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFSKKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF

NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号198)

【0646】

Tf1バリエーション5.59:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPKLPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQE
NYRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVV
DYKPLNKYVKPNIIYPLPLIEQLLTKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFRCP
PRGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDLILHSKSESEHVVKHV
KDV LQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNR
KELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVL RHFD FSKKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVS
DKEM LAI IKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号199)

10

【0647】

Tf1バリエーション5.60:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNIIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDLILHSKSESEHVVKHV
DVL QKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLR RHFD FSKKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEM LAI IKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISISGGGSKRTADGSEFE
PKKKRKV(配列番号200)

20

【0648】

Tf1バリエーション5.612:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPKLPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQE
NYRLPLRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVV
DYRPLNKYVKPNIIYPLPLIEQLLTKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFRCP
PRGVFEYLVMPYGIKTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDLILHSKSESEHVVKH
VKDV LQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFLGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKN
RKELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVS
PPVL RHFD FSKKILLETDVSDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSV
SDKEM LAI IKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQ
DFNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号201)

30

【0649】

Tf1バリエーション5.618:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVMFVPKKEGTLRMVVD
YRPLNKYVKPNIIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDLILHSKSESEHVVKHV
DVL QKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLR RHFD FSKKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEM LAI IKSLEHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号202)

40

【0650】

S188K、I260L、R288Q、Q293K、I64L、I64W、N316Q、K321R、L133Nを含むTf1バリエーション(配列番号203~213):

Tf1バリエーションS188K:

50

ISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPYGIKTAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIHKSSESEHV KHV
KDV LQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNR
KELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVL RHFD FSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVS
DKEM LAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEIN YRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号 203)

【0651】

10

Tf1 バリアント I260L:

ISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPYGI STAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIHKSSESEHV KHV
DVL QKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFLGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVL RHFD FSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEM LAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEIN YRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号 204)

20

【0652】

Tf1 バリアント R288Q:

ISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPYGI STAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIHKSSESEHV KHV
DVL QKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNQK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVL RHFD FSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEM LAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEIN YRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号 205)

30

【0653】

Tf1 バリアント Q293K:

ISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPYGI STAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIHKSSESEHV KHV
DVL QKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRKFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVL RHFD FSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEM LAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEIN YRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号 206)

40

【0654】

Tf1 バリアント I64L:

ISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPLRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGTLRMV
DYKPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFR
PRGVFEYLVMPYGI STAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIHKSSESEHV KHV
KDV LQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNR
KELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP

50

PVLRHFDFSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVS
DKEMPLAIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号207)

【0655】

Tf1バリエーションI64W:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPWRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGIRESKAINACPMFVPKKEGTLRMVV
DYKPLNKYVKPNYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFCR
PRGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDLILHSKSESEHVKHV
KDLVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNR
KELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVLRHFDFSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVS
DKEMPLAIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号208)

10

【0656】

Tf1バリエーションN316Q:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGIRESKAINACPMFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDLILHSKSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLQKLLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSD
KEMPLAIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号209)

20

【0657】

Tf1バリエーションK321R:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGIRESKAINACPMFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDLILHSKSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKRDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSD
KEMPLAIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号210)

30

【0658】

Tf1バリエーションL133N:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGIRESKAINACPMFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNYPLPNIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFCRCP
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDLILHSKSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFSKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSD
KEMPLAIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号211)

40

【0659】

Tf1バリエーションK118R:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN

50

YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVMFVPKKEGTLRMVVD
YRPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPYGIISTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDDILIHKSSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILT DHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号 212)

【0660】

Tf1 バリエーション 297Q:

【0661】

ISSKHTLSQMNKVS NIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVMFVPKKEGTLRMVVD
YKPLNKYVKPNIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCP
RGVFEYLVMPYGIISTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMDDILIHKSSESEHVKHVK
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHSQVVKFIGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLRHFDFS KILLET DASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSD
KEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILT DHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALS RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI (配列番号 213)

【0662】

Tf1_1 max: TF1 バリエーションを含む PE 融合タンパク質

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD
RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSF
FHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADRLIY
LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS
ARLSKSRKLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTY
DDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH
QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTE
ELLVKLKREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILT
FRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNL
PNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV
TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILE
DIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ
SGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGD SLHEHIANLAGSP
AIKKGILQTVKVVDLKVVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGI
KELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQS
FLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT
KAERGGLSELDAKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
SKLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW
DKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKEVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGK
SPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQ
AENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDL SQ
LGGDSGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSSISSKHTLSQMNKVS NIVKE
PELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQENYRLPIRNYPLPPGKMQAM
NDEINQGLKSGIIRESKAINACPVMFVPKKEGTLRMVVDYRPLNKYVKPNIYPLPLIE
QLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLAFRCPRGVFEYLVMPYGIKTAPAH

10

20

30

40

50

FQYFINTILGEAKESHVVCYMDLILHSKSESEHVKHVKDVLQKLKNANLIINQAKCE
FHQSQVKFLGYHISEKGFTPCQENIDKVLQWKQPKNQKELRQFLGQVNYLRKFIPKT
SQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSPVLRHFDFSKILLETDASD
VAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSDKEMLAIIKSLKHWRYLES
TIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDFNFEINYRPGSANHIADALS
RIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISISGGGSKRTADGSEFESPKKKRKVGSGPAAKRVKL
D(配列番号246)

【0663】

Tf1_2 max:TF1バリエーションを含むPE融合タンパク質

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD
RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF
FHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIY
LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS
ARLSKSRKLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTY
DDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH
QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTE
ELLVKKLREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILT
FRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNL
PNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV
TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILE
DIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ
SGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSP
AIKKGILQTVKVVDLKVVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGI
KELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQS
FLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT
KAERGGLSELDAKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
SKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW
DKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLYLASHYEKLG
SPEDNEQKQLFVEQHKKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQ
AENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDL SQ
LGGDSSGSSGGGSKRTADGSEFESPKKKRKVGSGSSGSSSISSSKHTLSQMKNKVSNI
VKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQENYRLPIRNYPLTPVKM
QAMNDEINQGLKGGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVDYRPLNKYVKPNVYPLPL
IEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCPRGVFEYLVMPYGIKTAPA
HFQYFINTILGEAKESHVVCYMDLILHSKSESEHVKHVKDVLQKLKNANLIINQAKC
EFHQSQVKFLGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNQKELRQFLGQVNYLRKFIPK
TSQLTHPLNKLKLDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSPVLRHFDFSKILLETDVS
DVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSDKEMLAIIKSLEHWRHYLE
STIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDFNFEINYRPGSANHIADAL
SRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISISGGGSKRTADGSEFESPKKKRKVGSGPAAKRVK
LD(配列番号247)

【0664】

Tf1_3 max:TF1バリエーションを含むPE融合タンパク質

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD
RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF
FHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIY
LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS

10

20

30

40

50

ARLSKSRKLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTY
DDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH
QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTE
ELLVKKLKREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILT
FRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMNTNFDKNL
PNEKVLPKHSLLEYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV
TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILE
DIVLTTLTLFEDREMIEERLKTIAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ
SGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSP
AIKKGILQTVKVVDLKVVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGI
KELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQS
FLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT
KAERGGLSELDAKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
SKLVSDFRKDFQFYKVBREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVY
DVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW
DKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKEKKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKG
SPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHRRDKPIREQ
AENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDL SQ
LGGDSGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSSISSSKHTLSQMKNKVSNIKE
PELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQENYRLPIRNYPLTPVKMQAM
NDEINQGLKSGIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVDYRPLNKYVKPNYPLPLIE
QLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRPGVF EYLVMPYGIKTAPA
HFQYCINTILGEAKESHVVCYMDDILIHSESEHVKHVKDVLQKLKNANLIINQAK
CEFHQSQVKFLGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNQKELRQFLGQVNYLRKFIP
KTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSPVLRHFD FSKILLETDV
SDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSDKEMLAIIKSLEHWRHYL
ESTIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDFNFEINYRPGSANHIADA
LSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISISGGSKRTADGSEFESPKKKRKVGSGPAAKRV
KLD (配列番号248)

10

20

30

【0665】

Tf1_4 max:TF1バリエーションを含むPE融合タンパク質

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD
RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSF
FHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLR LIY
LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS
ARLSKSRKLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTY
DDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH
QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTE
ELLVKKLKREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILT
FRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMNTNFDKNL
PNEKVLPKHSLLEYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV
TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILE
DIVLTTLTLFEDREMIEERLKTIAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ
SGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSP
AIKKGILQTVKVVDLKVVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGI
KELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQS
FLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT
KAERGGLSELDAKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK

40

50

SKLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVV
DVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW
DKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKEKKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKG
SPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQ
AENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDL SQ
LGGDSGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSSISSSKHTLSQM NKVSNIVKE
PELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQENYRLPIRNYPLTPVKMQAM
NDEINQGLKSGI IRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVDYKPLNKYVKPNYPLPLIE
QLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRPGVF EYLVMPY GISTAPAH
FQYCINTILGEAKESHVVCYMD DILHSKSESEHV KHV KDV LQKLKNANLIINQAKCE
FHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNRKELRQFLGSVNYLRKFIPKT
SQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSPVLRHFD FSKILLETDVSD
VAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSDKEM LAIKSLEHWRHYLES
TIEPFKILT DHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDFNFEIN YRPGSANHIADALS
RIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISISGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGSPA AKRVKL
D (配列番号249)

10

【0666】

Tf1_5 max:TF1バリエーションを含むPE融合タンパク質

20

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD
RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSF
FHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIY
LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS
ARLSKSRKLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTY
DDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH
QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTE
ELLVKLKREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILT
FRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNL
PNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV
TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILE
DIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ
SGKTILDFLKSDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGD SLHEHIANLAGSP
AIKKGILQTVKVVDLVLKVMGRHKPENIVIE MARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGI
KELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDAIV PQS
FLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT
KAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
SKLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVV
DVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW
DKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKY
GGFDSPTVAYSVLVVAKEKKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKE
VKKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKG
SPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQ
AENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDL SQ
LGGDSGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSSISSSKHTLSQM NKVSNIVKE
PELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQENYRLPIRNYPLTPVKMQAM
NDEINQGLKGGI IRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVDYRPLNKYVKPNVYPLPLIE
QLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRPGVF EYLVMPY GISTAPAH
FQYFINTILGEAKESHVVCYMD DILHSKSESEHV KHV KDV LQKLKNANLIINQAKCE
FHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNRKELRQFLGSVNYLRKFIPKT

30

40

50

SQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSPPVLRHFD FSKILLETDVSD
VAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYSAKMSKAQLNYSVSDKEMLAIKSLEHWRHYLES
TIEPFKILTDHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDFNFEINYRPGSANHIADALS
RIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISISGGGSKRTADGSEFESPKKKRKGSGPAAKRVKL
D(配列番号250)

【0667】

PERVバリエーション:21および21.6(配列番号214~215):

PERVバリエーション21:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLLIQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVDIHTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLG YRASAKKAQICRREVTYLGYS LRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLG TAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRG LLTSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQ MADRVAKQAAQAVNLLPI(配列番号214)

10

20

【0668】

PERVバリエーション21.6(D199N、T305K、W312F、E329P、およびL602W置換を含む五変異体):

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLLIQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVDIHTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLG YRASAKKAQICRREVTYLGYS LRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLGKAGFCRLFIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRG WLTSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQ MADRVAKQAAQAVNLLPI(配列番号215)

30

【0669】

D199N、T305K、W312F、G329P、L604W(配列番号216~221)を含むAVIREバリエーション:

AVIRE野生型

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLL PVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHTVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDL KDAFFCIPLAPESQLIFAFWA
DAEEGESGQLTWTRLPQGFKNSPTL FDEALNRDLQGFRLDHPVSLLQYVDDL LIAA
DTQAACLSATRDLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLG TIGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEA
FQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRPVAYLSKRLD
PVAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNL ESSLRSPDKWL TNARIT
QYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHCLDTLDSL TSTRPDLT DQPL
AQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLD SVIWAEP LPIGTSAQKAELIALTKALE
WSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGM IYRERGLLTAGGKA IKNAP EILALLTAVWLPK

40

50

RVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQY
SNVEEALG (配列番号 216)

【0670】

AVIRE-RT(D199N):

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHPTVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFEWA
DAEEGESGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFNEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLMLTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGITGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEA
FQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRLD
PVAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPDKWLTNARIT
QYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTQPL
AQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSEIWAEPPIGTSAQKAELIALTKALE
WSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIRERGLLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPK
RVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQY
SNVEEALG (配列番号 217)

10

【0671】

AVIRE-RT(T305K):

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHPTVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFEWA
DAEEGESGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFDEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLMLTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGKIGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEA
FQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRLD
PVAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPDKWLTNARIT
QYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTQPL
AQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSEIWAEPPIGTSAQKAELIALTKALE
WSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIRERGLLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPK
RVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQY
SNVEEALG (配列番号 218)

20

30

【0672】

AVIRE-RT(W312F):

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHPTVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFEWA
DAEEGESGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFDEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLMLTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGITGYCRLFIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEAF
QSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRDP
VAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPDKWLTNARITQ
YQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTQPLA
QAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSEIWAEPPIGTSAQKAELIALTKALEWS
KDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIRERGLLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPKRV
AVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQYSN
VEEALG (配列番号 219)

40

【0673】

AVIRE-RT(G329P):

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP

50

VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLPVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHPTVPNPYTLSSLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFEWA
DAEEGESGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFDEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGITIGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRPGNDPLVWGEKEEEA
FQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRDL
PVAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPPDKWLTNARIT
QYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTQPL
AQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSEIWAEPPIGTSAQKAELIALTKALE
WSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIRERGLLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPK
RVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQY
SNVEEALG (配列番号220)

10

【0674】

AVIRE-RT(L604W):

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLPVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTETIHPTVPNPYTLSSLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFEWA
DAEEGESGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFDEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGITIGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEA
FQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRVPVAYLSKRDL
PVAAGWPRCLRAIAAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPPDKWLTNARIT
QYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTQPL
AQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSEIWAEPPIGTSAQKAELIALTKALE
WSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIRERGWLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLK
RVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQ
YSNVEEALG (配列番号221)

20

【0675】

D197N、T303K、W310F、E327P、L599W (配列番号222~227)を含むKORVバリ
アント

30

KORV野生型:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPMMSKEAREGIRPHIQRFDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVDIHTPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGN TGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFRLNPQVVMLQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRLQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLGYLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLGITAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAH
QEAFGRIKEALLSAPALALPDLT KPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLP EGTS AQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLT SAGKDIKNKEEILALLEAIHLP
KRVAIHCPGHQRGTD PVATGNRKAD EAAKQAAQSTRILTETT KNQE HFEPTRGK (配
列番号222)

40

【0676】

KORV-RT D197N:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPMMSKEAREGIRPHIQRFDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVDIHTPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGN TGQLTWTRLPPQGFKNSPTLFNEALHRDLASFRLNPQVVMLQYVDDL

50

LVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLG YLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAH
QEAFGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPD LRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLPEG TSAQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLP
KRVAIHCPGHQRGTD PVATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETT KNQEHFEPTRGK(配
列番号223)

10

【0677】

KORV-RT T303K:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPM SKEAREGIRPHIQRFDLGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKR VQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKD AFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLG YLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLGKAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAH
QEAFGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPD LRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLPEG TSAQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLP
KRVAIHCPGHQRGTD PVATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETT KNQEHFEPTRGK(配
列番号224)

20

【0678】

KORV-RT W310F:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPM SKEAREGIRPHIQRFDLGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKR VQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKD AFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLG YLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLG TAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAH
QEAFGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPD LRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLPEG TSAQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLP
KRVAIHCPGHQRGTD PVATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETT KNQEHFEPTRGK(配
列番号225)

30

【0679】

KORV-RT E327P:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPM SKEAREGIRPHIQRFDLGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDL
REVNKR VQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKD AFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLG YLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAH
QEAFGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPD LRD

40

50

QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLPEGTSAQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTDSDRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEIAHL
KRVAIHCPGHQRGTDVPVATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETTKNQEHEFETRKG(配
列番号226)

【0680】

KORV-RT L599W:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGLVPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVDIHTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGN TGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFALNPQVVMLQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRLQELSKLGYRVS AKKAQLCREEVTYLG YLLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAH
QEA FGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLT LGQNV LVIAPHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLPEGTSAQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTDSDRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEIAHL
PKRVAIHCPGHQRGTDVPVATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETTKNQEHEFETRKG(配
列番号227)

【0681】

D197N、T303K、W311F、E327P、L599W(配列番号228~233)を含むWMSVバ
リエーション:

WMSV-RT野生型:

LNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGLVLPVCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGN TGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFALNPQVVLLQYVDDL
VAAPTYRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPTPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKAVA AVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTDSDRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEIAHL
PKRVAIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号228)

【0682】

WMSV-RT D197N:

LNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGLVLPVCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGN TGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLAPFALNPQVVLLQYVDDL
VAAPTYRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPTPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKAVA AVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTDSDRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEIAHL
PKRVAIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号229)

【0683】

WMSV-RT T303K:

LNLEEEYRLHEKVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGVLVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGN TGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLV
AAPT YRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPPTTPRQVREFLGKAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKAVA AVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLN PATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKR
VAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号230)
【0684】

10

WMSV-RT W311F:

LNLEEEYRLHEKVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGVLVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGN TGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLV
AAPT YRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPPTTPRQVREFLG TAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKAVA AVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLN PATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKR
VAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号231)
【0685】

20

WMSV-RT E327P:

LNLEEEYRLHEKVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGVLVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGN TGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLV
AAPT YRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKAVA AVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLN PATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKR
VAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号232)
【0686】

30

40

WMSV-RT L599W:

LNLEEEYRLHEKVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFDLGVLVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGN TGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLV
AAPT YRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVS AKKAQLCQKEVTYLG YLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPPTTPRQVREFLG TAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL

50

DPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLT LGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLN PATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQPLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVD GKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号233)

【0687】

D199N、T305K、E329P、L602W(配列番号234~238)を含むPERVバリエーション
PERV-RT D199N:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLLPVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVDIHTPTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQV TLLQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREV TYLGYSLRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLG TAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAP EH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVT KPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRG NQMADRVAKQAAQAVNLLPI(配列番号234)

10

20

【0688】

PERV-RT T305K:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLLPVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVDIHTPTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQV TLLQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREV TYLGYSLRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLGKAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAP EH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVT KPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRG NQMADRVAKQAAQAVNLLPI(配列番号235)

30

【0689】

PERV-RT W313F:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLLPVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVDIHTPTVPNPYNLLSALPPERNNWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQV TLLQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREV TYLGYSLRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLG TAGFCRLFIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAP EH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVT KPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTD SRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRG NQMADRVAKQAAQAVNLLPI(配列番号236)

40

【0690】

50

PERV-RT E329P:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVDIHP TVPNPYNLLSALPPER NWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREV TYLGYSLRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLG TAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQMADRVAKQAAQAVNLLPI (配列番号237)

10

【0691】

PERV-RT L602W:

TLQLDDEYRLYSPQVKPDQDIQSWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASAT
PVSVRQYPLSREAREGIWPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVDIHP TVPNPYNLLSALPPER NWYTVL DLKDAFFCLRLHPTSQPLFAF
EWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTL LQYVDDL
LLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREV TYLGYSLRGGQRWLTEA
RKKT VVQIPAPTTAKQVREFLG TAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEH
QKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLT LGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLT
DIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGHTI WASSLPEGTSAQKAELMAL
TQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGREIKNKEEILSLLEAL
HLPKRLAIHCPGHQKAKDLISRGNQMADRVAKQAAQAVNLLPI (配列番号238)

20

【0692】

38.14バリエーション(配列番号239~240)を含むNe144:

Ne144 RT野生型

30

AGQPTSREALYERIRSTSKEEVILEEMIRLGFWPAQGAVPHDPAEEIRRRGELERQLS
ELREKSRKLYNEKALIAEQRKQRLAESRRKQKETKARRERERQERAQKWAQRKAGEI
LFLGEDVSGGMSHKTCDAELIKREGVPAIASAEELARAMGIALKELRFLAYNRKVS RV
THYRRFLLPKKTGGLRLISAPMPRLKRAQAWALEHIFNKLSFEPAAHG FVAGRSIVS
NARPHVGADV VVNLDLKDFFPTVSFPRVKGALRHLGYSESVATALALVCTEPEVDEV
GLDGT TWYVARGERFLPQGSPCSPAITNLLCRRLDRRLHGLAQA LGFVYTRYADDLT
FSGRGEAAESKRVGKLLRGAADIVAHEGFV VHPDKTRVMRRGRRQEVTGVVVNDKT
SVPRDEL RKFRATLYQIEKDGPADKRWGN GGDVLA AVHGYACFVAMVDPSRGQPLL
ARARALLAKHGGPSKPPGGSGPRAPT PVQPTANAPEAPKPVAPATPAAPAKKGWKL
F (配列番号239)

40

【0693】

Ne144 RT 38.14:

AGQPTSREALYERIRSTSKEEVILEEMIRLGFWPAQGAVPHDPAEEIRRRGELERQLS
ELREKSRKLYNEKALIAEQRKQRLAESRRKQKETKARRERERQERAQKWAQRKAGEI
LFLGEDVSGGMSHKTCDAELIKREGVPAIASAEELARAMGITL KELRFLTYNRKVS RV
THYRRFLLPKKTGGLRLISAPMPRLKRAQAWALEHIFNKLSFEPAAHG FVAGRSIVS
NARPHVGADV VVNLDLKDFFPTVSFPRVKGALRHLGYSESVATALALVCTEPEVDEV
VLDGT TWYVARGERFLPQGSPCSPAITNLLCRRLDRRLHGLAQA LGFVYTRYADDLT
FSGRGEAAESKRVGKLLRGAADIVAHEGFV VHPDKTRVMRRGRRQEVTGVVVNDKT
SVPRDEL RKFRATLYQIEKDGPADKRWGN GGDVLA AVHGYACFVAMVDPSRGQPLL

50

ARARALLAKHGGPSKPPGGSGPRAPTPVQPTANAPEAPKPVAPATPAAPAKKGWKL
F(配列番号240)

【0694】

25.8バリエーション(配列番号241~242)を含むVc95:

Vc95 RT野生型:

NILTTTLREQLLTNNVIMPQEFERLEVRGSHAYKVYSIPKRKAGRRTIAHPSSSKLKICQ
RHLNAILNPLLKVHDSSYAYVKGRSIKDNALVHSHSAYVLKMDFQNFNSITPTILR
QCLIQNDILLSVNELEKLEQLIFWNPSKKRNGKLILSVGSPISPLISNAIMYPFDKIIN
DICTKHGINYTRYADDITFSTNIKNTLNKLPEIVEQLIIQTYAGRIIINKRKTVFSSKKH
NRHVTGITLTNDSKISIGRSRKRYISSLVFKYINKNLDIDEINHMKGMLAFAYNIEPIY
IHRLSHKYKVNIVEKILRGSN(配列番号241)

10

【0695】

Vc95 RTバリエーション-25.8:

NILTTTLREQLMTNNVIMPQEFERLEVRGSHAYKVYSIPKRKAGRRTIAHPSSSKLKICQ
RHLNAILNPLLKVHDASYAYVKGRSIKDNALVHSHSAYMLKMDFQNFNSITPTILR
QCLIQNDILLSVNELEKLEQLIFWNPSKKRDGKLILSVGSPISPLISNAIMYPFDKIIN
DICTKHGINYTRYADDITFSTNIKNTLNKLPEIVEQLIIQTYAGRIIINKRKTVFSSKKH
NRHVTGITLTNDSKISIGRSRKRYISSLVFKYINKNLDIDEINHMKGMLAFAYNIEPIY
IHRLSHKYKVNIVEKILRGSN(配列番号242)

20

【0696】

図59の配列(配列番号243~245)

AVIRE_penta:

APLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALP
VRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLVRKSGTSEYRMVQDL
REVNKRVTIHTPTVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDFAFFCIPLAPESQLIFAFWA
DAEEGESGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALNRDLQGFRLDHPSVSLQYVDDLLIAA
DTQAACLSATRDLLMTLAEGLYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQA
ILQIPVPKTKRQVREFLGKIGYCRLFIPGFAELAQPLYAATRPNDPLVWGEKEEEAF
QSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRPVAYLSKRLDP
VAAGWPRCLRAIAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPDPKWLTNARITQ
YQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTDQPLA
QAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSDVIWAEPLPIGTSAQKAELIALTKALEWS
KDKSVNIYTDSDRYAFATLHVHGMIRERGWLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPKRV
AVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATISDAPDMPDTETPQYSN
VEEALG(配列番号243)

30

【0697】

KORV_penta:

MNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASP
VAVRQYPMSEAREGIRPHIQRFDLGILVPCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDL
REVNKRVDIHTPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDFAFFCLKLHPNSQPLFAFE
WRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLASFALNPQVVMLQYVDDL
LVAAPTYRDCKEGTRRLQELSKLGYRVSAKKAQLCREEVTYLGYLKGGKRWLTPA
RKATVMKIPTPTTPRQVREFLGKAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAH
QEAFGRIKEALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSK
KLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLTLGQNVLVIAHPHNLESIVRQPPDRWMT
NARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRD
QPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLPEGTSAQKAELIALTQ
ALRLAEGKSINIYTDSDRYAFATAHVHGAIFYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHL
PKRVAIIHCPGHQRGTDVPATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETTKNQEHFEPTRGK(
配列番号244)

40

50

[0 6 9 8]

WMSV_penta:

LNLEEEYRLHEKVPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPV
AVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGLVLPVCQSPWNTPLLVPKKPGTNDYRPVQDL
REINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEW
RDPEKGNLTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLV
AAPTYPDCKEGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQKEVTYLGYYLLKEGKRWLTPAR
KATVMKIPPTTPRQVREFLGKAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQK
AFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKL
DPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTGLQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNA
RMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPNATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQ
PLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQAL
RLAEGKDINIYTDSDRYAFATAHIHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPK
RVAIHCPGHQKGNPVPATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKPQELI(配列番号245
)

10

参考文献(例2)

1. Anzalone, A.V. et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149-157, doi:10.1038/s41586-019-1711-4 (2019).

2. Esvelt, K.M., Carlson, J.C. & Liu, D.R. A system for the continuous directed evolution of biomolecules. *Nature* 472, 499-503, doi:10.1038/nature09929 (2011).

20

3. Taube, R., Loya, S., Avidan, O., Perach, M. & Hizi, A. Reverse transcriptase of mouse mammary tumour virus: expression in bacteria, purification and biochemical characterization. *Biochem J* 332(Pt 3), 807-808, doi:10.1042/bj3320807w (1998).

4. Hizi, A. & Herschhorn, A. Retroviral reverse transcriptases (other than those of HIV-1 and murine leukemia virus): a comparison of their molecular and biochemical properties. *Virus Res* 134, 203-220, doi:10.1016/j.virusres.2007.12.008 (2008).

30

5. Avidan, O., Loya, S., Tonjes, R.R., Sevilya, Z. & Hizi, A. Expression and characterization of a recombinant novel reverse transcriptase of a porcine endogenous retrovirus. *Virology* 307, 341-357, doi:10.1016/s0042-6822(02)00131-9 (2003).

6. Misra, H.S., Pandey, P.K. & Pandey, V.N. An enzymatically active chimeric HIV-1 reverse transcriptase (RT) with the RNase-H domain of murine leukemia virus RT exists as a monomer. *J Biol Chem* 273, 9785-9789, doi:10.1074/jbc.273.16.9785 (1998).

7. Kirshenboim, N., Hayouka, Z., Friedler, A. & Hizi, A. Expression and characterization of a novel reverse transcriptase of the LTR retrotransposon Tf1. *Virology* 366, 263-276, doi:10.1016/j.virol.2007.04.002 (2007).

40

8. Nowak, E. et al. Ty3 reverse transcriptase complexed with an RNA-DNA hybrid shows structural and functional asymmetry. *Nat Struct Mol Biol* 21, 389-396, doi:10.1038/nsmb.2785 (2014).

9. Thuronyi, B.W. et al. Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. *Nat Biotechnol* 37, 1070-1079, doi:10.1038/s41587-019-0193-0 (2019).

10. Richter, M.F. et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nat Biotechnol*

50

38,883-891,doi:10.1038/s41587-020-0453-z(2020).

11.Simon、A.J.、Ellington、A.D.&Finkelstein、I.J.Retrons and their applications in genome engineering.Nucleic Acids Res 47、11007-11019、doi:10.1093/nar/gkz865(2019)。

12.Zhao、C.、Liu、F.&Pyle、A.M.An ultraprocessive、accurate reverse transcriptase encoded by a metazoan group II intron.RNA 24、183-195、doi:10.1261/rna.063479.117(2018)。

13.Toro、N.&Nisa-Martinez、R.Comprehensive phylogenetic analysis of bacterial reverse transcriptases.PLoS One 9、e114083、doi:10.1371/journal.pone.0114083(2014)。

14.Stamos、J.L.et al.Structure of a Thermostable Group II Intron Reverse Transcriptase with Template-Prime and Its Functional and Evolutionary Implications.Mol.Cell.68、926-939(2017)。

【0699】

例3:合理的な操作を使用する改善されたTf1逆転写物

Tf1のさらなる合理的な操作により、Tf1ベースのプライムエディターの編集効率を改善する3つのさらなる突然変異が明らかになった。合計で5つの突然変異、K118R、S188K、I260L、S297QおよびR288QがPEを改善した(図46)。5つすべての突然変異を組み合わせると、編集がさらに改善され、Tf1、Tf1-rat4の最終的に合理的に設計されたバリエーションは、多くの部位でPE2に匹敵する編集を実証した(図47)。

【0700】

さらなる進化は、編集の中程度の改善を示す2つのさらなるバリエーション、Tf1 evo3.1およびTf1 evo3.2をもたらした(図48)。

【0701】

同定された合理的突然変異を最良の進化したバリエーションと組み合わせた。Tf1 evo3.1およびTf1 evo3.2バリエーションと比較して、編集のさらなる小さな改善が観察された。これらの最終バリエーションのいくつか(Tf1 evo3.1、Tf1 evo3.2、Tf1 evo+rat-1、Tf1 evo+rat2)は、8つの異なる部位にわたって平均してPE2よりも高い編集を示した(図49)。

【0702】

Tf1に対する我々の合理的な工学的努力の成功を考慮して、Ec48ベースのプライムエディターの活動を改善するために同様の戦略が適用された。Ec48のAlphaFold構造を利用して、6つの突然変異が編集の改善を予測された:T189N、R378K、K307R、T385R、L182NおよびR315K(図50A~50B)。L182N、R315KおよびT189Nを組み合わせることにより、編集がさらに改善された(図51)。このバリエーションをEc48-v2と命名した。

【0703】

さらに進化したバリエーション、Ec48-evo3が生成され、これはさらに改善された編集(Ec48-evo3)を示した(図52)。次いで、PEmaxアーキテクチャにおいて最良のバリエーションを実施した(図53)。

【0704】

Tf1-rat4:

MISSSKHTLSQMNKVSNI VKEPELPDIYKEFKDITADTNT EKLPKPIKGLEFEVELTQ
ENYRLPIRNYPLPPGKMQAMNDEINQGLKSGI IRESKAINACPV MFVPKKEGTLRMV
VDYRPLNKYVKPN IYPLPLIEQ LLA KIQGSTIFTKLDLKSAYHLIRVRKGDEHKLA FR
CPRGVFEYLVMPYGIKTAPAHFQYFINTILGEAKESHVVCYMD DILIH SKSESEHVKH
VKDVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFLGYHISEKGF TPCQENIDKVLQWKQPKN
QKELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLK KDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLV
SPPVLRHFDFSKKILLETDASDVAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYS
VSDKEMLAIIKSLKHWRHYLESTIEPFKILTDHRNLI GRITNESEPENKRLARWQLFL

10

20

30

40

50

QDFNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDSEDNSINFVNQISI(配列番号251)
【0705】

Tf1evo3.1:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVD
YKPLNKYVVKPNIIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRP
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFYCINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHV
KDV LQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNR
KELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
PVL RHFD FSKKILLET DVSD VAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVS
DKEM LAI IKSLEHWRHYLESTIEPFKILT DHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQD
FNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号252)

10

【0706】

Tf1evo3.2:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKGGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVD
YRPLNKYVVKPNVYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRP
RGVFEYLVMPYGYSTAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHV
DVLQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFIGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKNRK
ELRQFLGSVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLVSP
VLR RHFD FSKKILLET DVSD VAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYSVSD
KEM LAI IKSLEHWRHYLESTIEPFKILT DHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFLQDF
NFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号253)

20

【0707】

Tf1evo+rat-1:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKGGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVD
YRPLNKYVVKPNVYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRP
RGVFEYLVMPYGYIKTAPAHFYFINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHV
KDV LQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFLGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKN
QKELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLV
SPPVLR RHFD FSKKILLET DVSD VAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYS
VSDKEM LAI IKSLEHWRHYLESTIEPFKILT DHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFL
QDFNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号254)

30

【0708】

Tf1evo+rat2:

ISSSKHTLSQMNKVSNIIVKEPELPDIYKEFKDITADTNTTEKLPKPIKGLEFEVELTQEN
YRLPIRNYPLTPVKMQAMNDEINQGLKSGIIRESKAINACPVIFVPRKEGTLRMVVD
YRPLNKYVVKPNIIYPLPLIEQLLAKIQGSTIFTKLDLKSAYHQIRVRKGDEHKLAFCRP
RGVFEYLVMPYGYIKTAPAHFYCINTILGEAKESHVVCYMDILIHKSSESEHVKHV
KDV LQKLKNANLIINQAKCEFHQSQVKFLGYHISEKGLTPCQENIDKVLQWKQPKN
QKELRQFLGQVNYLRKFIPKTSQLTHPLNKLLKKDVRWKWTPTQTQAIENIKQCLV
SPPVLR RHFD FSKKILLET DVSD VAVGAVLSQKHDDDKYYPVGYYS AKMSKAQLNYS
VSDKEM LAI IKSLEHWRHYLESTIEPFKILT DHRNLIGRITNESEPENKRLARWQLFL
QDFNFEINYRPGSANHIADALSRIVDETEPIPKDNEDNSINFVNQISI(配列番号255)

40

【0709】

Ec48-v2:

GRPYVTNLNMGFMDFKPKYKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KEIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINKRIFKELVVFPSFLGSPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALEYLV DICTKDD

50

FVVQGANTSSYIANLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHDLPIKHKTKIFHCSSEPIKVHGLRVDYDSPRLPSDEVKRIRASIHNL
KLLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGKVNKLGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSKRDV
AVIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASL
KPL(配列番号256)

【0710】

Ec48-evo3:

GRPYVTNLNLNGMFMDKFKPYSKSNAPITTTLEKLSKALSISVEELKAIAELSLDEKYTL
KKIPKIDGSKRIVYSLHPKMRLQLSRINERIFKELVVFPSFLFGSVPSKNDVLNSNVKR
DYVSCAKAHCGAKTVLKVDISNFFDNIHRDLVRSVFEEILHIKDEALDYLDICTKDD
FVVQGALTSSYIATLCLFAVEGDVVRRAQRKGLVYTRLVDDITVSSKISNYDFSQMQ
SHIERMLSEHNLPINKHKTKIFHCSSEPIKVHGLIVDYDSPRLPSDKVKRIRASIHNLK
LLAAKNNTKTSVAYRKEFNRCMGRVNELGRVGHEKYESFKKQLQAIKPMPSNRDVA
VIDAAIKSLELSYSKGNQNKHWYKRKYDLTRYKMIILTRSESFKEKLECFKSRLASLK
PL(配列番号257)

【0711】

例4:改善されたM-MLV逆転写酵素

哺乳動物細胞においてM-MLVをPE2よりも効率的に改善するために、個々のPANCE
およびPACE進化突然変異体をN2A細胞でスクリーニングした。突然変異体は、標的編集
に応じて異なる様式で挙動した:いくつかの突然変異は、短いRTTによってコードされる
小さな編集に有用であった。本明細書において使用される場合、「短いRTT」または「
突然変異体の小さいRTTクラス」は、pegRNAが短いRT鑄型(RTTまたはRT鑄型)を有す
る場合にプライム編集を改善するMMLV突然変異体の群を指す。HTTに対するCAG拡大
を崩壊させること、および、いくつかのtwinPE編集を行うことなどの他の突然変異が、
長いRTT編集のために有用であった。突然変異体の小さなRTTクラスから出発して、M-
MLVにおいて進化または操作された13の突然変異は、典型的にはPE2と比較して1.1倍
~1.3倍に編集を改善した(図54)。重要なことに、これらの突然変異体はすべて切断型
M-MLVバリエーションであり、それらのRNaseHドメインを欠いている。RNaseHドメイン
の存在または非存在は、異なる哺乳動物編集を異なってもたらした:一般に、短い編集で
はFL PE2と同等またはそれより良好であったが、より長いRTT編集では編集の減少も引
き起こした。

【0712】

異なる群の変異体は、短いRTT編集には役立たなかったが、ハンチントン病を引き起
こすCAG拡大の補正、およびいくつかのtwinPE編集などの長いRTT編集には役立った。
本発明者らの突然変異体はすべて、切断が突然変異体の編集を改善し、送達目的にとって
より良好であることが分かったので、切断型(RNaseHドメインを欠く)である。切断型突
然変異体をHEK293T細胞における全長PE2と比較した場合、長いRTT編集においてこ
れらの突然変異体からのわずかな改善があった(図55A)。さらに、WT切断型酵素と比較
して改善が見られた(図55B)。これらのような部位では、切断型PE2酵素はWTよりも悪
く機能した。切断型突然変異体はこの活性を回復した。

【0713】

哺乳動物のプライム編集を改善するさらなるPACEおよびPANCE進化および操作され
たCas9突然変異体が同定された。進化手順およびその後の哺乳動物の特徴付けの結果は
、進化において使用された標的編集がその進化の出力に大きく影響し、哺乳動物細胞にお
ける所与の突然変異の効果が標的編集間で変化したことを示した(図56)。これらの洞察
を使用してPE-PACEの治療的可能性を最大化するために、Tay-Sachs病(TSD)の大部分
を引き起こす正確なDNA配列:HEXA 1278 insTATC突然変異を修正するために選択さ
れた疾患特異的回路が開発された。このPACE回路(TSD-PACE)を作成するために、病原
性ヒトHEXA対立遺伝子の断片を、そうでなければ野生型T7 RNAP遺伝子に挿入した。
挿入は、T7 RNAPを分割するためおよび他の用途のために以前に操作されたT7 RNAP

上の無秩序なループの中心の残基であるT7 RNAPタンパク質の残基601で起こるように配置された。挿入されたHEXA断片がフレームシフトTSD対立遺伝子を内包した場合、それはT7 RNAP遺伝子の残りを下流にフレームシフトし、不活性酵素をもたらした。しかしながら、TSD突然変異がプライム編集によって正しく修復された場合、HEXA-T7 RNAP融合のフレームが回復し、gIII転写およびファージ増殖を可能にした(図57A~57C)。

【0714】

コンパクトなEc48およびGs RTを特異的にTSD突然変異に対して進化させるために、PANACEキャンペーンを開始した。これらのRTの両方の配列決定により、以前の選択では濃縮されていなかった固有の突然変異が明らかになった。哺乳動物細胞におけるTSD-PANACE突然変異の影響を評価するために、新たに進化したエディター、ならびに1278 TATCins突然変異を有するように以前に操作されたHEK293T細胞株において産生されたWT酵素および他のバリエーションを試験した。疾患特異的進化からの突然変異は、一般医進化対応物よりも活性をさらに改善した。具体的には、疾患特異的進化により、Ec48はPE2レベルの編集に達することができた(図58A)。追加的に、Gs RTの非常に低ストリンジエンシーの疾患特異的PANACE進化の出力は、異なる標的上の高ストリンジエンシーPAC Eで進化したGs RTバリエーションよりも優れていた(図58B)。

【0715】

均等物および範囲

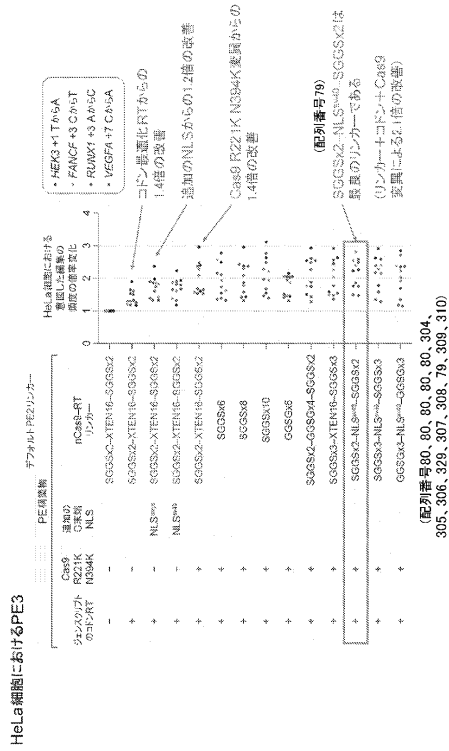
クレームにおいて、「a」、「an」、および「the」などの冠詞は、1または1より多いことを意味してもよいが、それと反する指示がないか、またはそれとは別に、文脈から明らかでない場合に限る。ある群の1以上のメンバー間に「または」を包含する態様または記載は、その群のメンバーのうち、1つ、1つより多いか、または、すべてが、所定の産物またはプロセスに存在するか、それに採用されるか、またはそれとは別に、それに関係があるか、を満たすと考えられるが、それと反する指示がないか、またはそれとは別に、文脈から明らかでない場合に限る。本発明は、その群のうち、正確に1つのメンバーが、所定の産物またはプロセスに存在するか、それに採用されるか、またはそれとは別に、それに関係がある態様を包含する。本発明は、その群のメンバーのうち、1つより多いかまたはすべてが、所定の産物またはプロセスに存在するか、それに採用されるか、またはそれとは別に、それに関係がある態様を包含する。

【0716】

さらには、本開示は、列挙されたクレームの1以上からの1以上の限定、エレメント、節、および記述用語(descriptive terms)が、別のクレーム中へ導入される、すべての変動、組合せ、および順列を包括する。例えば、別のクレームに従属するいずれのクレームも、同じ基本クレームに従属するいずれか他のクレーム中に見出される1以上の限定を包含するように改変され得る。要素が、例として、マーカッシュ群形式において列挙されたものとして提示されている場合、要素の各下位群もまた開示されており、いずれの要素(単数または複数)も群から除去され得る。一般に、本発明、または本発明の側面が、特定のエレメントおよび/または特長を含むとして見なされる場合、本発明のある態様または本発明のある側面は、このようなエレメントおよび/または特長からなるか、または実質的に次いでなると理解されるべきである。簡潔さを目的として、それらの態様は、本明細書において、in haec verbaで具体的に表明されていない。「含むこと(comprising)」および「含有すること(containing)」という用語が、オープンであることが意図され、追加のエレメントまたは工程の包含を容認することにもまた留意されたい。範囲が与えられるとき、エンドポイントも包含される。さらには、別段の指示がないか、またはそれとは別に、文脈および当業者の理解から明らかでない場合に限り、範囲として表現された値は、いずれか具体的な値、または本発明の異なる態様において述べられた範囲内の部分範囲を、文脈が明確に別段の指図をしない限り範囲の下限の単位の10倍まで、想定し得る。

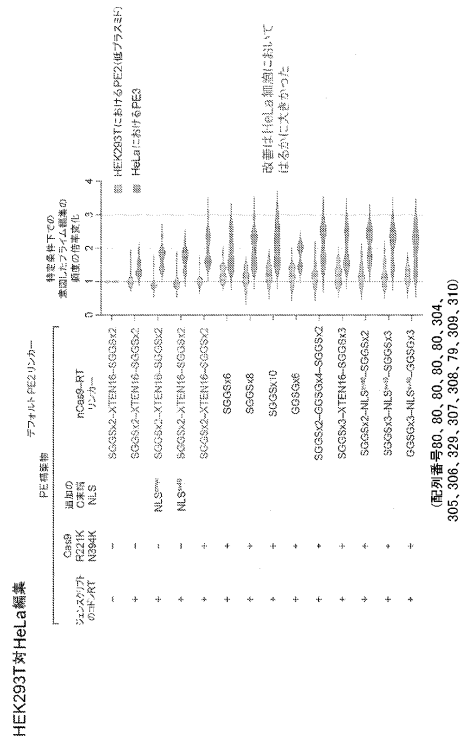
【0717】

【圖 3】



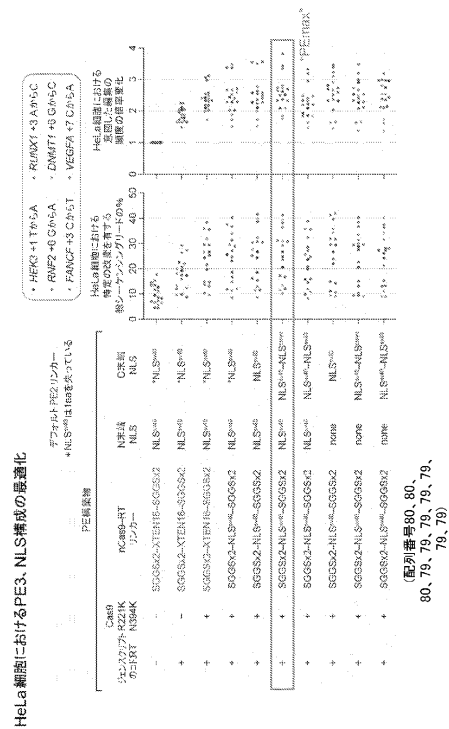
3
✕

【図 4】

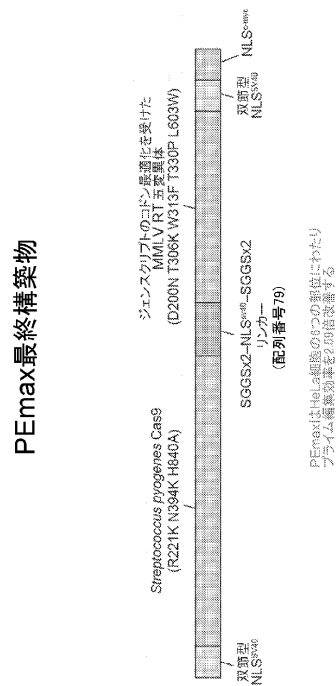


4. ☒ 10

【図 5】



【図 6】



【図 7】

PEmaxは意図した編集に加えてインデルを増加させる

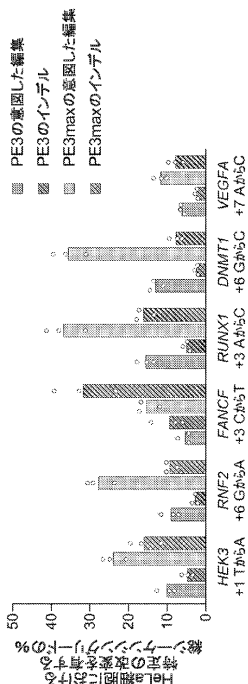


図 7

【図 8 A】

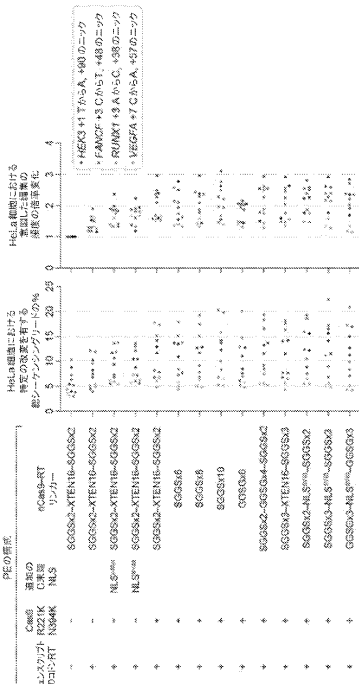


図 8A

【図 8 B】

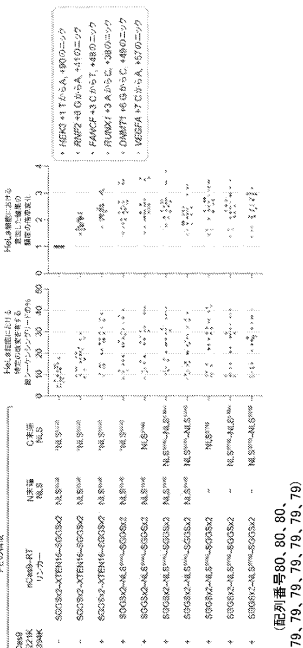


図 8B

【図 8 C】

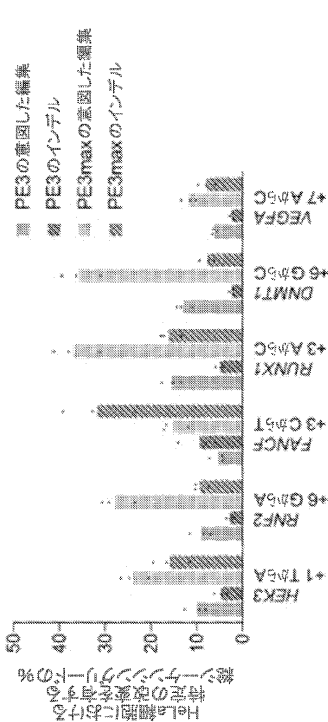
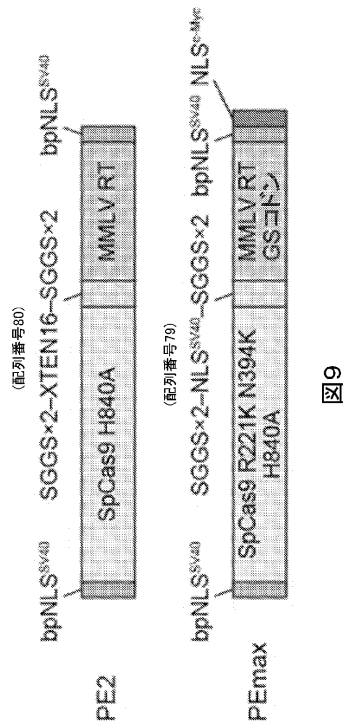
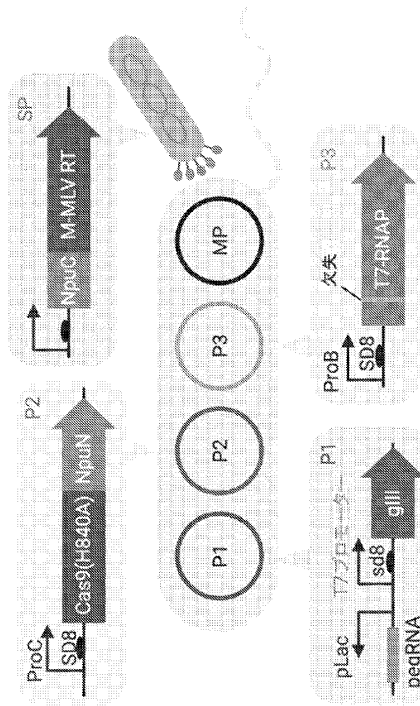


図 8C

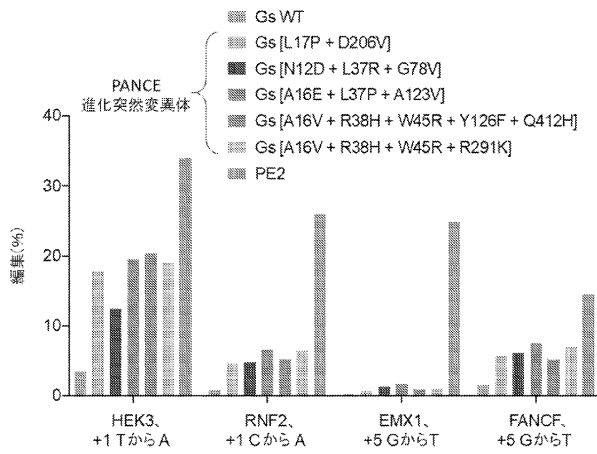
【図 9】



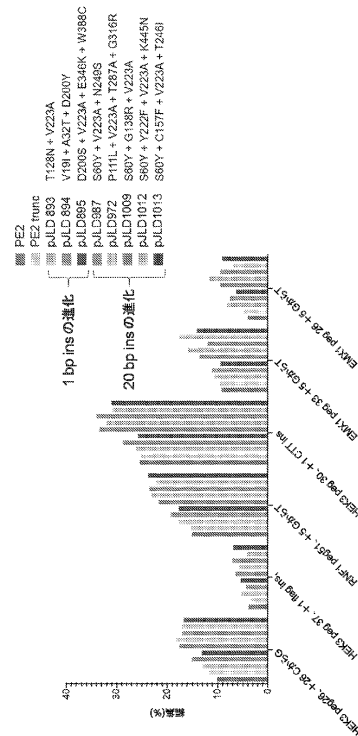
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

20

30

40

50

【図 1 3】

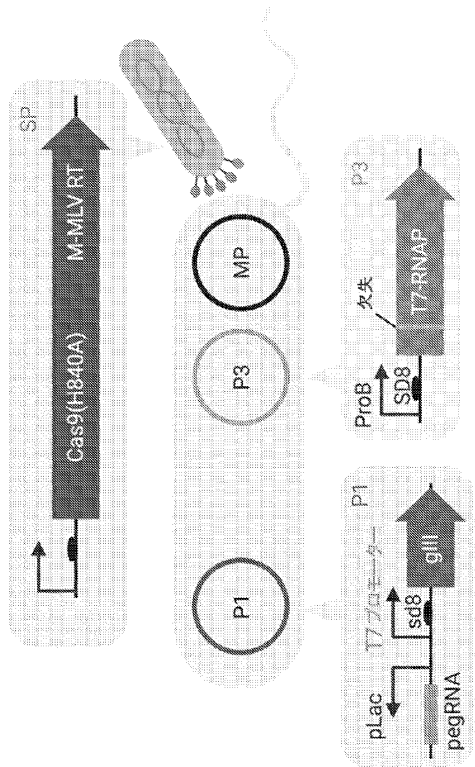


図 13

【図 1 4】

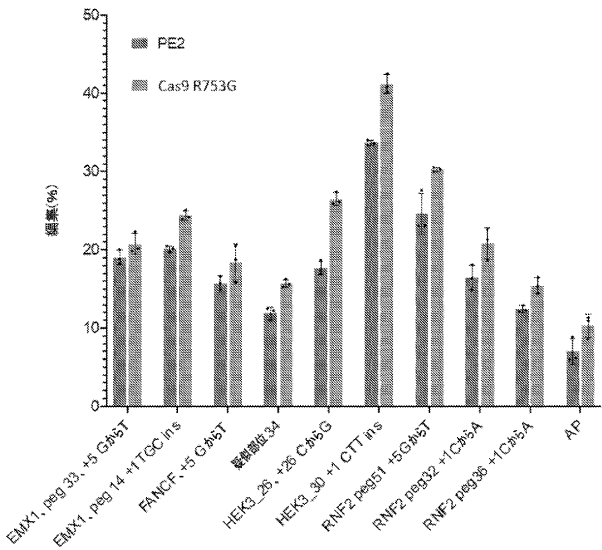


図 14

【図 1 5】

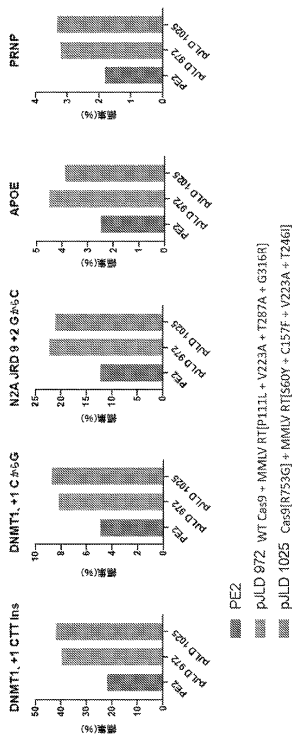


図 15

【図 1 6】

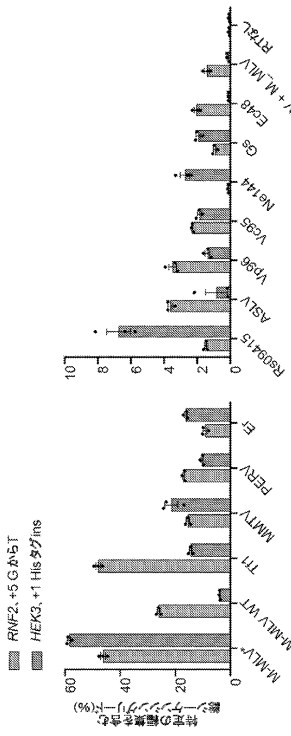


図 16

10

20

30

40

50

【図 17】

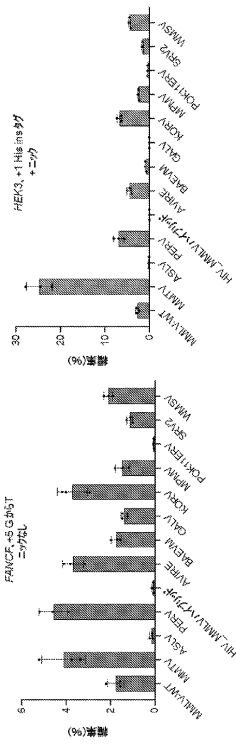


図 17

【図 18】

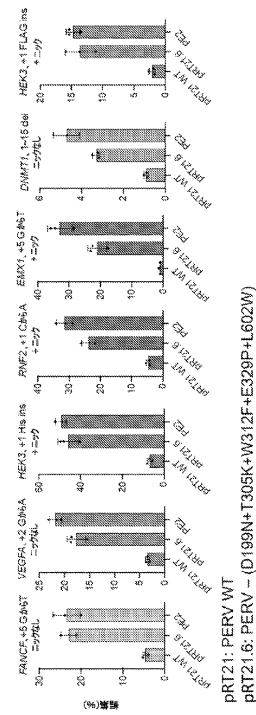


図 18

【図 19】

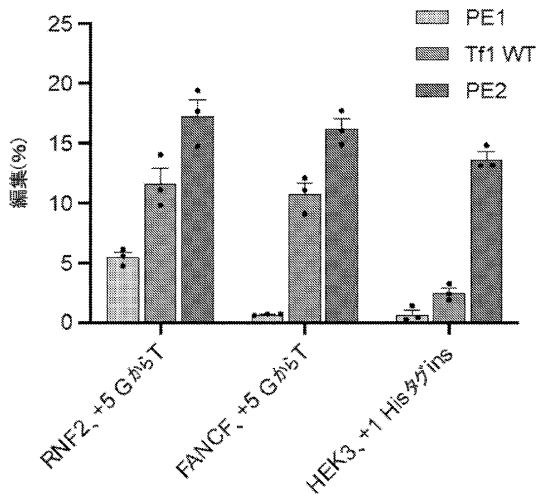


図 19

【図 20】

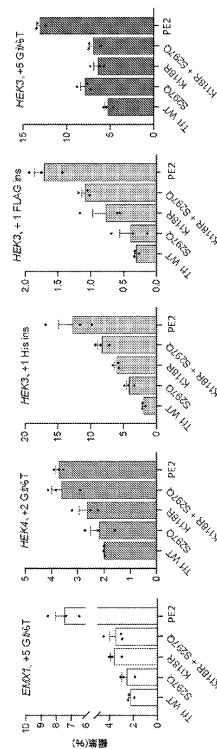


図 20

10

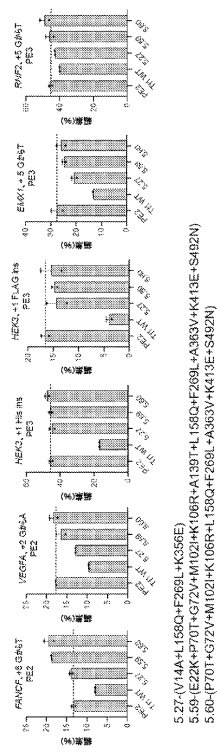
20

30

40

50

【図 2 1】



21

【図 22】

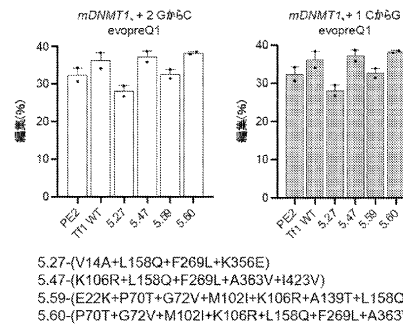


图 22

10

20

【圖 23】

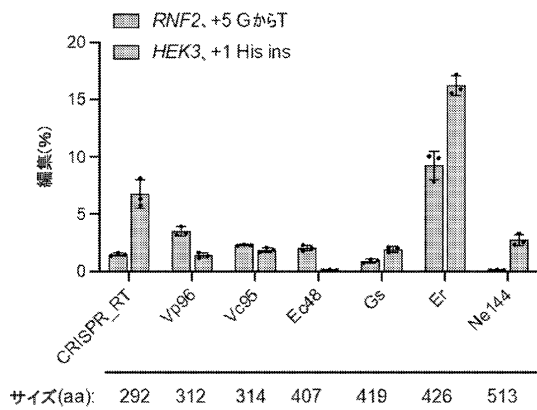
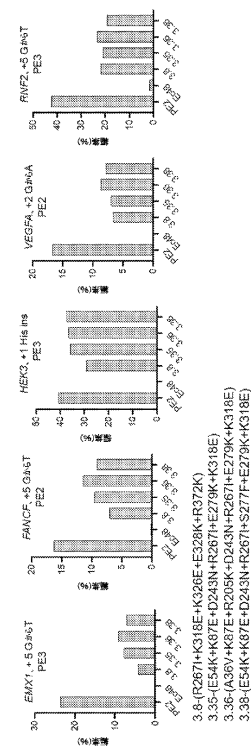


图23

【図 24】



24

30

40

50

【図 28】

代替 RT ドメインで置き換えた PE2

- Tf1 RT を使用する PE2
- MMLV-WT RT を使用する PE2
- AVIRE RT を使用する PE2
- BAEVM RT を使用する PE2
- GALV RT を使用する PE2
- KORV RT を使用する PE2
- MPMV を使用する PE2
- POK11ERV RT を使用する PE2
- SRV2 RT を使用する PE2
- MMTV RT を使用する PE2
- PERV RT を使用する PE2
- Er RT を使用する PE2
- Rs09415 RT を使用する PE2
- ASLV RT を使用する PE2
- Vp96 RT を使用する PE2
- Vc95 RT を使用する PE2
- Ne144 RT を使用する PE2
- Gs RT を使用する PE2
- Ec48 RT を使用する PE
- HIV+MMLV RT を使用する PE2

図28

【図 29】

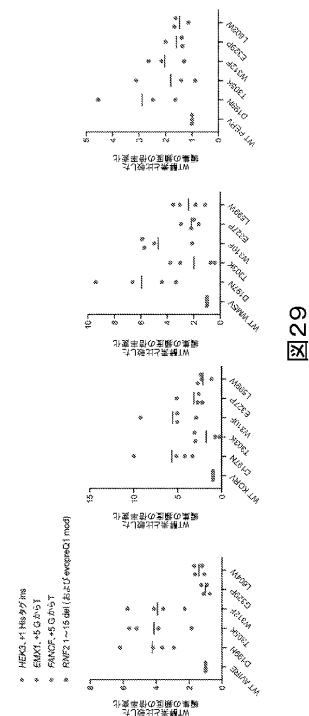


図 29

10

20

【図 30】

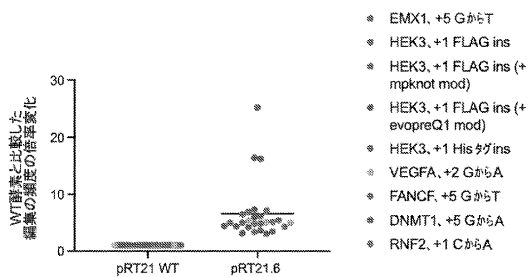


図30

【図 31 A】

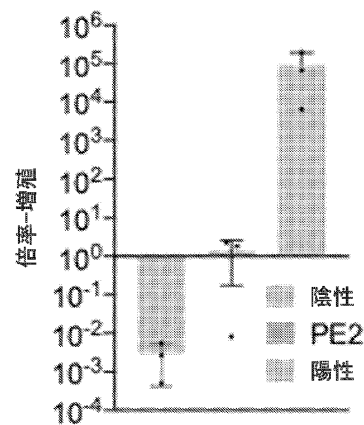


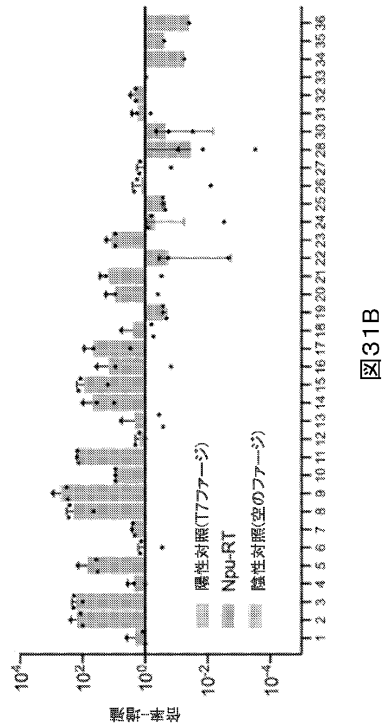
図31A

30

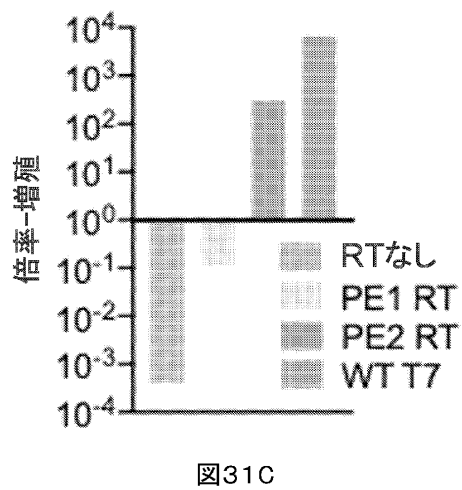
40

50

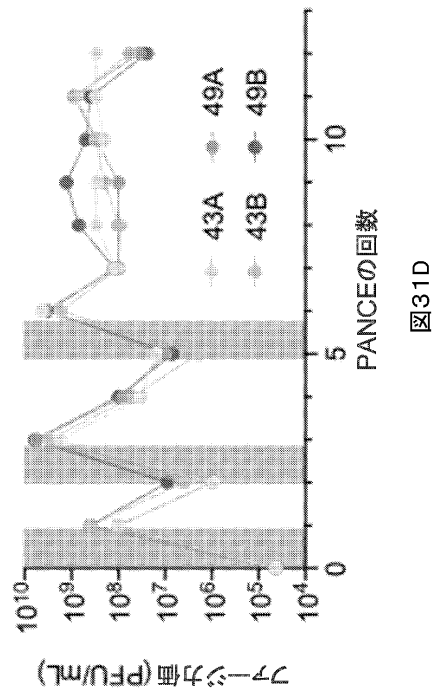
【図 3 1 B】



【図 3 1 C】



【図 3 1 D】



【図 3 2】

クローン	D200	V223	E302	T306	M457	A462
1	Y		A			
2	Y		A			
3	Y	A			I	
4	Y	A			I	
5		M		K		S
6		M		K		S
7		M		K		S
8		M		K		S
9	N		K			
10	N		K			
11	Y		K			
12	Y			K		
13	Y					
14	Y		K			
15		M				
16	Y					

10

20

30

40

50

【図 3 3】

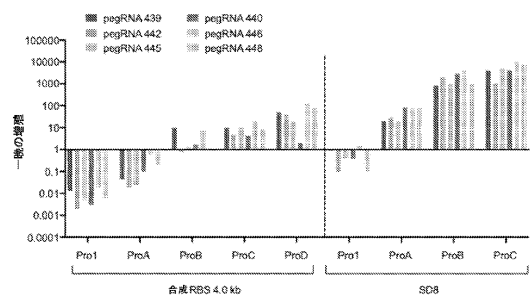


図33A

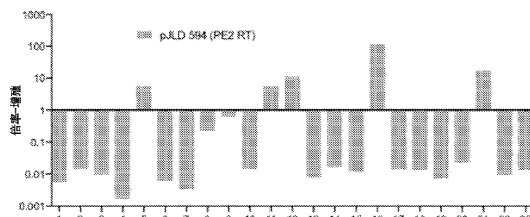


図33B

【図 3 4】

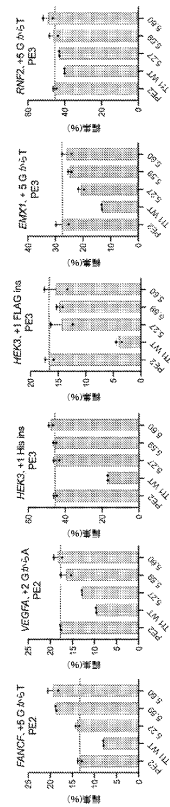


図34

【図 3 5】

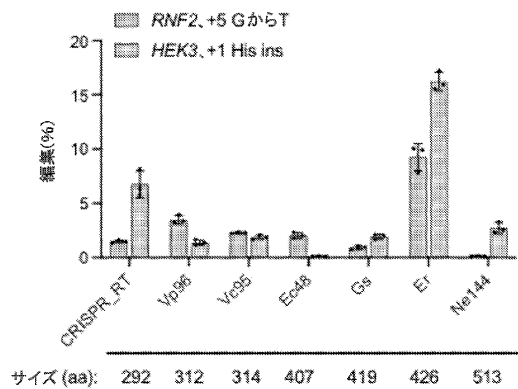


図35

【図 3 6】

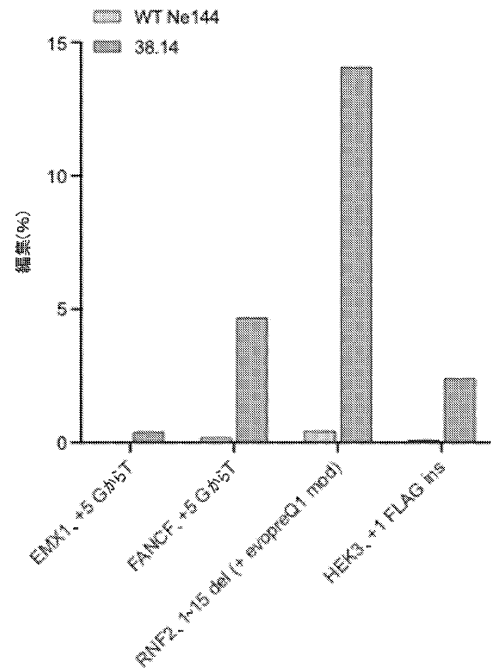


図36

10

20

30

40

50

【図 4 1】

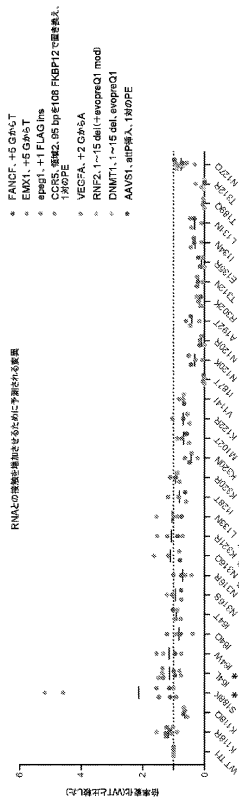


図 41

【図 4 2】

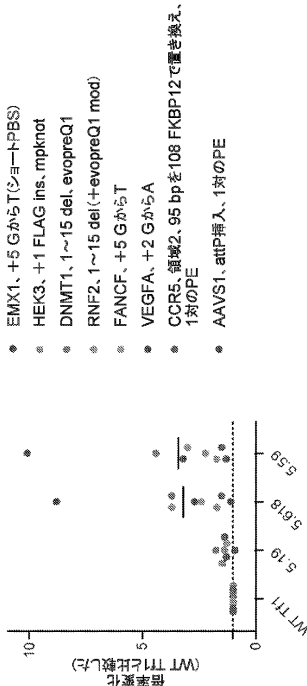


図 42

【図 4 3】

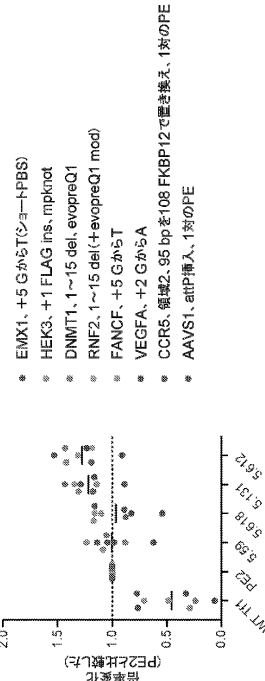


図 43

【図 4 4 A】

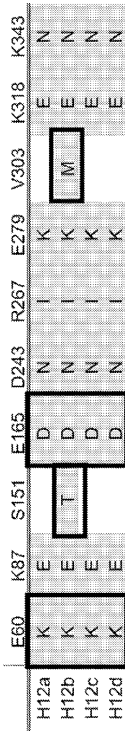


図 44A

10

20

30

40

50

【図 4 4 B】

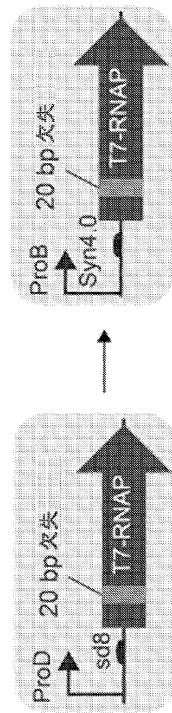


図 44B

【図 4 5】

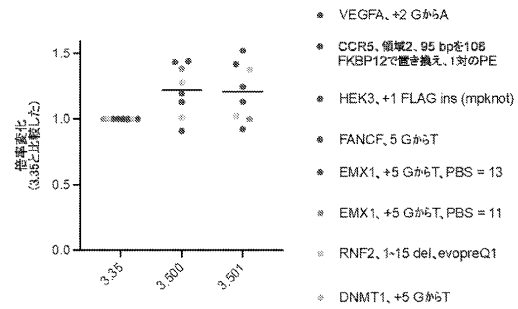


図 45

10

20

【図 4 6】

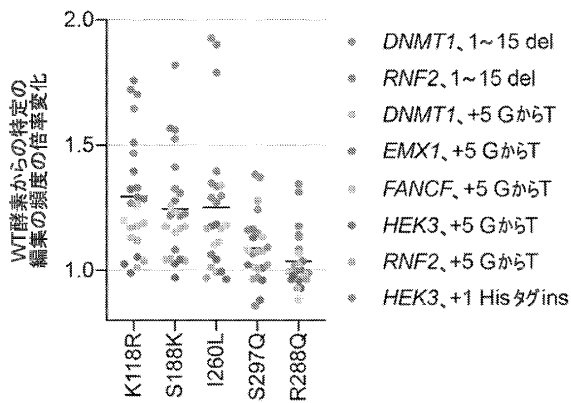


図 46

【図 4 7】

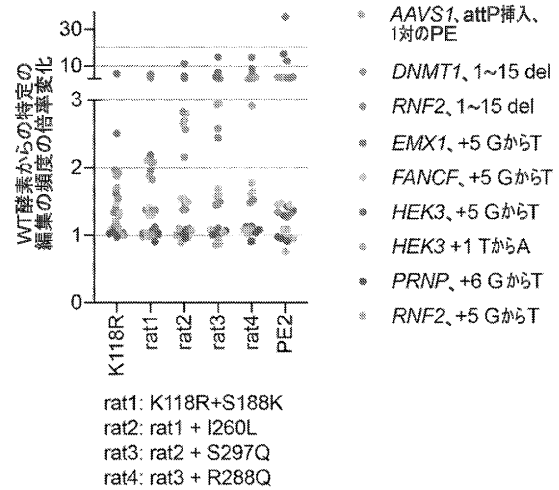


図 47

30

40

50

【図 48】

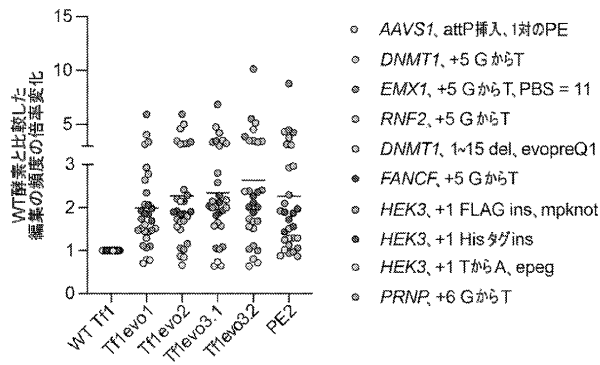


図48

【図 49】

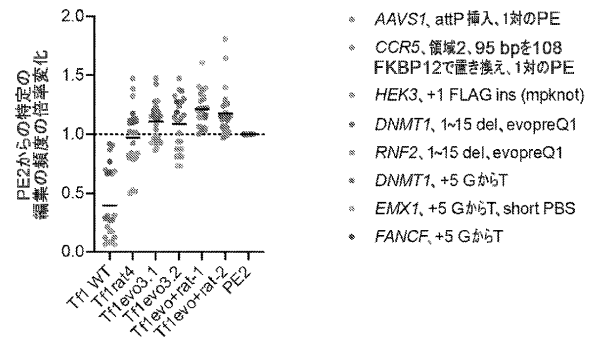


図49

10

【図 50 A】

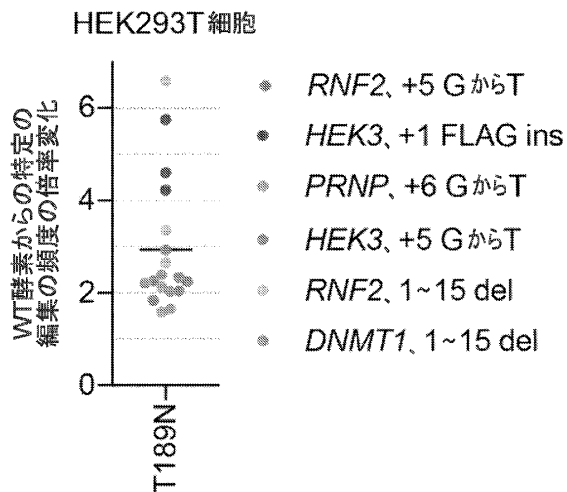


図50A

【図 50 B】

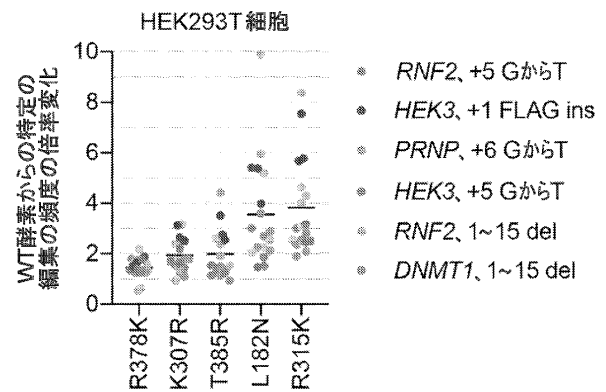


図50B

20

30

40

50

【図 5 1】

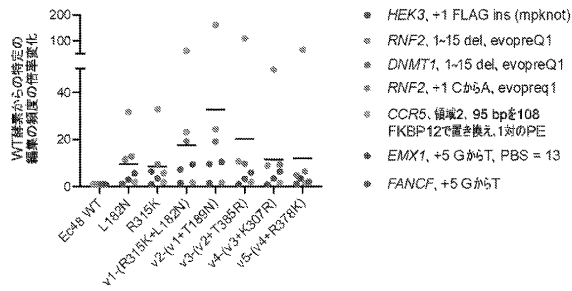


図51

【図 5 2】

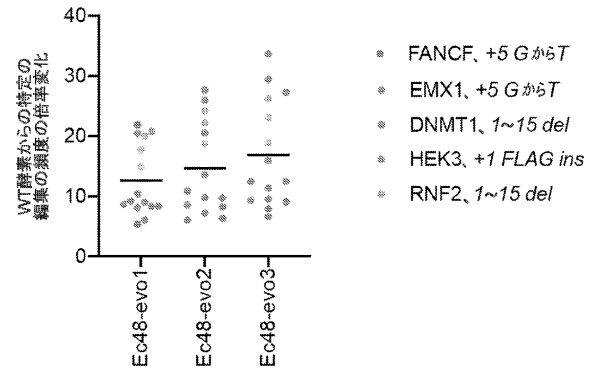


図52

10

【図 5 3】

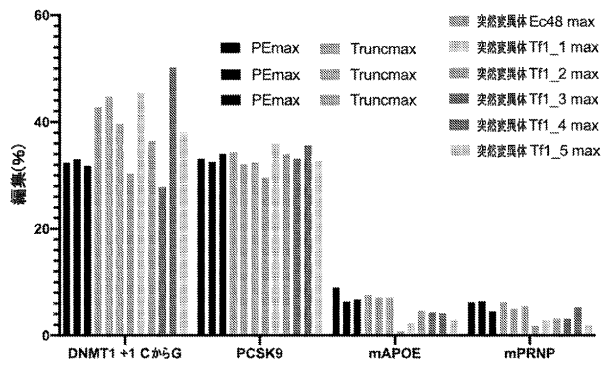


図53

【図 5 4】

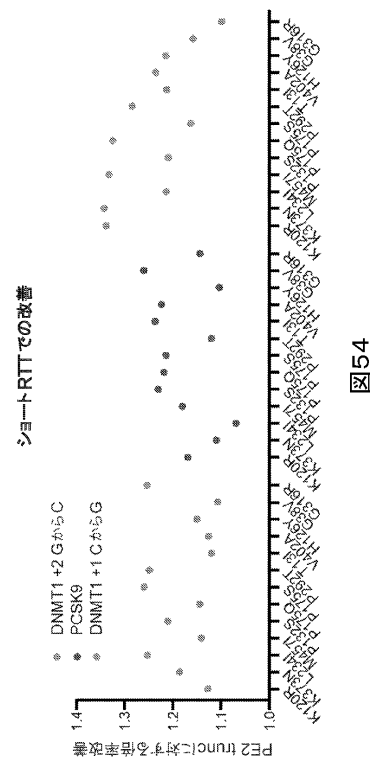


図 54

20

30

40

50

【 図 5 5 A 】

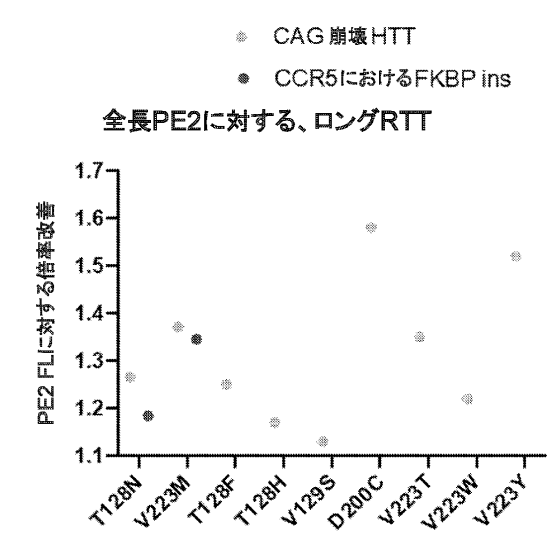


図55A

【 図 5 5 B 】

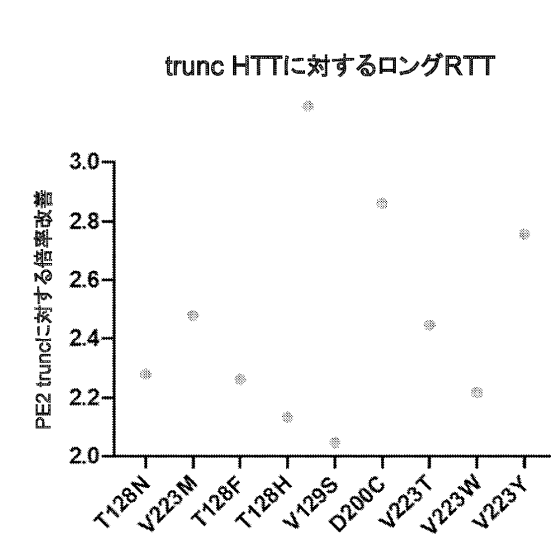
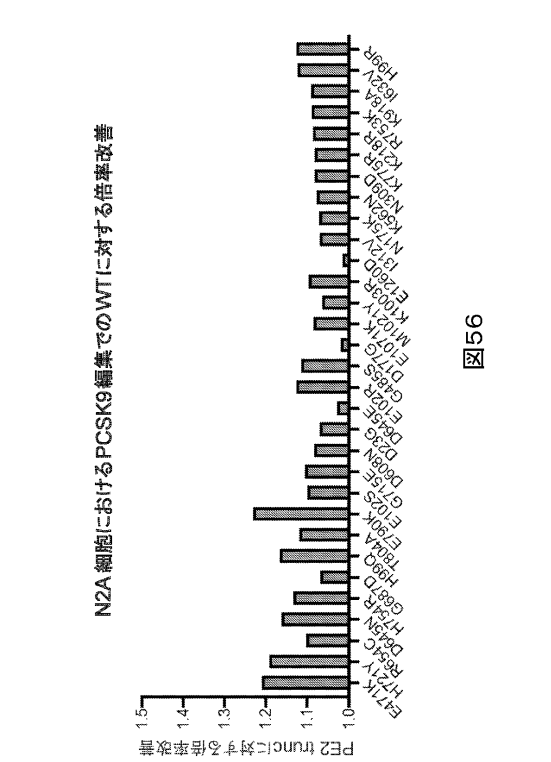


図55B

【 図 5 6 】



【図 5 7 B】

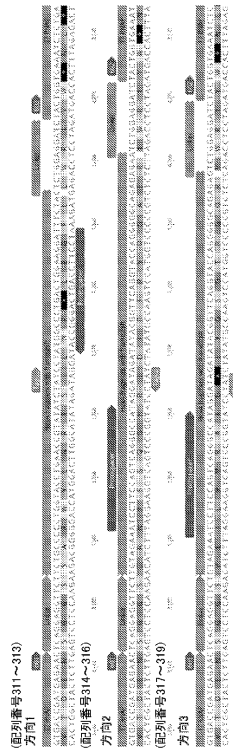


図57B

【図 5 7 C】

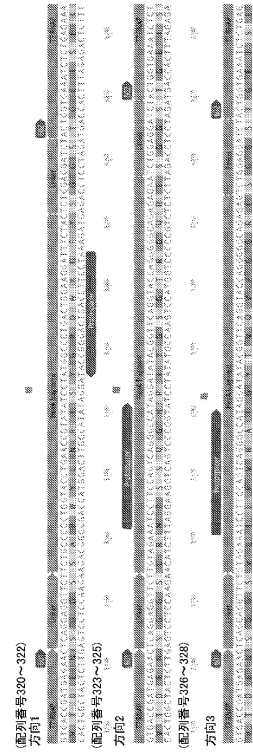


図57C

10

20

【図 5 8 A】

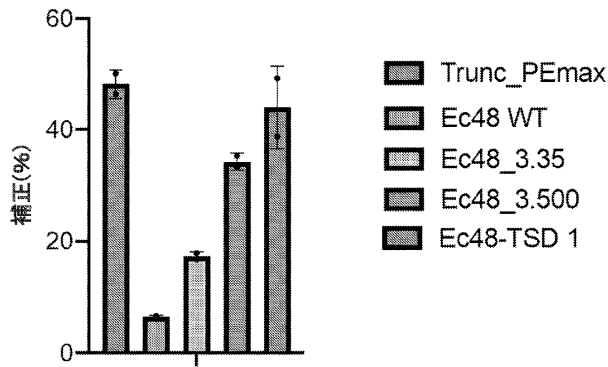


図58A

【図 5 8 B】

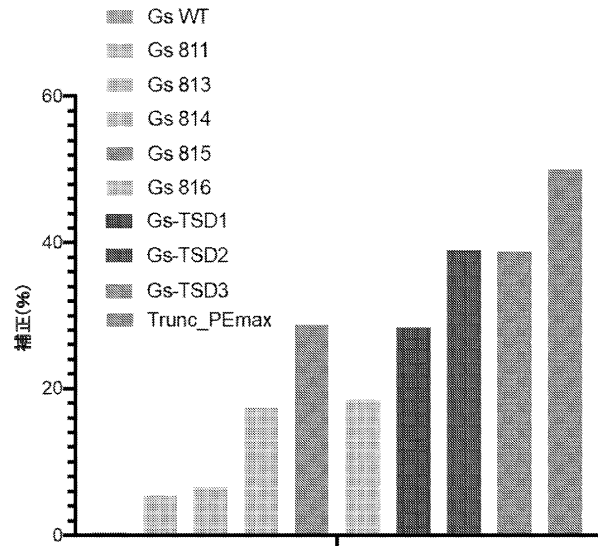


図58B

30

40

50

【図 59】

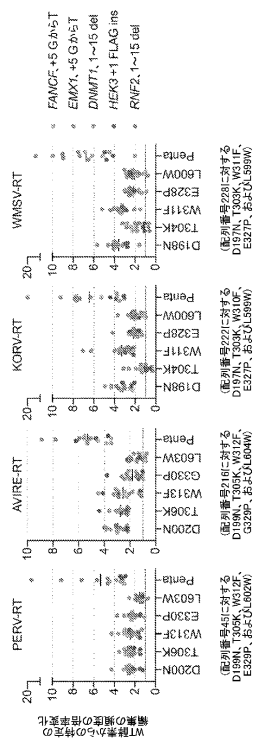


図 59

【配列表】

202453048700001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/074628

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C12N9/12	C12N9/22 C12N15/62 C12N15/10
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) 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, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/191239 A1 (BROAD INST INC [US]; HARVARD COLLEGE [US]) 24 September 2020 (2020-09-24) paragraphs [0008] - [0011], [0234], [0434], [0438]; claims 1-10, 33, 34, 37, 52-55, 60-63; table 1; sequence 127 paragraphs [0457], [0463], [0509], [0530], [1002], [1163] - [1167] ----- -/--	1, 55-61, 129, 130, 132-146
☒ 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 1 December 2022		Date of mailing of the international search report 30/01/2023
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 Bucka, Alexander

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/074628

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAGEN BENEDIKT ET AL: "A high rate of polymerization during synthesis of mouse mammary tumor virus DNA alleviates hypermutation by APOBEC3 proteins", PLOS PATHOGENS, vol. 15, no. 2, 15 February 2019 (2019-02-15), page e1007533, XP055979842, DOI: 10.1371/journal.ppat.1007533 Retrieved from the Internet: URL:https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1007533&type=printable> page 19; figures 3,4 -----	1,55-61, 129,130, 132-146
A	WO 2021/080922 A1 (UNIV COLUMBIA [US]) 29 April 2021 (2021-04-29) paragraph [0121]; claims 1-20 -----	1,55-61, 129,130, 132-146
A	SHARON EILON ET AL: "Functional Genetic Variants Revealed by Massively Parallel Precise Genome Editing", CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 175, no. 2, 20 September 2018 (2018-09-20), page 544, XP085496812, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2018.08.057 figure 1 -----	1,55-61, 129,130, 132-146
A	WO 2018/226855 A1 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL [US]; UNIV CALIFORNIA [US]) 13 December 2018 (2018-12-13) claims 1-5 -----	1,55-61, 129,130, 132-146
A	ATSUSHI KONISHI ET AL: "Amino acid substitutions away from the RNase H catalytic site increase the thermal stability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase through RNase H inactivation", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 454, no. 2, 17 October 2014 (2014-10-17), pages 269-274, XP055673986, Amsterdam NL ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.044 figure 3 ----- -/--	1,55-61, 129,130, 132-146

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/074628

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/092042 A1 (NOVOZYMES AS [DK]) 16 May 2019 (2019-05-16) claims 1-5 -----	1, 55-61, 129, 130, 132-146
A	ENTIN-MEER MICHAL ET AL: "The role of phenylalanine-119 of the reverse transcriptase of mouse mammary tumour virus in DNA synthesis, ribose selection and drug resistance", BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 367, no. 2, 15 October 2002 (2002-10-15), pages 381-391, XP055979844, GB ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/bj20020712 Retrieved from the Internet: URL:https://portlandpress.com/biochemj/art icle-pdf/367/2/381/709378/bj3670381.pdf> figures 1,2; table 1 -----	1, 55-61, 129, 130, 132-146
A	TAUBE RAN ET AL: "Reverse transcriptase of mouse mammary tumour virus: expression in bacteria, purification and biochemical characterization", BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 329, no. 3, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 579-587, XP055980374, GB ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/bj3290579 Retrieved from the Internet: URL:https://portlandpress.com/biochemj/art icle-pdf/329/3/579/630890/bj3290579.pdf> figure 1; table 1 -----	1, 55-61, 129, 130, 132-146
X,P	WO 2021/178720 A2 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VI LLC [US]) 10 September 2021 (2021-09-10) sequence 3563 -----	1, 55-61, 129, 130, 132-146

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/074628

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

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/074628**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1, 55-61, 129, 130, 132-146(all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2022 /074628

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 55-61, 129, 130, 132-146(all partially)

A prime editor comprising a nucleic acid-programmable DNA-binding protein (napDNAbp) and a mouse mammary tumor virus (MMTV) reverse transcriptase or a variant thereof.

2-20. claims: 1-61, 129-146(all partially)

A prime editor comprising a nucleic acid-programmable DNA-binding protein (napDNAbp) and a reverse transcriptase, wherein in each separate invention the reverse transcriptase is one of the following enzymes: an avian sarcoma leukosis virus (ASLV) reverse transcriptase or a variant thereof, a porcine endogenous retrovirus (PERV) reverse transcriptase or a variant thereof, an HIV-MMLV reverse transcriptase or a variant thereof, an AVIRE reverse transcriptase or a variant thereof, a baboon endogenous virus (BAEVM) reverse transcriptase or a variant thereof, a gibbon ape leukemia virus (GALV) reverse transcriptase or a variant thereof, a koala retrovirus (KORV) reverse transcriptase or a variant thereof, a Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) reverse transcriptase or a variant thereof, a POK11ERV reverse transcriptase or a variant thereof, a simian retrovirus type 2 (SRV2) reverse transcriptase or a variant thereof, a woolly monkey sarcoma virus (WMSV) reverse transcriptase or a variant thereof, a Vp96 reverse transcriptase or a variant thereof, a Vc95 reverse transcriptase or a variant thereof, an Ec48 reverse transcriptase or a variant thereof, a Gs reverse transcriptase or a variant thereof, an Er reverse transcriptase or a variant thereof, an Nel44 reverse transcriptase or a variant thereof, a Tfl reverse transcriptase or a variant thereof, or an Rs09415 reverse transcriptase ("CRISPR-RT") or a variant thereof.

21. claims: 62-69

An AVIRE reverse transcriptase variant having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% sequence identity with SEQ ID NO: 216, wherein the AVIRE reverse transcriptase variant comprises one or more mutations selected from the group consisting of D199N, T305K, W312F, G329P, and L604W.

22. claims: 70-77

A KORV reverse transcriptase variant having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/US2022 /074628

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

least 99% sequence identity with SEQ ID NO: 222, wherein the KORV reverse transcriptase variant comprises one or more mutations selected from the group consisting of D197N, T303K, W310F, E327P, and L599W.

23. claims: 78-85

A WMSV reverse transcriptase variant having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% sequence identity with SEQ ID NO: 228, wherein the WMSV reverse transcriptase variant comprises one or more mutations selected from the group consisting of D197N, T303K, W311F, E327P, and L599W.

24. claims: 86-93

A PERV reverse transcriptase variant having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% sequence identity with SEQ ID NO: 45, wherein the PERV reverse transcriptase variant comprises one or more mutations selected from the group consisting of D199N, T305K, W312F, E329P, and L602W.

25. claims: 94-97

A Tfl reverse transcriptase variant having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% sequence identity with SEQ ID NO: 55, wherein the Tfl reverse transcriptase variant comprises one or more mutations selected from the group consisting of V14A, E22K, I64L, I64W, P70T, G72V, M102I, K106R, K118R, L133N, A139T, L158Q, S188K, I260L, F269L, E274R, R288Q, Q293K, S297Q, N316Q, K321R, K356E, A363V, K413E, I423V, and S492N relative to SEQ ID NO: 55.

26. claims: 98-101

An Ec48 reverse transcriptase variant having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% sequence identity with SEQ ID NO: 59, wherein the Ec48 reverse transcriptase variant comprises one or more mutations selected from the group consisting of A36V, E54K, E60K, K87E, S151T, E165D, L182N, T189N, R205K, V214L, D243N, R267I, S277F, E279K, V303M, K307R, R315K, N317S, K318E, H324Q, K326E, E328K, K343N, R372K, R378K, and T385R relative to SEQ ID NO: 59.

International Application No. PCT/US2022/074628

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

27. claims: 102-104

An Nel44 reverse transcriptase variant having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% sequence identity with SEQ ID NO: 239, wherein the Nel44 reverse transcriptase variant comprises one or more mutations selected from the group consisting of A157T, A165T, and G288V relative to SEQ ID NO: 239.

28. claims: 105-107

A Vc95 reverse transcriptase variant having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% sequence identity with SEQ ID NO: 241, wherein the Vc95 reverse transcriptase variant comprises one or more mutations selected from the group consisting of LI 1M, S75A, V97M, N146D, and N245T relative to SEQ ID NO: 241.

29. claims: 108-120

A Gs reverse transcriptase variant having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% sequence identity with SEQ ID NO: 60, wherein the Gs reverse transcriptase variant comprises one or more mutations selected from the group consisting of N12D, A16E, A16V, L17P, V20G, L37R, L37P, R38H, Y40C, I41N, I41S, W45R, I67T, I67R, G72E, G73V, G78V, Q93R, A123V, Y126F, E129G, K162N, P190L, D206V, R233K, A234V, R263G, P264S, R267M, K279E, R287I, R291K, P309T, R344S, R358S, R360S, E363G, V374A, and Q412H relative to SEQ ID NO: 60.

30. claims: 121-124

An MMLV reverse transcriptase variant comprising one or more mutations relative to SEQ ID NO: 33 selected from the group consisting of T13I, V19I, A32T, G38V, S60Y, P111L, K120R, H126Y, T128N, T128F, T128H, V129S, P132S, G138R, C157F, P175Q, P175S, D200S, D200Y, D200C, Y222F, V223A, V223M, V223T, V223W, V223Y, L234I, T246I, N249S, T287A, P292T, E302A, E302K, G316R, E346K, K373N, W388C, V402A, K445N, M457I, and A462S.

31. claims: 125-128

A Cas9 variant comprising one or more mutations relative to SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 11 selected from the group consisting of D23G, H99Q, H99R, E102K, E102S, E102R, N175K,

10

20

30

40

50

International Application No. **PCT/US2022 /074628**

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

D177G, K218R, N309D, I312V, E471K, G485S, K562N, D608N,
1632V, D645N, D645E, R654C, G687D, G715E, H721Y, R753K,
R753G, H754R, K775R, E790K, T804A, K918A, K1003R, M1021Y,
E1071K, and E1260D.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/074628

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020191239 A1	24-09-2020	AU 2020240109 A1	30-09-2021
		AU 2020242032 A1	07-10-2021
		CA 3129988 A1	24-09-2020
		CA 3130488 A1	24-09-2020
		CN 113891936 A	04-01-2022
		CN 113891937 A	04-01-2022
		CN 114127285 A	01-03-2022
		CN 114729365 A	08-07-2022
		DE 112020001306 T5	27-01-2022
		DE 112020001339 T5	13-01-2022
		DE 112020001342 T5	13-01-2022
		EP 3942040 A1	26-01-2022
		EP 3942041 A1	26-01-2022
		EP 3942042 A1	26-01-2022
		EP 3942043 A2	26-01-2022
		GB 2601617 A	08-06-2022
		GB 2601618 A	08-06-2022
		GB 2601619 A	08-06-2022
		IL 286324 A	31-10-2021
		IL 286335 A	31-10-2021
		JP 2022526908 A	27-05-2022
		JP 2022527740 A	06-06-2022
		JP 2022531539 A	07-07-2022
		JP 2022532470 A	15-07-2022
		KR 20210142210 A	24-11-2021
		KR 20210143230 A	26-11-2021
		SG 11202109679V A	28-10-2021
		SG 11202109882V A	28-10-2021
		US 11447770 B1	20-09-2022
		US 2022356469 A1	10-11-2022
		WO 2020191153 A2	24-09-2020
		WO 2020191171 A1	24-09-2020
		WO 2020191233 A1	24-09-2020
		WO 2020191234 A1	24-09-2020
		WO 2020191239 A1	24-09-2020
		WO 2020191241 A1	24-09-2020
		WO 2020191242 A1	24-09-2020
		WO 2020191243 A1	24-09-2020
		WO 2020191245 A1	24-09-2020
		WO 2020191246 A1	24-09-2020
		WO 2020191248 A1	24-09-2020
		WO 2020191249 A1	24-09-2020
WO 2021080922 A1	29-04-2021	US 2022411768 A1	29-12-2022
		WO 2021080922 A1	29-04-2021
WO 2018226855 A1	13-12-2018	US 2020140835 A1	07-05-2020
		WO 2018226855 A1	13-12-2018
WO 2019092042 A1	16-05-2019	CN 111511908 A	07-08-2020
		EP 3707252 A1	16-09-2020
		US 2020318086 A1	08-10-2020
		WO 2019092042 A1	16-05-2019
WO 2021178720 A2	10-09-2021	AU 2021230546 A1	13-10-2022
		BR 112022017715 A2	16-11-2022
		CA 3174486 A1	10-09-2021
		EP 4114937 A2	11-01-2023

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

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	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1

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

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

チェン, ピーター, ジェイ.

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

(72)発明者

ドーマン, ジョーダン, レイ

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

(72)発明者

パンディー, スムリティ

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

ノウゲバウアー, モニカ

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)

4B029 AA23 BB11 CC01 GA01 GA08 GB10
4B065 AA93X AB01 AC20 BA02 CA44 CA46
4C084 AA13 NA14 ZC41
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZC41
4C087 AA01 AA02 CA12 CA20 NA14 ZC41